

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 3
март
2024



НАУКА
— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Метаанализ экспериментальных исследований влияния монотерапии мелатонином на прирост массы тела и пищевое поведение крыс при различных диетах
Н. В. Кузьменко, В. А. Цырлин, М. Г. Плисс, М. М. Галагудза 299
- Зебраданию (*Danio rerio*) как перспективная экспериментальная модель травматического повреждения мозга
А. Д. Шевляков, Н. П. Ильин, Д. С. Галстян, А. Н. Икрин, Т. О. Колесникова, К. В. Апухтин, М. М. Котова, В. С. Никитин, Т. Г. Амстиславская, Е. В. Петерсен, А. В. Калув 326
- Участие тандема «тучная клетка – нейрон» в регуляции работы сердца при сердечно-сосудистых патологиях
М. П. Морозова, А. Д. Куренкова, Б. А. Умарова 349
- Роль фосфорилирования титина в изменении жесткости миокарда при кардиомиопатиях
Г. З. Михайлова, И. М. Вихлянцева, В. Л. Лакомкин 375
-

Экспериментальные статьи

- Определение профиля когнитивного дефицита у кардиохирургических пациентов с использованием метода оптимальной кластеризации
О. М. Разумникова, И. В. Тарасова, Ю. А. Мезенцев, П. С. Павлов, О. А. Трубникова 399
- Синдекан-1 как потенциальный мессенджер эффектов дистантного посткондиционирования в экспериментах с ишемией головного мозга
М. Э. Колпакова, А. А. Яковлева, Л. С. Полякова, Н. El Amghari, S. Soliman, Д. Р. Файзуллина, В. В. Шаройко 414
- Анакинра способствует развитию противовоспалительной реакции микроглии в латентный период литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии
М. В. Захарова, А. В. Дёмина, А. А. Коваленко, О. Е. Зубарева, А. М. Ищенко, А. В. Зайцев 424
- Активированный эндотелий стимулирует активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при физиологической гипоксии и коротком гипоксическом стрессе *in vitro*
О. В. Жидкова, Е. Р. Андреева, Л. Б. Буравкова 445
- Влияние холода на адренореактивность верхней брыжеечной артерии крысы
В. Н. Ярцев 469
- Анализ состояния глутамат- и гамкергических нейронов нижних бугров четверохолмия крыс линии Крушинского – Молодкиной на ранних этапах эпилептогенеза
С. Д. Николаева, Л. С. Никитина, М. В. Глазова, В. Т. Бахтеева, Е. В. Черниговская 480
- Функциональные изменения экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс при смене питьевого режима и артериальной гипертензии
А. А. Евтушенко, И. В. Орлов, И. П. Воронова, Т. В. Козырева 499
-
-

CONTENTS

Reviews

- Meta-Analysis of Experimental Studies of The Effect of Melatonin Monotherapy on Body Weight Gain and Eating Behavior in Rats on Different Diets
N. V. Kuzmenko, V. A. Tsyrlin, M. G. Pliss, and M. M. Galagudza 299
- Zebrafish As a Promising Experimental Model of Traumatic Brain Injury
A. D. Shevlyakov, N. P. Ilyin, D. S. Galstyan, A. N. Ikrin, T. O. Kolesnikova, K. V. Apukhtin, M. M. Kotova, V. S. Nikitin, T. G. Amstislavskaya, E. V. Petersenf, and A. V. Kalueff 326
- The Role of Mast Cell-Neuron Tandem in The Regulation of Cardiac Function in Cardiovascular Pathologies
M. P. Morozova, A. D. Kurenkova, and B. A. Umarova 349
- The Role of Titin Phosphorylation in Changes in Myocardial Stiffness in Cardiomyopathies
G. Z. Mikhailova, I. M. Vikhlyantsev, and V. L. Lakomkin 375
-

Experimental articles

- Definition of the Profile of Cognitive Deficit in Cardiac Surgery Patients Using the Optimal Clustering Method
O. M. Razumnikova, I. V. Tarasova, Yu. A. Mezentsev, P. S. Pavlov, and O. A. Trubnikova 399
- Syndecan-1 As Potential Messenger of Effects of Remote Postconditioning in Experiments with Brain Ischemia
M. E. Kolpakova, A. A. Jakovleva, L. S. Poliakova, H. El Amghari, S. Soliman, D. R. Faizullina, and V. V. Sharoyko 414
- Anakinra Promotes M2 Microglia Activation During the Latent Phase of The Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy
M. V. Zakharova, A. V. Dyomina, A. A. Kovalenko, O. E. Zubareva, A. M. Ischenko, and A. V. Zaitsev 424
- Activated Endothelium Changes the Activity of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells During Physiological Hypoxia or Short Hypoxic Stress *in Vitro*
O. V. Zhidkova, E. R. Andreeva, and L. B. Buravkova 445
- Effects Of Cold on The Adrenoreactivity of The Rat Superior Mesenteric Artery
V. N. Yartsev 469
- Analysis of the State of Glutamate- And GABA-Ergic Neurons in The Inferior Colliculi of Krushinsky – Molodkina Strain Rats at Early Stages of Epileptogenesis
S. D. Nikolaeva, L. S. Nikitina, M. V. Glazova, V. T. Bakhteeva, and E. V. Chernigovskaya 480
- Functional Changes in The Expression of the *Aqp4* Gene in The Hypothalamus Under the Influence of Drinking Regimen and Arterial Hypertension in Rats
A. A. Evtushenko, I. V. Orlov, I. P. Voronova, and T. V. Kozyreva 499
-
-

МЕТААНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ
МОНОТЕРАПИИ МЕЛАТОНИНОМ НА ПРИРОСТ МАССЫ ТЕЛА
И ПИЩЕВОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ДИЕТАХ

© 2024 г. Н. В. Кузьменко^{1,2,*}, В. А. Цырлин¹, М. Г. Плисс^{1,2}, М. М. Галагудза¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. академика И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: nat.kuzmenko2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 22.12.2023 г.

В раннее проведенном метаанализе мы показали, что длительное введение мелатонина минимизирует изменения в липидном профиле, вызванные диетой. Целью настоящей работы являлось с помощью метаанализа исследовать эффект монотерапии мелатонином на прирост массы тела (ПМТ) и пищевое поведение у крыс в зависимости от диеты. С этой целью мы провели метаанализ 43 публикаций, исследующих влияние монотерапии мелатонином на ПМТ, уровень лептина, потребление еды и воды у крыс, содержащихся на стандартной диете (37 публикаций), а также на диетах с повышенным содержанием фруктозы (5 публикаций) и жиров (9 публикаций). По итогам наших исследований, хотя мелатонин снижал уровень триглицеридов, общего холестерина и лептина у крыс, содержащихся на диетах с добавлением фруктозы и жиров, но не на стандартной диете, терапия мелатонином препятствовала набору массы тела крыс при любой диете. Увеличение дозы мелатонина не усиливало эффекта терапии ни при одной из исследованных диет. Мы не получили убедительных доказательств зависимости эффекта мелатонина от исходной массы тела и возраста крыс. Было установлено, что на стандартной диете мелатонин уменьшает потребление пищи и воды. Мелатонин не снижал ПМТ при стандартной диете, если вводился внутривнутрибрюшинно. По итогам наших исследований, мелатонин может быть полезен при метаболических нарушениях, вызванных диетой, поскольку улучшает показатели липидного профиля и препятствует набору массы тела. Однако снижение аппетита и ПМТ при приеме мелатонина может быть связано и с отрицательными побочными эффектами препарата, что нуждается в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: мелатонин, прирост массы тела, лептин, диета, аппетит, фруктоза, жир

DOI: 10.31857/S0869813924030015, **EDN:** CQBTSK

ВВЕДЕНИЕ

Мелатонин – гормон, который синтезируется практически всеми органами, и рецепторы к которому есть практически во всех тканях, выполняет множество различных функций, связанных с циркадными ритмами, метаболизмом, поддержанием го-

меостаза, иммунитетом, с защитой от активных форм кислорода [1]. Однако регуляцию суточных и сезонных ритмов связывают прежде всего с пинеальным мелатонином.

Сезонные изменения в метаболизме позвоночных при естественных флуктуациях фотопериода вызваны модуляцией активности тиреоидных гормонов под действием изменения уровня мелатонина. Так, уменьшение длины дня и повышение уровня мелатонина вызывает уменьшение секреции тиреотропного гормона (ТТГ) гипофизом и активного трийодтиронина (Т3). Увеличение длины дня и снижение уровня мелатонина вызывает противоположные изменения в уровне ТТГ и Т3 [2, 3]. Данные изменения ассоциированы с приростом массы тела (ПМТ) при длинном дне и со снижением общего метаболизма при коротком дне [3]. В экспериментальных исследованиях наблюдали аналогичные колебания тиреоидных гормонов при искусственных вариациях фотопериода или при длительной терапии мелатонином [4–9]. Кроме того, в большом количестве работ показано, что экзогенный мелатонин способен вызывать изменения уровня инсулина, параметров липидного профиля, глюкозы и массы тела. Поскольку метаанализы показали снижение параметров липидного профиля, инсулина и массы тела после терапии мелатонином [10–16], сегодня многие ученые рассматривают мелатонин в качестве альтернативного препарата для профилактики и лечения метаболических нарушений, в том числе и ожирения. По результатам метаанализа [15] мелатонин уменьшал у взрослых людей массу тела, индекс массы тела и окружность талии. Дефицит мелатонина по данным одних исследований ассоциирован с резистентностью к лептину и с увеличением массы тела у людей и животных, по результатам других – уменьшает уровень лептина и не вызывает увеличения массы тела [3, 17–21].

В ранее проведенном метаанализе [10] мы показали, что эффекты мелатонина на параметры липидного и углеводного обмена зависят от диеты. Так, у крыс, содержащихся на диетах, обогащенных фруктозой, жирами и холестерином, монотерапия мелатонином угнетала синтез инсулина и улучшала показатели липидного профиля (снижала уровень триглицеридов и общего холестерина в основном за счет снижения уровня липопротеинов низкой плотности). При этом эффект мелатонина был направлен в сторону минимизации изменений в липидном профиле, вызванных диетой. У крыс, содержащихся на стандартной диете, мелатонин не оказывал влияния на уровень холестерина, но в больших дозах вызвал увеличение уровня триглицеридов и глюкозы. По этой причине можно предположить, что эффект мелатонина на ПМТ крыс также будет зависеть от диеты. Исследование эффектов мелатонина на крысах интересно по причине того, что, как и человек, крыса является млекопитающим без четко выраженной сезонности в функционировании организма. Целью настоящей работы является с помощью метаанализа исследовать эффект монотерапии мелатонином на ПМТ и пищевое поведение у крыс в зависимости от диеты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаанализ был выполнен в соответствии с рекомендациями PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>). Поиск исследований осуществляли в 2022–2023 гг. на английском и русском языках независимо двумя людьми в базах PubMed, Scopus, Google Scholar, eLibrary без ограничения периода публикации. При поиске были использованы ключевые слова, характеризующие параметры (масса тела, прирост массы тела, вес, лептин, грелин, адипонектин), которые сочетались с воздействием (мелатонин, терапия мелатонином, инфузия мелатонина), объектом исследования (крысы, диета, корм, фруктоза, жиры, холестерин). Кроме того, дополнительно были просмотрены списки литературы публикаций, отобранных для метаанализа.

В метаанализ были включены исследования только монотерапии мелатонином. Отбирались только работы, в которых животные содержались в стандартных лабораторных условиях (освещение 12/12 или 14/10 день/ночь, нормотермия). Были исключены

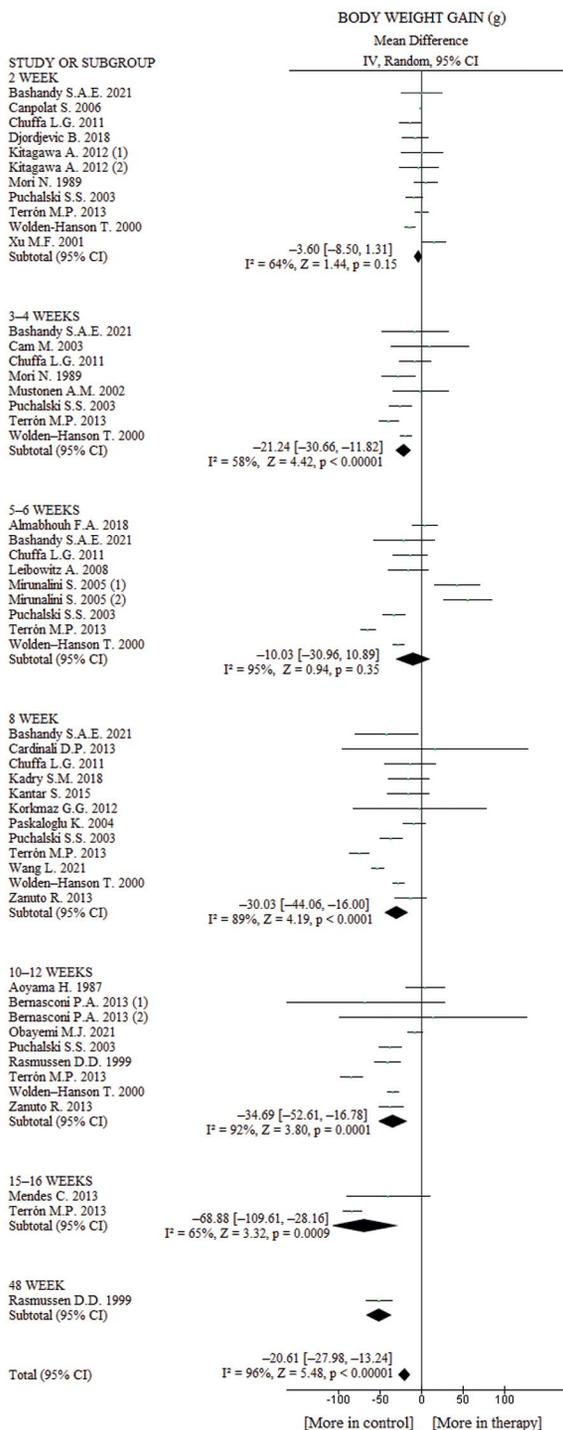


Рис. 1. Влияние терапии мелатонином на прирост массы тела крыс, содержащихся на стандартной диете. Метаанализ сделан без дополнительной стандартизации по дозе, способу и времени введения мелатонина.

исследования, в которых крысы находились при постоянных или непропорционально длительных темноте или освещении. Если в публикации не были уточнены условия содержания, то мы считали, что животные содержались в стандартных лабораторных условиях. Также мы исключили экспериментальные работы, поставленные на линиях крыс, чувствительных к изменению фотопериода (например, Fisher) и с генетическими нарушениями метаболизма (например, Zucker). Были исключены работы, исследующие влияние мелатонина на модели диабета/метаболического синдрома, вызванного введением токсичных веществ. Мы включили в метаанализ исследования, проведенные только на интактных или ложнооперированных животных. Были исключены работы с использованием новорожденных крысят и беременных самок. В статистический анализ не были включены работы, исследующие эффекты мелатонина при центральном введении. Кроме того, исключались публикации, в которых результаты были отображены в непонятной форме, не позволяющей оценить среднее значение и SD/SEM.

Из отобранных работ мы извлекали данные по массе тела крыс (в граммах) в начале и конце/на этапе терапии, затем рассчитывали в граммах ПМТ (как разницу между массой тела в конце/на этапе терапии и массой тела перед началом терапии). Кроме того, были извлечены данные по количеству потребляемой пищи (в г/день) и количеству потребляемой воды (в мл/день) в контрольной группе и в группе животных, которые принимали мелатонин. Также были извлечены данные по уровню лептина, адипонектина и грелина. Если данные были представлены отдельно для самцов и самок, то мы рассчитывали среднее арифметическое.

При проведении метаанализа мы отдельно исследовали крыс на стандартной диете, на диете с повышенным содержанием фруктозы, на диете с повышенным содержанием жиров и на диете, обогащенной холестерином. Далее мы объединяли данные в подгруппы по времени терапии мелатонином. При достаточном количестве исследований был проведен анализ зависимости эффекта от дозы и способа введения мелатонина.

Метаанализ результатов исследований был проведен с помощью статистической программы Review Manager 5.3 (Cochrane Library). Для анализа был использован inverse variance тест (Mean Difference). Гетерогенность включенных в метаанализ исследований устанавливали по критерию I^2 . Выбор модели фиксированных или рандомизированных эффектов осуществляли в соответствии с рекомендациями [22]. Для оценки статистической значимости суммарных результатов применяли Z-тест. Предвзятость при отборе публикаций проверяли с помощью графика-воронки. Доверительный интервал – 95%. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего была найдена 621 работа (12 обзоров литературы), исследующая влияние мелатонина на ПМТ и пищевое поведение крыс. Для метаанализа было отобрано 43 публикации [5, 18, 23–63]. Основные характеристики исследований представлены в табл. S (Дополнительные материалы).

При терапии мелатонин вводился в дозах от 0.03 до 50 мг/кг/день в течение 1–48 недель. Основные способы введения были орально (с питьевой водой или через зонд) и внутривентриально, но в трех исследованиях было использовано подкожное введение [29, 30, 47] и в одном [33] – внутривенное.

Стандартная диета

Было отобрано 37 работ, в которых исследовались крысы, содержащиеся на стандартной диете. В 29 работах были представлены данные о ПМТ, в 16 – о количестве потребляемой пищи, в 12 – о количестве потребляемой воды, в 10 – об уровне лептина

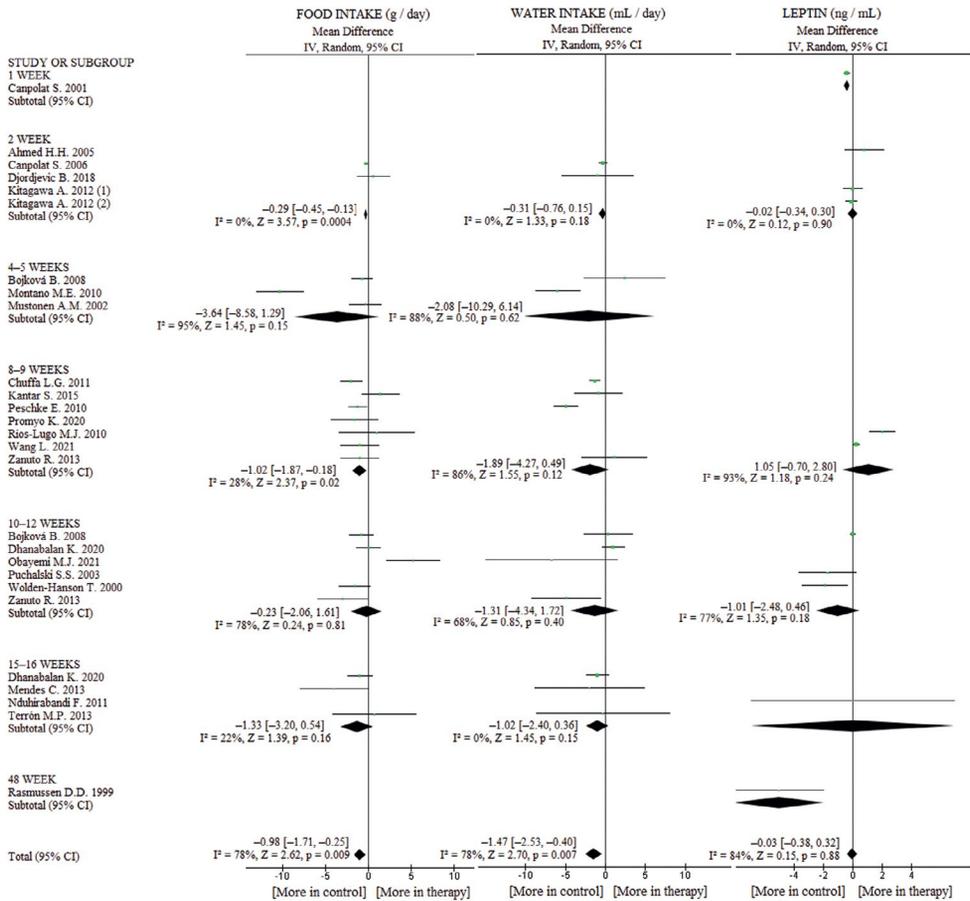


Рис. 2. Влияние терапии мелатонином на потребление корма и воды, на уровень лептина у крыс, содержащихся на стандартной диете. Метаанализ сделан без дополнительной стандартизации по дозе, способу и времени введения мелатонина.

(табл. S). Исходный возраст крыс колебался от 1.5 до 12 месяцев, большинство животных были 2–3-месячного возраста. Исходная масса тела крыс колебалась от 155 до 580 г и в среднем составляла 275 ± 112 г ($M \pm SD$). В контрольной группе потребление корма было 23 ± 5 г/день, потребление воды – 35 ± 9 мл/день. Мелатонин вводился крысам в дозе 0.03–30 мг/кг/день в течение 1–48 недель. К 8–16 неделям ПМТ в контрольной группе был 106 ± 91 г, мелатонин снижал ПМТ в среднем на $-34.56 [-46.12, -23.00]$ г ($I^2 = 92\%$, $Z = 5.86$, $p < 0.00001$) (рис. 1), что составляло приблизительно 9.4% от массы крыс в контрольной группе (402 ± 102 г). Кроме того, на фоне терапии мелатонином отмечалась тенденция уменьшения потребления корма и воды (рис. 2). По данным публикаций, уровень лептина имел большой разброс: от 0.54 [27] до 13 нг/мл [5], медиана – 5.8 нг/мл. Метаанализ не выявил однонаправленных тенденций изменения лептина после терапии мелатонином (рис. 2). Мы не получили убедительных доказательств зависимости эффекта мелатонина (при 8-недельной терапии) от исходной массы тела и возраста крыс (табл. 1). Два исследования не выявили зависимость эффекта мелатонина от пола животных [27, 47].

Таблица 1. Зависимость от исходной массы тела и возраста эффекта 8-недельной терапии мелатонином на прирост массы тела у крыс, содержащихся на стандартной диете

Неделя те- рапии	Средняя ис- ходная мас- са тела, г	Исходный возраст, мес.	№№ ссылок	Объем выборки мелатонин/ контроль	Средняя разность, г	I ² , %	Z	p
8-я неделя	148	1.5–2	2	16 / 16	–36.46 [–72.97, 0.05]	88	1.96	0.05
8-я неделя	254	2–3	6	54 / 52	–28.26 [–41.35, –15.17]	0	4.23	0.0001
8-я неделя	480	9–12	3	40 / 39	–27.75 [–37.84, –17.66]	52	5.39	0.00001

Без учета продолжительности терапии максимальное снижение ПМТ отмечалось при дозе мелатонина 2–6 мг/кг/день, при введении мелатонина с питьевой водой, при введении перед или в темную фазу (табл. 2, рис. 3). При внутрибрюшинном введении и при введении до полудня мелатонин не способствовал снижению ПМТ, однако при внутрибрюшинном введении по данным двух работ [32, 53] мелатонин уменьшал потребление корма (табл. 2). Следует отметить, что в большинстве работ, где мелатонин вводился в светлую фазу, его вводили внутрибрюшинно. По этой причине ассоциация времени введения с эффектом является неубедительной. Однако внутрибрюшинное введение мелатонина перед или в темную фазу также не вызывало уменьшения ПМТ [32, 44], а по данным [44] даже увеличивало ПМТ. Максимальное снижение потребления корма было при использовании мелатонина в дозе ≤ 1 мг/кг/день (табл. 2). Максимальное снижение потребления воды было при использовании мелатонина в дозе 2–6 мг/кг/день (табл. 2).

При стандартизации по срокам терапии введение мелатонина в течение двух недель в дозе ≤ 2 мг/кг/день уменьшало ПМТ, а при дозе ≥ 5 мг/кг/день – незначительно увеличивало. Однако на 8-й неделе терапии мелатонин независимо от дозы снижал ПМТ, но значимо при более низкой дозе (табл. 3).

Диета, обогащенная фруктозой

Было отобрано 5 работ, в которых исследовались крысы, содержащиеся на диете, обогащенной фруктозой, которая добавлялась в корм или питьевую воду. В 5 работах были представлены данные о ПМТ, в 1 – о количестве потребляемой пищи, в 1 – о количестве потребляемой воды, в 1 – об уровне лептина (табл. S). Исходный возраст крыс был 2–2.5 месяца, исходная масса тела – 258 ± 21 г. Во всех работах, кроме одной, введение фруктозы и мелатонина начиналось одновременно. В работе [40] терапия мелатонином начиналась через 4 недели содержания крыс на диете, обогащенной фруктозой. Мелатонин вводился крысам в дозе 1–30 мг/кг/день в течение 2–10 недель. К 4–10 неделям ПМТ в контрольной группе был 168 ± 70 г, мелатонин снижал ПМТ в среднем на -29.41 [–59.74, 0.92] г ($I^2 = 47\%$, $Z = 1.90$, $p = 0.06$) (рис. 4), что составляло приблизительно 7% от массы тела крыс в контрольной группе (425 ± 88 г). Без учета продолжительности терапии увеличение дозы мелатонина не усиливало эффект терапии (рис. 3). Влияние способа и времени введения мелатонина на эффект терапии мы не исследовали из-за недостаточного количества работ.

Таблица 2. Влияние дозы, способа и времени введения мелатонина на прирост массы тела, потребление корма и воды, уровень лептина у крыс, содержащихся на стандартной диете (анализ проведен без дополнительной стандартизации)

	Продолжительность терапии, недели	Доза мелатонина, мг/кг/день	№№ ссылок	Объем выборки мелатонин/контроль	Средняя разность	P , %	Z	p
Прирост массы тела на стандартной диете								
≤ 1 мг/кг/день	2–16	0.04–1	11	121/123	–17.98 [–25.81, –10.16]	95	4.51	0.00001
2–6 мг/кг/день	2–15	2–6	9	91/88	–30.16 [–48.13, –12.19]	96	3.29	0.001
≥ 10 мг/кг/день	2–11	10–30	11	83/81	–12.55 [–29.50, 4.41]	91	1.45	0.15
внутрибрюшинно	2–11	0.2–17	13	102/96	–2.56 [–12.48, 7.36]	72	0.51	0.61
подкожно	2–4	0.5–2	2	28/30	–1.45 [–1.76, –1.14]	0	9.3	0.00001
с питьевой водой	2–16	0.04–30	12	139/138	–32.05 [–40.71, –23.38]	93	7.25	0.00001
через зонд	8 и 12	4–20	4	34/34	–23.86 [–53.18, 5.46]	95	1.59	0.11
в светлую фазу	2–12	0.2–17	6	38/34	–1.78 [–12.48, 8.92]	61	0.33	0.74
перед и в темную фазу	2–16	0.5–30	8	95/97	–11.43 [–25.82, 2.95]	94	1.56	0.12
Потребление корма на стандартной диете								
≤ 1 мг/кг/день	1–16	0.04–1	8	104/106	–1.92 [–3.11, –0.74]	87	3.18	0.001
2–6 мг/кг/день	4–15	2–4	6	68/68	0.33 [–1.54, 2.20]	69	0.35	0.73
≥ 10 мг/кг/день	8–16	10–20	3	33/33	–0.26 [–1.25, 0.73]	23	0.51	0.61

Окончание табл. 2

	Продолжительность терапии, недели	Доза мелатонина, мг/кг/день	№№ ссылок	Объем выборки мелатонин/контроль	Средняя разность	I ² , %	Z	p
внутрибрю- шинно	8	1–5	2	20/20	–1.96 [–3.09, –0.83]	0	3.40	0.0007
подкожно	2–4	0.5–2	2	28/30	–0.30 [–0.46, –0.14]	0	3.65	0.0003
с питьевой водой	2–16	0.04–10	9	133/133	–1.55 [–2.68, –0.43]	78	2.71	0.007
через зонд	8 и 12	4–20	3	24/24	1.72 [–1.53, 4.96]	81	1.03	0.30
перед и в тем- ную фазу	2–16	0.5–10	10	126/129	–1.41 [–2.25, –0.57]	81	3.29	0.001
Потребление воды на стандартной диете								
≤ 1 мг/кг/день	1–16	0.04–1	7	85/88	–1.29 [–2.48, –0.11]	71	2.13	0.03
2–6 мг/кг/день	9–15	2–4	3	32/32	–4.85 [–6.31, –3.40]	0	6.52	0.00001
≥ 10 мг/кг/ день	8–16	10–20	2	23/23	–0.16 [–1.63, 1.31]	51	0.22	0.83
с питьевой водой	2–16	0.2–10	8	106/107	–1.57 [–3.48, 0.35]	80	1.61	0.11
через зонд	8 и 12	4–20	2	14/14	–2.49 [–7.58, 2.60]	41	0.96	0.34
перед и в тем- ную фазу	2–16	0.5–10	9	108/111	–1.44 [–2.58, –0.30]	82	2.48	0.01
Лептин (нг/мл)								
≤ 1 мг/кг/день	2–12	0.04–1	5	47/50	–0.21 [–0.54, 0.12]	78	1.26	0.21
≥ 3 мг/кг/день	2–16	3–10	5	35/35	0.57 [–0.07, 1.21]	79	1.75	0.08

Таблица 3. Зависимость от дозы эффекта терапии мелатонином в течение 2 и 8 недель на прирост массы тела (г) у крыс, содержащихся на стандартной диете

Неделя терапии	Доза мелатонина	№№ ссылок	Объем выборки мелатонин/контроль	Средняя разность, г	I ² , %	Z	p	Тест на различия между субгруппами, p
2-я неделя	≤ 2 мг/кг/день	7	69/70	-6.55 [-12.24, -0.86]	71	2.25	0.02	0.07
2-я неделя	≥ 5 мг/кг/день	5	35/32	4.00 [-5.71, 13.71]	24	0.81	0.42	
8-я неделя	≤ 3 мг/кг/день	6	70/69	-33.15 [-55.07, -11.23]	92	2.96	0.003	0.55
8-я неделя	≥ 10 мг/кг/день	5	42/40	-22.68 [-49.42, 4.05]	91	1.66	0.10	

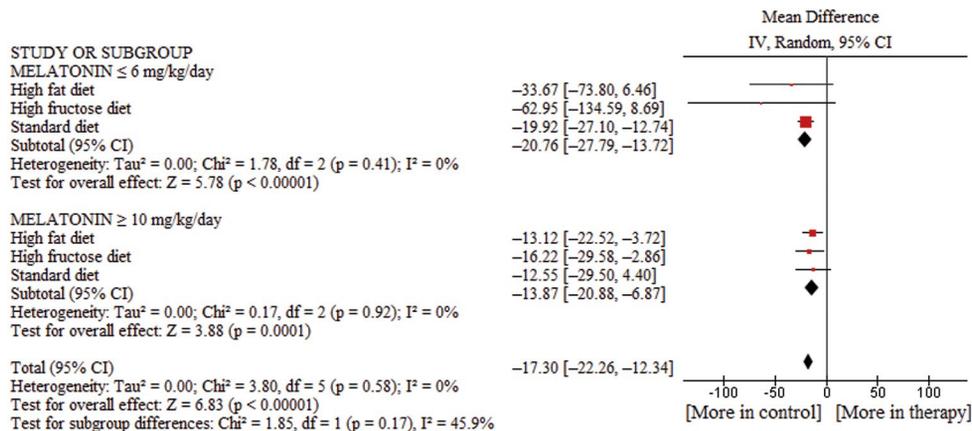


Рис. 3. Зависимость от дозы мелатонина снижения прироста массы (в граммах) у крыс при различных диетах. Метаанализ сделан без дополнительной стандартизации по способу и времени введения мелатонина.

По результатам одной работы [39] обогащение диеты фруктозой уменьшало потребление корма и увеличивало потребление воды, а терапия мелатонином не оказывала существенного влияния на эти показатели. В одной работе наблюдали дозозависимое уменьшение уровня лептина после 2 недель введения мелатонина [40] (рис. 4).

Диета, обогащенная жирами

Было отобрано 9 работ, в которых исследовались крысы, содержащиеся на диете, обогащенной различными пищевыми жирами. В 6 работах были представлены данные о ПМТ, в 4 – о количестве потребляемой пищи, в 2 – о количестве потребляемой воды, в 4 – об уровне лептина (табл. S). В 5 исследованиях [18, 26, 49, 50, 55] высокожировая

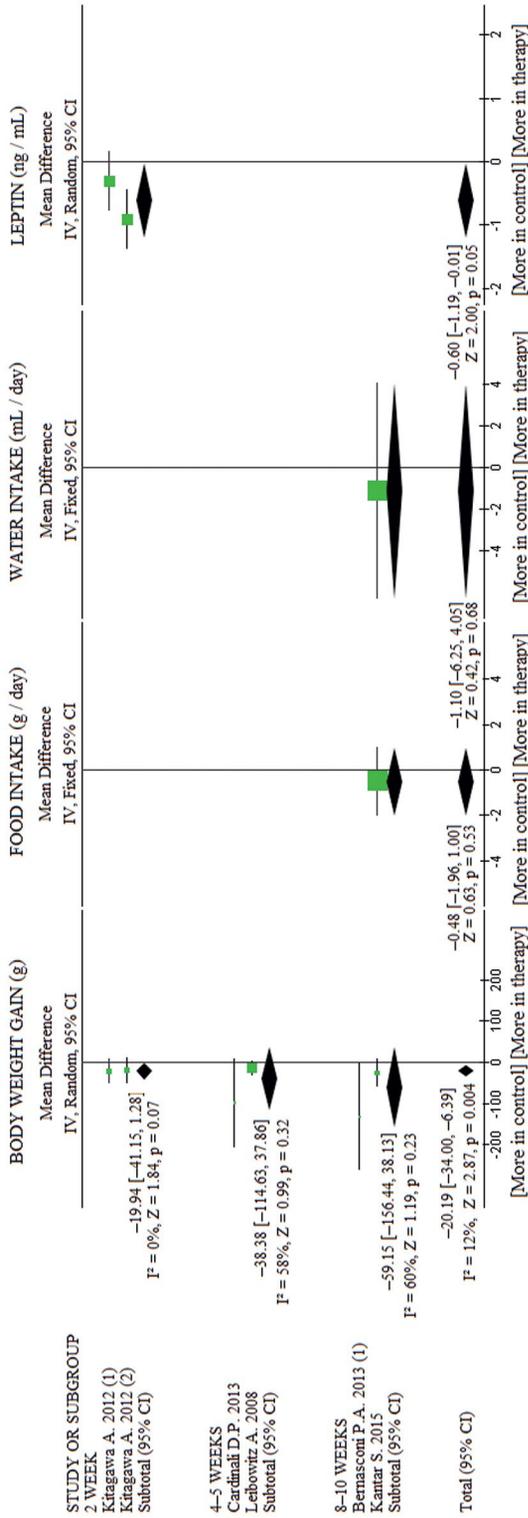


Рис. 4. Влияние терапии мелатонином на прирост массы тела, потребление корма и воды, уровень лептина у крыс, содержащихся на высокофруктозной диете. Метаанализ сделан без дополнительной стандартизации по дозе, способу и времени введения мелатонина.

диета и терапия мелатонином начинались одновременно, средняя масса тела крыс составляла к моменту начала введения мелатонина 290 ± 130 г. В других 4 исследованиях [33, 34, 58, 61] высокожировая диета начиналась за 4–12 недель до начала терапии и продолжалась во время терапии, средняя масса тела крыс составляла к моменту начала введения мелатонина 398 ± 202 г. Мелатонин вводился крысам в дозе 2–50 мг/кг/день в течение 2–12 недель. К 6–12 неделям ПМТ в контрольной группе был 109 ± 45 г, мелатонин снижал ПМТ в среднем на -29.70 [$-48.70, -10.70$] г ($I^2 = 93\%$, $Z = 3.06$, $p = 0.002$) (рис. 5), что составляло приблизительно 5.5% от массы тела крыс в контрольной группе (540 ± 238 г). Без учета продолжительности терапии увеличение дозы мелатонина не усиливало эффект терапии (рис. 3). Влияние способа и времени введения мелатонина на эффект терапии мы не исследовали из-за недостаточного количества работ.

У контрольных крыс, содержащихся на жирной диете, потребление пищи было 25.2 ± 16.9 г/день, воды – 30.8 ± 2.8 мл/день. По результатам 4 работ терапия мелатонином незначительно уменьшала потребление корма, но не воды (рис. 5). У крыс, содержащихся на жирной диете, уровень лептина имел разброс от 7 [18] до 21 нг/мл [55] (медиана – 19 нг/мл) и существенно снижался при введении мелатонина дольше 2 недель на -4.28 [$-8.04, -0.53$] нг/мл ($I^2 = 83\%$, $Z = 2.24$, $p = 0.03$) (рис. 5).

Была найдена всего одна работа [46], в которой исследовалось влияние мелатонина на ПМТ крыс, содержащихся на диете, обогащенной холестерином. Результаты этой работы показали, что мелатонин, вводимый в течение 3 недель в дозе 17 мг/кг/день внутривентриально, не изменял ПМТ у крыс при добавлении холестерина к стандартной диете. Данных одного исследования недостаточно для метаанализа и каких-либо выводов.

Нами было найдено слишком мало для проведения метаанализа публикаций, исследующих изменение уровня адипонектина и грелина при терапии мелатонином.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный нами метаанализ показал, что продолжительный прием мелатонина способствует уменьшению потребления корма и воды, а также значительному снижению ПМТ у крыс, содержащихся на стандартной диете. Кроме того, есть наблюдения, что терапия мелатонином увеличивала двигательную активность у крыс в ночное время, что также могло быть причиной уменьшения ПМТ [57, 60]. В начале терапии отмечался дозозависимый эффект мелатонина. Так, через 2 недели терапии мелатонин в дозе ≤ 2 мг/кг/день уменьшал ПМТ, а в дозе ≥ 5 мг/кг/день, наоборот, незначительно увеличивал. Через 8 недель терапии при любой дозе мелатонина наблюдалось уменьшение ПМТ. Интересно отметить, что наш предыдущий метаанализ показал, что через 2 недели терапии мелатонин в высоких дозах вызывает увеличение уровня триглицеридов, глюкозы и инсулина. Однако через 8 недель терапии этот эффект уже отсутствовал [10]. Также у людей уменьшение массы тела, индекса массы тела и окружности талии были существенными при низких дозах мелатонина, но не при высоких [15]. Кроме того, наш метаанализ показал, что эффект мелатонина по снижению ПМТ полностью отсутствовал при его внутривентриальном введении. Аналогично, по результатам ранее проведенного метаанализа [10], внутривентриальное введение мелатонина было ассоциировано с увеличением уровня триглицеридов и глюкозы при стандартной диете. По результатам наших метаанализов и по литературным данным доза, способ введения, определяющий биодоступность, а также циркадные изменения в метаболизме могут оказывать влияния на эффекты экзогенного мелатонина [10].

Известно, что ПМТ крыс зависит от возраста и исходной массы тела. Продолжительность жизни лабораторных крыс составляет в среднем 2–3 года, крысы могут уве-

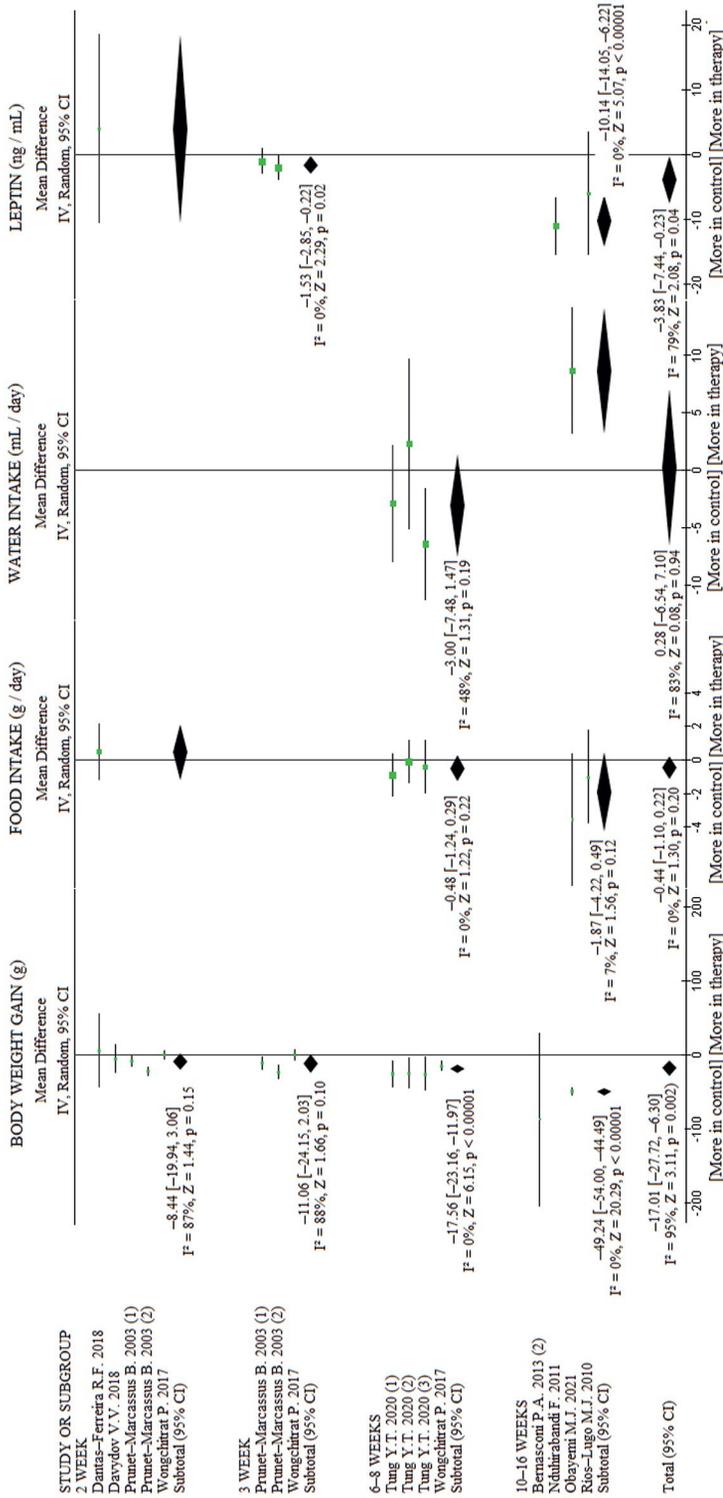


Рис. 5. Влияние терапии мелатонином на прирост массы тела, потребление корма и воды, уровень лептина у крыс, содержащихся на высокожировой диете. Метаанализ сделан без дополнительной стандартизации по дозе, способу и времени введения мелатонина.

личивать массу тела в среднем до 20–24-месячного возраста, затем масса тела остается постоянной или умеренно снижается. Самая высокая скорость ПМТ у крыс наблюдается до полового созревания (до 2 месяцев), затем скорость ПМТ хотя и снижается, но остается высокой до 5–6 месяцев, после 6 месяцев масса тела может увеличиться еще приблизительно на 25% [64]. Кроме того, с возрастом уменьшается уровень эндогенного мелатонина и плотность чувствительных к нему МТ-рецепторов, которая в экспериментах существенно увеличивалась при длительной терапии мелатонином [65, 66]. Проведенный нами метаанализ не показал влияния исходной массы тела крыс и возраста на ПМТ при терапии мелатонином. Мелатонин продолжал снижать ПМТ и у крыс 9–12-месячного возраста, у которых и в контрольной группе ПМТ был всего 19–41 г за 12 недель (у молодых крыс ПМТ составлял (44–215 г), т. е. у возрастных крыс длительный прием мелатонина уменьшал исходную массу тела [54, 60, 63]. По результатам двух исследований [27, 47] пол не влиял на эффекты мелатонина.

Диета, обогащенная фруктозой и жирами, вызывала увеличение массы тела крыс по сравнению с животными, содержащимися на стандартной диете. Терапия мелатонином снижала ПМТ крыс, содержащихся на диете с добавлением фруктозы или жиров. Эффект мелатонина на ПМТ при этих диетах был не больше, чем при стандартной диете, и не усиливался с увеличением дозы мелатонина. По данным отдельных исследований мелатонин существенно не изменял потребления корма и воды в условиях обогащения диеты фруктозой и жирами, но количества работ недостаточно для окончательного вывода. По результатам предыдущего метаанализа высокофруктозная диета увеличивала у крыс уровень триглицеридов, глюкозы и инсулина, высокожировая – уровень общего холестерина, триглицеридов и инсулина. Терапия мелатонином ослабляла вызванные диетами изменения в липидном профиле и концентрации инсулина, но не глюкозы [10].

Ожирение ассоциировано с повышением уровня лептина и инсулина, со снижением уровня грелина, адипонектина, обестатина, а также с резистентностью к инсулину, лептину и грелину, которая связана как с нарушением выработки гормонов, так и с изменением передачи сигналов в головном мозге [67–69]. При обогащении диеты фруктозой наблюдалось уменьшение уровня адипонектина и увеличение уровня лептина, а при обогащении жирами – увеличение уровня адипонектина и лептина. Терапия мелатонином ослабляла эти изменения [18, 40, 49, 55]. При этом мелатонин не оказывал влияния на уровень адипонектина и лептина у молодых крыс при стандартной диете, но мог изменить их циркадные профили [55]. Однако старение крыс было ассоциировано с увеличением уровня лептина, который нормализовался после терапии мелатонином [54, 56]. По результатам отдельных исследований мелатонин не изменял или слегка снижал уровень грелина и обестатина у крыс на стандартной диете, но повышал уровень обестатина, сниженный жирной диетой [32, 50, 70]. Интересно отметить, что мелатонин в большей степени снижал экспрессию гена *POMC* (участвует в синтезе меланотропина, играющего важную роль в регуляции аппетита) в гипоталамусе крыс, содержащихся на стандартной диете, чем крыс, потребляющих жирную диету [71]. При этом экспрессия гена *rNPY* (участвует в синтезе нейропептида Y, увеличение количества которого ассоциировано с увеличением потребления пищи) и *leptin-R* была более чувствительна к мелатонину у крыс, содержащихся на жирной диете [71]. Однако экспрессия инсулиновых рецепторов в гипоталамусе была чувствительна к мелатонину и при стандартной, и при жирной диете [71]. Установлено, что длительный прием мелатонина угнетает синтез инсулина при любой диете [10].

В адипоцитах были обнаружены МТ1- и МТ2-рецепторы [16]. Известно, что мелатонин через МТ2-рецепторы может в значительной степени индуцировать липолиз адипоцитов, усиливать экспрессию липолитических генов и белков, увеличивать дыхательную способность клеток и запускать дифференцировку в сторону генов бе-

жевого фенотипа [16]. Мелатонин стимулирует МТ1-рецепторы нейронов супрахиазматического ядра гипоталамуса, увеличивая экспрессию генов UCP1, PPAR γ , PGC1, VAT и способствуя функции бурой жировой ткани при недрожательном термогенезе [16]. В экспериментах на хомяках (вид с четко выраженной сезонностью в функционировании организма) было показано увеличение массы бурого жира при коротком фотопериоде или при терапии мелатонином [72]. Образование бурого жира наиболее интенсивно происходит в условиях гипотермии [73]. Известно, что бурый жир участвует в термогенезе и за счет этого быстрее утилизируется. Однако в нормотермических условиях Prunet-Marcassus и соавт. наблюдали у крыс, содержащихся на жирной диете, уменьшение массы как белого, так и бурого жира после трехнедельной терапии мелатонином [18]. При этом удаление пинеальной железы увеличивало массу и бурого, и белого жира [18]. Мы не исследовали с помощью метаанализа влияние терапии мелатонином на количество жира, поскольку разные авторы по-разному считали и отображали эти данные. В целом мелатонин либо не изменял, либо уменьшал массу внутренних жировых отложений у крыс. Так, при стандартной диете по результатам одних исследований терапия мелатонином не изменяла количества общего, периферического, эпидидимального и интраперитонеального жира [27, 35, 60], по результатам других – существенно уменьшала [40, 54, 59, 63]. У крыс, содержащихся на диете с добавлением фруктозы, 2- и 6-недельное введение мелатонина снижало массу жировых отложений [40, 74]. При жирной диете по данным [18, 34, 61] мелатонин незначительно уменьшал или не изменял общее количество жира, а по данным [49, 58] наблюдалось значительное уменьшение массы эпидидимального и висцерального жира.

Интересно отметить, что при стандартной диете внутрибрюшинное введение мелатонина не снижало ПМТ, но по наблюдениям [40] уменьшало количество интраабдоминального жира, однако период наблюдений составлял всего 2 недели. Тем не менее нельзя исключить, что именно гиперстимуляция мелатонинергических (MT) рецепторов адипоцитов висцерального жира при внутрибрюшинном введении мелатонина может быть причиной отсутствия снижения ПМТ. Было показано, что дифференцировка клеток жировой ткани зависит от дозы и продолжительности воздействия мелатонина [75, 76]. Кроме того, наличие механического травмирования при внутрибрюшинном введении препаратов может стимулировать разрастание соединительной ткани, а также вызывать эмоциональный стресс. Однако в поведенческих тестах были показаны анксиолитический и антидепрессивный эффекты продолжительной терапии мелатонином при его внутрибрюшинном введении [37, 77, 78]. Также снижение ПМТ отсутствовало при введении мелатонина в течение 4 недель с помощью подкожной помпы [47], при использовании которой исключается постоянное механическое травмирование. Возможно, что эффекты мелатонина, связанные со снижением аппетита и ПМТ, реализуются через МТ-рецепторы желудочно-кишечного тракта, которые в большей степени стимулируются при оральном приеме препарата, чем при внутрибрюшинном и подкожном. Известно, что после еды уровень мелатонина в желудочно-кишечном тракте резко увеличивается, и оральный прием мелатонина может имитировать насыщение и снижать аппетит [79], но по результатам нашего метаанализа внутрибрюшинное введение мелатонина также снижало количество потребляемой пищи у крыс. В зависимости от дозы экзогенный мелатонин может как стимулировать, так и тормозить процесс пищеварения и перистальтику, причем более высокие дозы мелатонина ассоциированы с замедлением пищеварения [79, 80]. Кроме того, есть сообщения об отрицательном влиянии мелатонина на кишечную микрофлору и воспаление [81]. Среди побочных эффектов мелатонина в инструкциях к препарату перечисляют тошноту, потерю аппетита, диарею. Следует учесть, что экспрессия и аффинность МТ-рецепторов может изменяться при высококалорийных диетах [10]. По результатам отдельных исследований внутрибрюшинное введение мелатонина при высокофруктозной диете существенно не уменьшало ПМТ, но снижало количество жира [40], уровень триглице-

ридов, холестерина и инсулина [10]; а при высокожировой диете после 5–6-недельной терапии наблюдалось уменьшение ПМТ, триглицеридов, холестерина, но не количества жира [61, 82].

Известно, что на ПМТ оказывает большое влияние уровень гормонов щитовидной железы и коры надпочечников, однако вопрос изменения этих показателей после терапии мелатонином остается открытым. Ряд исследований сообщает о понижении у крыс уровня тиреоидных гормонов и кортикостерона после 4–5 недель введения мелатонина [6, 7, 83, 84], но эффект более длительной терапии мог быть обратным [27, 44]. По результатам работы [85] мелатонин нормализовал уровень кортикостерона, повышенный при высокоуглеводной диете, но не оказывал эффекта при высокожировой диете [86]. У здоровых людей прием мелатонина в течение 4 недель не изменял уровня тиреоидных гормонов и кортизола [87].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге, несмотря на то, что мелатонин уменьшает показатели липидного профиля [10] и концентрацию лептина у крыс, содержащихся на диетах с добавлением фруктозы и жиров, но не на стандартной диете, терапия мелатонином препятствует набору массы тела крыс при любой диете. Кроме того, мелатонин слегка уменьшает потребление пищи и воды. При этом увеличение дозы мелатонина не способствует усилению его эффекта по снижению ПМТ и улучшению показателей липидного и углеводного обмена [10]. Мелатонин не снижает ПМТ при стандартной диете, если вводится внутривентриально. По всей видимости, в уменьшении ПМТ мелатонином задействованы более широкие механизмы, чем при модуляции углеводного и липидного обмена.

Результаты нашего предыдущего [10] и настоящего исследований показывают, что мелатонин может быть полезен при вызванных диетой метаболических нарушениях, поскольку длительный прием мелатонина улучшает показатели липидного профиля и препятствует набору массы тела. Однако снижение аппетита и ПМТ при пероральном приеме мелатонина может быть связано, в том числе, с отрицательными побочными эффектами препарата, что нуждается в дальнейших исследованиях. На наш взгляд, стоит задуматься о физиологичности перорального приема мелатонина, особенно при нарушениях сна. Возможно, другие способы введения мелатонина, например, сублингвальный, трансдермальный, интраназальный [88, 89] будут не менее эффективны и не будут вызывать побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Концепция работы – Н. В. К. и М. Г. П., подбор литературы и проведение метаанализа Н. В. К. и М. Г. П., написание и редактирование текста – Н. В. К., В. А. Ц. и М. М. Г., подготовка иллюстраций – Н. В. К.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственного задания № 056–00119–22–00. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ* (2014) Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71 (16): 2997–3025.
<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
2. *Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, Dupré SM, Loudon AS, Lincoln GA, Hazlerigg DG* (2010) A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* 20 (24): 2193–2198.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.048>
3. *Ebling FJ* (2014) On the value of seasonal mammals for identifying mechanisms underlying the control of food intake and body weight. *Horm Behav* 66 (1): 56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.03.009>
4. *Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D* (2003) Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. *Endocr Regul* 37(3): 163–174.
https://www.sav.sk/journals/endo/full/2003/2003_03d.pdf
5. *Ahmed HH, Manna F, Elmegeed GA, Doss SH* (2005) Cardioprotective activity of melatonin and its novel synthesized derivatives on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Bioorg Med Chem* 13 (5): 1847–1857.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.066>
6. *Benova T, Vicenzova C, Radosinska J, Bacova B, Knezl V, Dosenko V, Weismann P, Zeman M, Navarova J, Tribulova N* (2013) Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias. *Can J Physiol Pharmacol* 91 (8): 633–639.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0393>
7. *Baltaci AK, Mogulkoc R, Kul A, Bediz CS, Ugur A* (2004) Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats. *Toxicology* 195 (1): 69–75.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.09.001>
8. *Ozturk G, Coşkun S, Erbaş D, Hasanoglu E* (2000) The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *Jpn J Physiol* 50 (1): 149–153.
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.50>
9. *Виноградова ИА* (2009) Влияние препаратов «мелатонин» и «эпиталон» на возрастную динамику тиреотропной активности гипофиза и функции щитовидной железы в разных световых режимах. *Успехи геронтол* 22 (4): 631–638. [*Vinogradova IA* (2009) Effect of preparations melatonin and epitalon on the age-related dynamics of thyrotrophic activity of the hypophysis and thyroid gland function in different light regimes. *Adv Gerontol* 22(4): 631–638. (In Russ)].
10. *Kuzmenko NV, Tsyrlin VA, Pliss MG* (2023) Meta-analysis of experimental studies of diet-dependent effects of melatonin monotherapy on circulatory levels of triglycerides, cholesterol, glucose and insulin in rats. *J Evol Biochem Physiol* 59 (1): 213–231.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010180>
11. *Mohammadi-Sartang M, Ghorbani M, Mazloom Z* (2018) Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 37 (6 Pt A): 1943–1954.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.11.003>
12. *Loloëi S, Sepidarkish M, Heydarian A, Tahvilian N, Khazdouz M, Heshmati J, Pouraram H* (2019) The effect of melatonin supplementation on lipid profile and anthropometric indices: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes Metab Syndr* 13 (3): 1901–1910.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.04.043>
13. *Lauritzen ES, Kampmann U, Smedegaard SB, Støyt J* (2021) Effects of daily administration of melatonin before bedtime on fasting insulin, glucose and insulin sensitivity in healthy adults and patients with metabolic diseases. A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 95 (5): 691–701.
<https://doi.org/10.1111/cen.14576>
14. *Delpino FM, Figueiredo LM, Nunes BP* (2021) Effects of melatonin supplementation on diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Nutr* 40 (7): 4595–4605.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.06.007>
15. *Delpino FM, Figueiredo LM* (2021) Melatonin supplementation and anthropometric indicators of obesity: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 91–92: 111399.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111399>

16. *Guan Q, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y* (2021) Mechanisms of Melatonin in Obesity: A Review. *Int J Mol Sci* 23(1): 218.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010218>
17. *Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Ma S* (2012) Obesity and metabolic syndrome: association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Ann Med* 44(6): 564–577.
<https://doi.org/10.3109/07853890.2011.586365>
18. *Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrance P, Renard P, Casteilla L, Pénicaud L* (2003) Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144(12): 5347–5352.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0693>
19. *Wang Y, Liu X, Wang W, Song W, Chen L, Fang Q, Yan X* (2013) The expression of inflammatory cytokines on the aorta endothelia are up-regulated in pinealectomized rats. *Inflammation* 36 (6): 1363–1373.
<https://doi.org/10.1007/s10753-013-9676-1>
20. *Suriagandhi V, Nachiappan V* (2022) Protective Effects of Melatonin against Obesity-Induced by Leptin Resistance. *Behav Brain Res* 417: 113598.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113598>
21. *Kim M, Lee SM, Jung J, Kim YJ, Moon KC, Seo JH, Ha TK, Ha E* (2020) Pinealectomy increases thermogenesis and decreases lipogenesis. *Mol Med Rep* 22(5): 4289–4297.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11534>
22. *Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR* (2009) Introduction to Meta-analysis. Wiley, Chichester.
23. *Almabhouh FA, Singh HJ* (2018) Adverse effects of leptin on histone-to-protamine transition during spermatogenesis are prevented by melatonin in Sprague-Dawley rats. *Andrologia* 50(1).
<https://doi.org/10.1111/and.12814>
24. *Aoyama H, Mori N, Mori W* (1987) Anti-glucocorticoid effects of melatonin on adult rats. *Acta Pathol Jpn* 37(7): 1143–1148.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1987.tb00431.x>
25. *Bashandy SAE, Ebaid H, Al-Tamimi J, Ahmed-Farid OA, Omara EA, Alhazza IM* (2021) Melatonin Alleviated Potassium Dichromate-Induced Oxidative Stress and Reprotoxicity in Male Rats. *Biomed Res Int* 2021: 3565360.
<https://doi.org/10.1155/2021/3565360>
26. *Bernasconi PA, Cardoso NP, Reynoso R, Scacchi P, Cardinali DP* (2013) Melatonin and diet-induced metabolic syndrome in rats: impact on the hypophysial-testicular axis. *Horm Mol Biol Clin Investig* 16(2): 101–112.
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0005>
27. *Bojková B, Orendás P, Friedmanová L, Kassayová M, Datelinka I, Ahlersová E, Ahlers I* (2008) Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. *Acta Physiol Hung* 95(1): 65–76.
<https://doi.org/10.1556/APhysiol.95.2008.4>
28. *Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N, Ustündag N* (2003) Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res* 35(3): 212–220.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2003.00082.x>
29. *Canpolat S, Sandal S, Yılmaz B, Yasar A, Kutlu S, Baydas G, Kelestimur H* (2001) Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol* 428(1): 145–148.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01230-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01230-4)
30. *Canpolat S, Aydin M, Yasar A, Colakoglu N, Yılmaz B, Kelestimur H* (2006) Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on immunohistochemical ghrelin staining of arcuate nucleus and serum ghrelin levels in the rat. *Neurosci Lett* 410(2): 132–136.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.071>
31. *Cardinali DP, Bernasconi PA, Reynoso R, Toso CF, Scacchi P* (2013) Melatonin may curtail the metabolic syndrome: studies on initial and fully established fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Int J Mol Sci* 14(2): 2502–2514.
<https://doi.org/10.3390/ijms14022502>
32. *Chuffa LG, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci BA, Pinheiro PF, Seiva FR, Novelli EL, Mello Junior W, Martinez M, Martinez FE* (2011) Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. *Braz J Med Biol Res* 44(3): 217–223.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500018>

33. *Dantas-Ferreira RF, Raingard H, Dumont S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Pevet P, Challet E* (2018) Melatonin potentiates the effects of metformin on glucose metabolism and food intake in high-fat-fed rats. *Endocrinol Diabetes Metab* 1(4): e00039. <https://doi.org/10.1002/edm2.39>
34. *Давыдов ВВ, Медведев ДВ, Шодиев ДР, Некрасова МС* (2018) Влияние экзогенного мелатонина на оксидативный статус и состояние перекисного окисления белков у крыс с моделью алиментарного ожирения. *Ожирение и метаболизм* 15(4): 15–21. [*Davydov VV, Medvedev DV, Shodiev DR, Nekrasova MS* (2018) Influence of exogenous melatonin on the oxidative status and the state of peroxidation of proteins in a rat model of alimentary obesity. *Obesity and Metabolism* 15(4): 15–21. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/omet9561>
35. *Dhanabalan K, Mzezewa S, Huisamen B, Lochner A* (2020) Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Function and Mitophagy in Ischaemic/Reperused Hearts from Control and High-Fat Diet Rats: Effects of Long-Term Melatonin Treatment. *Cardiovasc Drugs Ther* 34(6): 799–811. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-06997-9>
36. *Djordjevic B, Cvetkovic T, Stoimenov TJ, Despotovic M, Zivanovic S, Basic J, Veljkovic A, Velickov A, Kocic G, Pavlovic D, Sokolovic D* (2018) Oral supplementation with melatonin reduces oxidative damage and concentrations of inducible nitric oxide synthase, VEGF and matrix metalloproteinase 9 in the retina of rats with streptozotocin/nicotinamide induced pre-diabetes. *Eur J Pharmacol* 833: 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.011>
37. *Ergenc M, Ozacmak HS, Turan I, Ozacmak VH* (2022) Melatonin reverses depressive and anxiety like-behaviours induced by diabetes: involvement of oxidative stress, age, rage and S100B levels in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. *Arch Physiol Biochem* 128(2): 402–410. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1684954>
38. *Kadry SM, El-Dakdoky MH, Haggag NZ, Rashed LA, Hassen MT* (2018) Melatonin improves the therapeutic role of mesenchymal stem cells in diabetic rats. *Toxicol Mech Methods* 28(7): 529–538. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1471634>
39. *Kantar Ş, Türközkan N, Bircan FS, Paşaoğlu ÖT* (2015) Beneficial effects of melatonin on serum nitric oxide, homocysteine, and ADMA levels in fructose-fed rats. *Pharm Biol* 53(7): 1035–1041. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.957782>
40. *Kitagawa A, Ohta Y, Ohashi K* (2012) Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *J Pineal Res* 52(4): 403–413. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00955.x>
41. *Korkmaz GG, Uzun H, Cakatay U, Aydin S* (2012) Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clin Invest Med* 35(6): E370–E377. <https://doi.org/10.25011/cim.v35i6.19209>
42. *Leibowitz A, Peleg E, Sharabi Y, Shabtai Z, Shamiss A, Grossman E* (2008) The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 21(3): 348–351. <https://doi.org/10.1038/ajh.2007.60>
43. *Mendes C, Lopes AM, do Amaral FG, Peliciari-Garcia RA, Turati Ade O, Hirabara SM, Scialfa Falcão JH, Cipolla-Neto J* (2013) Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *J Pineal Res* 55(3): 229–239. <https://doi.org/10.1111/jpi.12065>
44. *Mirunalini S, Subramanian P* (2005) Temporal oscillations of thyroid hormones in long-term melatonin treated rats. *Pharmazie* 60(1): 52–56.
45. *Montano ME, Molpeceres Y, Mauriz JL, Garzo E, Cruz IB, González P, Barrio JP* (2010) Effect of melatonin supplementation on food and water intake in streptozotocin-diabetic and non-diabetic male Wistar rats. *Nutr Hosp* 25(6): 931–938.
46. *Mori N, Aoyama H, Murase T, Mori W* (1989) Anti-hypercholesterolemic effect of melatonin in rats. *Acta Pathol Jpn* 39(10): 613–618. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1989.tb02407.x>
47. *Mustonen AM, Nieminen P, Hyvärinen H* (2002) Effects of continuous light and melatonin treatment on energy metabolism of the rat. *J Endocrinol Invest* 25(8): 716–723. <https://doi.org/10.1007/BF03345106>
48. *Nasiraei-Moghadam SN, Parivar K, Ahmadiani A, Movahhedin M, Vaez Mahdavi MR* (2014) Protective Effect of Melatonin against Inequality-Induced Damages on Testicular Tissue and Sperm Parameters. *Int J Fertil Steril* 7(4): 313–322.
49. *Nduhirabandi F, Du Toit EF, Blackhurst D, Marais D, Lochner A* (2011) Chronic melatonin consumption prevents obesity-related metabolic abnormalities and protects the heart against

- myocardial ischemia and reperfusion injury in a prediabetic model of diet-induced obesity. *J Pineal Res* 50(2): 171–182.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00826.x>
50. *Obayemi MJ, Akintayo CO, Oniyide AA, Aturamu A, Badejogbin OC, Atuma CL, Saidi AO, Mahmud H, Olaniyi KS* (2021) Protective role of melatonin against adipose-hepatic metabolic comorbidities in experimentally induced obese rat model. *PLoS One* 16(12): e0260546.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260546>
 51. *Paskaloglu K, Sener G, Ayangolu-Dülger G* (2004) Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 499(3): 345–354.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.08.002>
 52. *Peschke E, Schucht H, Mühlbauer E* (2010) Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res* 49(4): 373–381.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00804.x>
 53. *Promyo K, Iqbal F, Chaidee N, Chetsawang B* (2020) Aluminum chloride-induced amyloid β accumulation and endoplasmic reticulum stress in rat brain are averted by melatonin. *Food Chem Toxicol* 146: 111829.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111829>
 54. *Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD* (2003) Melatonin effects on metabolism independent of gonad function. *Endocrine* 21(2): 169–173.
<https://doi.org/10.1385/ENDO:21:2:169>
 55. *Ríos-Lugo MJ, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, Esquifino AI* (2010) Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J Pineal Res* 49(4): 342–348.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00798.x>
 56. *Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM* (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140(2): 1009–1012.
<https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6674>
 57. *Terrón MP, Delgado-Adámez J, Pariente JA, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB* (2013) Melatonin reduces body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats. *Physiol Behav* 118: 8–13.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.04.006>
 58. *Tung YT, Chiang PC, Chen YL, Chien YW* (2020) Effects of Melatonin on Lipid Metabolism and Circulating Irisin in Sprague-Dawley Rats with Diet-Induced Obesity. *Molecules* 25(15): 3329.
<https://doi.org/10.3390/molecules25153329>
 59. *Wang L, McFadden JW, Yang G, Zhu H, Lian H, Fu T, Sun Y, Gao T, Li M* (2021) Effect of melatonin on visceral fat deposition, lipid metabolism and hepatic lipo-metabolic gene expression in male rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 105(4): 787–796.
<https://doi.org/10.1111/jpn.13497>
 60. *Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD* (2000) Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 141(2): 487–497.
<https://doi.org/10.1210/endo.141.2.7311>
 61. *Wongchitrat P, Klosen P, Pannengpetch S, Kitidee K, Govitrapong P, Isarankura-Na-Ayudhya C* (2017) High-fat diet-induced plasma protein and liver changes in obese rats can be attenuated by melatonin supplementation. *Nutr Res* 42: 51–63.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.011>
 62. *Xu MF, Ho S, Qian ZM, Tang PL* (2001) Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin in rat. *J Pineal Res* 31(4): 301–307.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.310403.x>
 63. *Zanuto R, Siqueira-Filho MA, Caperuto LC, Bacurau RF, Hirata E, Peliciari-Garcia RA, do Amaral FG, Marçal AC, Ribeiro LM, Camporez JP, Carpinelli AR, Bordin S, Cipolla-Neto J, Carvalho CR* (2013) Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *J Pineal Res* 55(2): 156–165.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12056>
 64. *Ghasemi A, Jeddi S, Kashfi K* (2021) The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI J* 20: 1431–1445.
<https://doi.org/10.17179/excli2021-4072>

65. *Laudon M, Nir I, Zisapel N* (1988) Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 48(6): 577–583.
<https://doi.org/10.1159/000125066>
66. *Jenwittheesuk A, Boontem P, Wongchitrat P, Tocharus J, Mukda S, Govitrapong P* (2017) Melatonin regulates the aging mouse hippocampal homeostasis via the sirtuin1–FOXO1 pathway. *EXCLI J* 16: 340–353.
<https://doi.org/10.17179/excli2016-852>
67. *Cui H, López M, Rahmouni K* (2017) The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 13(6): 338–351.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
68. *Yazıcı D, Sezer H* (2017) Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 960: 277–304.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_12
69. *Landeche MF, Tuero C, Valentí V, Bilbao I, de la Higuera M, Frühbeck G* (2019) Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk. *Nutrients* 11(11): 2664.
<https://doi.org/10.3390/nu11112664>
70. *Mustonen AM, Nieminen P, Hyvärinen H* (2001) Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels. *Endocrine* 16(1): 434–436.
<https://doi.org/10.1385/ENDO:16:1:43>
71. *Ríos-Lugo MJ, Jiménez-Ortega V, Cano-Barquilla P, Mateos PF, Spinedi EJ, Cardinali DP, Esquifino AI* (2015) Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats. *Horm Mol Biol Clin Invest* 21(3): 175–183.
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0041>
72. *Viswanathan M, Hissa R, George JC* (1986) Effects of short photoperiod and melatonin treatment on thermogenesis in the Syrian hamster. *J Pineal Res* 3(4): 311–321.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1986.tb00754.x>
73. *Deveci D, Egginton S* (2007) Effects of acute and chronic cooling on cardiorespiratory depression in rodents. *J Physiol Sci* 57(1): 73–79.
<https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP005906>
74. *Ewida SF, Al-Sharakly DR* (2016) Implication of Renal Aquaporin-3 in Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Melatonin Protection. *J Clin Diagn Res* 10(4): CF06–CF11.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18362.7656>
75. *Gao XY, Deng BH, Li XR, Wang Y, Zhang JX, Hao XY, Zhao JX* (2021) Melatonin Regulates Differentiation of Sheep Brown Adipocyte Precursor Cells Via AMP-Activated Protein Kinase. *Front Vet Sci* 8: 661773.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.661773>
76. *Zaminy A, Kashani IR, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Vardasbi S, Shokrgozar MA* (2008) Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cells. *Indian J Plast Surg* 41(1): 8–14.
<https://doi.org/10.4103/0970-0358.41104>
77. *Bassani TB, Gradowski RW, Zaminelli T, Barbiero JK, Santiago RM, Boschen SL, da Cunha C, Lima MM, Adreatini R, Vital MA* (2014) Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain Res* 1593: 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.068>
78. *Allagui MS, Feriani A, Saoudi M, Badraoui R, Bouoni Z, Nciri R, Murat JC, Elfeki A* (2014) Effects of melatonin on aluminium-induced neurobehavioral and neurochemical changes in aging rats. *Food Chem Toxicol* 70: 84–93.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.043>
79. *Bubenik GA* (2002) Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 47(10): 2336–2348.
<https://doi.org/10.1023/a:1020107915919>
80. *Siah KT, Wong RK, Ho KY* (2014) Melatonin for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20(10): 2492–2498.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2492>
81. *Da Silva JL, Barbosa LV, Pinzan CF, Nardini V, Brigo IS, Sebastião CA, Elias-Oliveira J, Brazão V, Júnior JCDP, Carlos D, Cardoso CRB* (2023) The Microbiota-Dependent Worsening Effects of Melatonin on Gut Inflammation. *Microorganisms* 11(2): 460.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11020460>
82. *Khalil SS, Aziz JA, Ismail KA, El-Malkey NF* (2021) Comparative protective effects of N-acetylcysteine and melatonin against obesity-induced testicular dysfunction in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 99 (7): 708–719.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0499>

83. *Jiménez-Ortega V, Cano Barquilla P, Fernández-Mateos P, Cardinali DP, Esquifino AI* (2012) Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin. *Free Radic Biol Med* 53(12): 2287–2297. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.533>
84. *Kinson GA, MacDonald NE, Liu CC* (1973) The effects of melatonin and serotonin on blood flow fraction and testosterone metabolism in selected organs of the male rat. *Can J Physiol Pharmacol* 51(5): 313–318. <https://doi.org/10.1139/y73-047>
85. *Mercau ME, Calanni JS, Aranda ML, Caldarelli LJ, Rosenstein RE, Repetto EM, Cymeryng CB* (2019) Melatonin prevents early pituitary dysfunction induced by sucrose-rich diets. *J Pineal Res* 66(2): e12545. <https://doi.org/10.1111/jpi.12545>
86. *Zhou J, Wang D, Luo X, Jia X, Li M, Laudon M, Zhang R, Jia Z* (2018) Melatonin Receptor Agonist Piromelatine Ameliorates Impaired Glucose Metabolism in Chronically Stressed Rats Fed a High-Fat Diet. *J Pharmacol Exp Ther* 364(1): 55–69. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.243998>
87. *Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR Jr, Tufik S* (2000) Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res* 29(4): 193–200. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0633.2002.290401.x>
88. *Zetner D, Andersen LP, Rosenberg J* (2016) Pharmacokinetics of Alternative Administration Routes of Melatonin: A Systematic Review. *Drug Res (Stuttg)* 66(4): 169–173. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565083>
89. *Ait Abdellah S, Raverot V, Gal C, Guinobert I, Bardot V, Blondeau C, Claustrat B* (2023) Bioavailability of Melatonin after Administration of an Oral Prolonged-Release Tablet and an Immediate-Release Sublingual Spray in Healthy Male Volunteers. *Drugs R D* 23(3): 257–265. <https://doi.org/10.1007/s40268-023-00431-9>

Meta-Analysis of Experimental Studies of the Effect of Melatonin Monotherapy on Body Weight Gain and Eating Behavior in Rats on Different Diets

N. V. Kuzmenko^{a, b, *}, V. A. Tsyrlin^a, M. G. Pliss^{a, b}, and M. M. Galagudza^a

^aAlmazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

^bFirst Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, Russia

*e-mail: nat.kuzmencko2011@yandex.ru

In an earlier meta-analysis, we showed that long-term melatonin administration minimizes diet-induced changes in lipid profiles. The purpose of our present work was to use a meta-analysis to investigate the effect of melatonin monotherapy on body weight gain (BWG) and eating behavior in rats depending on diet. To this end, we conducted a meta-analysis of 43 publications examining the effects of melatonin monotherapy on BWG, leptin levels, food and water intake in rats fed a standard diet (37 publications), as well as high-fructose diets (5 publications) and fats (9 publications). Our findings suggest that although melatonin reduced the level of triglycerides, total cholesterol and leptin in rats fed high-fructose and high-fat diets but not those fed a standard diet, melatonin treatment prevented BWG in rats on either diet. Increasing the dose of melatonin did not enhance the effect of therapy with any of the diets studied. We did not obtain convincing evidence that the effect of melatonin depends on the initial body weight and age of rats. On a standard diet, melatonin has been found to reduce food and water intake. Melatonin did not reduce BWG with a standard diet when administered intraperitoneally. Our research suggests that melatonin may be beneficial for diet-induced metabolic disorders by improving lipid profiles and preventing BWG. However, a decrease in appetite and BWG when taking melatonin may also be associated with negative side effects of the drug, which requires further research.

Keywords: melatonin, body weight gain, leptin, diet, appetite, fructose, fat

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Табл. S. Публикации, отобранные для метаанализа

Публикация	Доза, способ и продолжительность введения	Световой режим день/ночь	Линии и модели	Возраст крыс, мес	Исходная средняя масса, г	Объем вы-борки опыг/контроль	Параметры
Ahmed H.H. 2005 [5]	5 мг/кг/день, внутривентриально, 10 дней	12 / 12	Sprague-Dawley	взрос.	200–250	6 / 6 *	лептин
Almabhouh F.A. 2018 [23]	10 мг/кг/день, с питьевой водой, 6 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley	3	344	6 / 6 *	ПМТ
Aoyama H. 1987 [24]	5 мг/крыса/день (20 мг/кг/день), внутривентриально, 11 нед.	–	Wistar	2	185	6 / 6	ПМТ
Bashandy S.A.E. 2021 [25]	5 мг/кг/день, перорально (перед темной фазой), 8 нед.	12 / 12	Wistar	3	157	8 / 8	ПМТ
Bemasconi P.A. 2013 (1) [26]	25 мкг/мл (3 мг/кг/день), с питьевой водой, 10 нед.	12 / 12	Wistar и MC (фруктоза 10% p-p)	2	258	8 / 8 *	ПМТ
Bemasconi P.A. 2013 (2) [26]	25 мкг/мл (3 мг/кг/день), с питьевой водой, 10 нед.	12 / 12	Wistar MC (диета 35% жира)	2	268	8 / 8 *	ПМТ
Vojková B. 2008 [27]	0.5 мг/кг/день, с питьевой водой (15:00–8:00), 11 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley (самцы и самки)	6	361	18 / 19	ПК, ПВ, лептин, Ж
Sam M. 2003 [28]	0.2 мг/кг/день, внутривентриально (в 9:00), 4 нед.	12 / 12	Wistar	взрос.	233	7 / 6	ПМТ
Sanpolat S. 2001 [29]	0.5 мг/кг/день, подкожно, 7 дней	12 / 12	Wistar	взрос.	275	8 / 10	лептин

Продолжение табл. 5

Публикация	Доза, способ и продолжительность введения	Световой режим день/ночь	Линии и модели	Возраст крыс, мес	Исходная средняя масса, г	Объем вы- борки опыг/ контроль	Параметры
Caprolat S. 2006 [30]	0.5 мг/кг/день, подкожно (17:00), 12 дней	12 / 12	Sprague-Dawley	взрос.	275	8 / 10	ПМТ, ПК, ПВ
Cardinali D.P. 2013 [31]	25 мкг/мл (3 мг/кг/день), с питьевой водой, 8 нед.	12 / 12	Wistar и MC (фруктоза 10% р-р)	2	273	8 / 8 *	ПМТ
Chuffa L.G. 2011 [32]	1 мг/кг/день, внутривентриально (18:30–19:00), 8 нед.	12 / 12	Rattus norvegicus albinus (самки)	3	257	12 / 12 *	ПМТ, ПК, ПВ
Dantas-Ferreira R.F. 2018 [33]	10 мг/кг/день, внутривенно (перед темной фазой), 2 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley (диета 75% жира)	4	530	8 / 8	ПМТ, ПК, лептин
Davudov V.V. 2018 [34]	2 мг/кг/день, орально через зонд (13:00–18:00), 2 нед.	–	Wistar (диета 25% жира)	взрос.	355	9 / 9	ПМТ, Ж
Dhanabalan K. 2020 [35]	10 мг/кг/день, с питьевой водой (в темную фазу), 16 нед.	–	Wistar	1	370	15 / 15	ПК, ПВ, Ж
Djordjevic B. 2018 [36]	0.2 мг/кг/день, с питьевой водой, 2 нед.	12 / 12	Wistar	2.5	358	8 / 8 *	ПМТ, ПК, ПВ
Ergenc M. 2022 [37]	10 мг/кг/день, внутривентриально, 4 нед.	12 / 12	Wistar	3	373	8 / 8	ПМТ

Продолжение табл. 5

Публикация	Доза, способ и продолжительность введения	Световой режим день/ночь	Линии и модели	Возраст крыс, мес	Исходная средняя масса, г	Объем вы- борки опыг/ контроль	Параметры
Kadry S.M. 2018 [38]	10 мг/кг/день, через зонд, 8 нед.	12 / 12	Белые лаборат.	2	140	6 / 6	ПМТ
Kantar S. 2015 [39]	20 мг/кг/день, через зонд, 8 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley и МС (фруктоза 20% р-р)	2.5	227	8 / 8 *	ПМТ, ПК
Kitagawa A. 2012 (1) [40]	1 мг/кг/день, внутривентрикулярно (6:00–7:00), 2 нед.	12 / 12	Wistar и МС (фруктоза 60% диета)	2	282	5 / 5 и 8 / 8	ПМТ, леп- тин, Ж
Kitagawa A. 2012 (2) [40]	10 мг/кг/день, внутривентрикулярно (6:00–7:00), 2 нед.	12 / 12	Wistar и МС (фруктоза 60% диета)	2	282	5 / 5 и 8 / 8	ПМТ, леп- тин, Ж
Korkmaz G.G. 2012 [41]	10 мг/кг/день, внутривентрикулярно, 8 нед.	12 / 12	Wistar	3	240	10 / 8 *	ПМТ
Leibowitz A. 2008 [42]	30 мг/кг/день, с питьевой водой (в 18:00), 5 нед.	14 / 10	Sprague-Dawley и МС (фруктоза 60% диета)	2.5	249	10 / 10	ПМТ
Mendes C. 2013 [43]	1 мг/кг/день, с питьевой водой (в темное время суток), 16 нед.	12 / 12	Wistar	12	580	14 / 14 *	ПМТ, ПК, ПВ

Продолжение табл. 5

Публикация	Доза, способ и продолжительность введения	Световой режим день/ночь	Линии и модели	Возраст крыс, мес	Исходная средняя масса, г	Объем вы- борки опыг/ контроль	Параметры
Mirunalini S. 2005 (1) [44]	0.5 мг/кг/день, внутриврю- шинно (17:30–18:00), 45 дней	12 / 12	Wistar	взрос.	184	6 / 6 *	ПМТ
Mirunalini S. 2005 (2) [44]	1 мг/кг/день, внутриврюшин- но (17:30–18:00), 45 дней	12 / 12	Wistar	взрос.	182	6 / 6 *	ПМТ
Montano M.E. 2010 [45]	1 мг/кг/день, с питьевой водой (перед темной фазой), 4 нед.	12 / 12	Wistar	взрос.	183	4 / 4	ПК, ПВ
Mori N. 1989 [46]	20 мг/кг/день, внутриврюшин- но (утром), 3 нед.	–	Sprague-Dawley и диета 1% холестерина	2	167	6 / 6	ПМТ
Mustonen A.M. 2002 [47]	Подкожная помпа (12 мг, 2 мг/кг/день), 4 нед.	12 / 12	Wistar (самцы и самки)	2	225	20 / 20 *	ПМТ, ПК
Nasiraei-Moghadam S.N. 2014 [48]	5 мг/кг/день, внутриврюшин- но, 2 нед.	12 / 12	Лабораторные	взрос.	191	7 / 7	ПМТ
Nduhirabandi F. 2011 [49]	4 мг/кг/день, с питьевой во- дой, 16 нед.	12 / 12	Wistar и диета 16% жира	взрос.	200	6 / 6	лептин, Ж
Obayemi M.J. 2021 [50]	4 мг/кг/день, через зонд (8:00–10:00), 12 нед.	12 / 12	Wistar и диета 40% жира	взрос.	172	6 / 6 *	ПМТ, ПК, ПВ
Paskaloglu K. 2004 [51]	10 мг/кг/день, внутриврюшин- но, 8 нед.	12 / 12	Wistar	взрос.	267	8 / 8	ПМТ

Продолжение табл. 5

Публикация	Доза, способ и продолжительность введения	Световой режим день/ночь	Линии и модели	Возраст крыс, мес	Исходная средняя масса, г	Объем вы- борки опыту/ контроль	Параметры
Peschke E. 2010 [52]	2.5 мг/кг/день, с питьевой водой (в темную фазу), 9 нед.	12 / 12	Wistar	2	–	16 / 16	ПК, ПВ
Pronyo K. 2020 [53]	5 мг/кг/день, внутрибрюшинно, 8 нед.	12 / 12	Wistar	3	371	8 / 8	ПМТ, ПК
Pruwet-Marcassus B. 2003 (1) [18]	30 мг/кг/день, через зонд (через 4 ч после включения света), 3 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley (диета 40% жира)	1.5	430	15 / 14 *	ПМТ, лептин, Ж
Pruwet-Marcassus B. 2003 (2) [18]	30 мг/кг/день, через зонд (за 1 ч до выключения света), 3 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley (диета 40% жира)	1.5	430	16 / 14 *	ПМТ, лептин, Ж
Puchalski S.S. 2003 [54]	0.4 мкг/мл (0.04 мг/кг/день), с питьевой водой, 10 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley	9	525	7 / 7	ПМТ, лептин, Ж
Ríos-Lugo M.J. 2010 [55]	25 мкг/мл (3 мг/кг/день), с питьевой водой (в темную фазу), 9 нед.	12 / 12	Wistar и диета 35% жира	1.5	–	8 / 8	ПК, лептин
Rasmussen D.D. 1999 [56]	4 мкг/мл (0.3 мг/кг/день) с питьевой водой, 48 нед.	14 / 10	Sprague-Dawley	10	544	8 / 8	ПМТ, лептин

Окончание табл. 5

Публикация	Доза, способ и продолжительность введения	Световой режим день/ночь	Линии и модели	Возраст крыс, мес	Исходная средняя масса, г	Объем вы- борки опыт/ контроль	Параметры
Terrón M.P. 2013 [57]	2 мг/кг/день, с питьевой водой, 15 нед.	12 / 12	Wistar	взрос.	227	10 / 10	ПМТ, ПК, ПВ
Tung Y.T. 2020 (1) [58]	10 мг/кг/день, с питьевой водой, 8 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley + жирная диета	4	619	6 / 6	ПМТ, ПК, ПВ, Ж
Tung Y.T. 2020 (2) [58]	20 мг/кг/день, с питьевой водой, 8 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley + жирная диета	4	625	6 / 6	ПМТ, ПК, ПВ, Ж
Tung Y.T. 2020 (3) [58]	50 мг/кг/день, с питьевой водой, 8 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley + жирная диета	4	611	6 / 6	ПМТ, ПК, ПВ, Ж
Wang L. 2021 [59]	10 мг/кг/день, орально через зонд (в 16:00), 8 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley	1.5	155	10 / 10 *	ПМТ, ПК, лептин, Ж
Wolden-Hanson T. 2000 [60]	0.4 мкг/мл (0.04 мг/кг/день), с питьевой водой, 12 нед.	14 / 10	Sprague-Dawley	10	524	19 / 18	ПМТ, ПК, лептин, Ж
Wongchitrat P. 2017 [61]	10 мг/кг/день, внутривенно (10:00–11:00), 6 нед.	12 / 12	Wistar MC (диета 68% жира)	взрос.	220	9 / 9	ПМТ, Ж
Xu M.F. 2001 [62]	6 мг/кг/день, внутривенно (в 9:00), 2 нед.	12 / 12	Sprague-Dawley	2	340	9 / 6 *	ПМТ
Zanuto R. 2013 [63]	0.5 мг/кг/день, с питьевой водой (в темную фазу), 12 нед.	12 / 12	Wistar	12	389	14 / 14 *	ПМТ, ПК, ПВ, Ж

Примечание: ПМТ – прирост массы тела, ПК – потребление корма, ПВ – потребление воды, Ж – содержание жира, * – сообщение о рандомизации.

**ЗЕБРАДАНИО (*DANIO RERIO*) КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ТРАВМАТИЧЕСКОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА**

© 2024 г. А. Д. Шевляков^{1,2}, Н. П. Ильин^{1,3,4}, Д. С. Галстян^{1,3,4}, А. Н. Икрин²,
Т. О. Колесникова², К. В. Апухтин², М. М. Котова², В. С. Никитин²,
Т. Г. Амстиславская⁵, Е. В. Петерсен⁶, А. В. Калуев^{1,2,3,4,5,*}

¹Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»,
Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

²Направления «Нейробиология» и «Иммунобиология и биомедицина»,
Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус»,
Федеральная территория Сириус, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский
центр имени В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

⁶Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 14.01.2024 г.

Принята к публикации 14.01.2024 г.

Травматическое повреждение мозга (ТПМ) включает широкий спектр физических повреждений тканей мозга различной природы и сопровождается серьезными когнитивными, моторными, эмоциональными и нейродегенеративными нарушениями. Ключевую роль в изучении ТПМ играет его моделирование на животных, позволяя расширить наши знания о механизмах патогенеза и временной динамике последствий нейротравмы. В последнее время особый интерес в трансляционной нейробиологии вызывает использование в качестве модельного организма костистой рыбы зебраданию (zebrafish, *Danio rerio*) – второго после мышей наиболее используемого в биомедицине вида лабораторных животных. В работе обсуждаются проблемы и перспективы использования зебраданию для моделирования ТПМ, а также новые направления исследований в данной области. Отмечается значение зебраданию как перспективной модели для исследования молекулярных механизмов и неврологических нарушений при ТПМ, а также скрининге потенциальных терапевтических агентов.

Ключевые слова: нейротравма, нейровоспаление, зебраданию, нейрогенез, экспериментальные модели

ВВЕДЕНИЕ

Травматическое повреждение мозга (ТПМ) является серьезной проблемой здравоохранения и ведущей причиной инвалидности и смертности, особенно среди молодежи. Клиническая картина ТПМ характеризуется клинической гетерогенностью (рис. 1) по этиологии, патологии и степени тяжести нейротравмы [1]. Эффекты ТПМ включают в себя широкий спектр функциональных изменений центральной нервной системы (ЦНС), в том числе когнитивные, двигательные и эмоциональные нарушения, а также риск развития нейродегенеративных заболеваний (например, болезней Альцгеймера, Паркинсона и деменции) [2–4]. Большая распространенность и тяжелые последствия ТПМ требуют изучения их молекулярных механизмов и создания новых методов терапии, а также эффективных моделей ТПМ на животных [1, 5–8].

В патогенезе ТПМ выделяют две формы – первичную и вторичную (рис. 1). Первичное ТПМ возникает в результате воздействия внешней физической силы, приводя к механическому повреждению тканей мозга. Вторичное ТПМ представляет собой набор биохимических реакций на первичное повреждение – нейровоспаление, апоптоз, эксайтотоксичность, окислительный стресс и другие патофизиологические процессы (рис. 2), которые способствуют дальнейшей дегенерации мозга [5–7]. Вызванная в результате ТПМ деполяризация нейронов приводит не только к продолжительному разрушению нейрональных структур, но и к его распространению на соседние области [2, 8]. При этом избыточный выброс возбуждающих нейромедиаторов (глутамата и аспартата) вызывает увеличение содержания внутриклеточного кальция, что, в свою очередь, активирует ряд каталитических ферментов, приводя к деградации нервных клеток путем апоптоза [1, 9].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОФИЗИОЛОГИИ ТПМ

Эксайтотоксичность, особенно глутаматная, является одним из основных факторов гибели нейронов при вторичном ТПМ [1]. При связывании с ионотропными рецепторами клетки глутамат инициирует увеличение концентрации кальция в клетке [5,

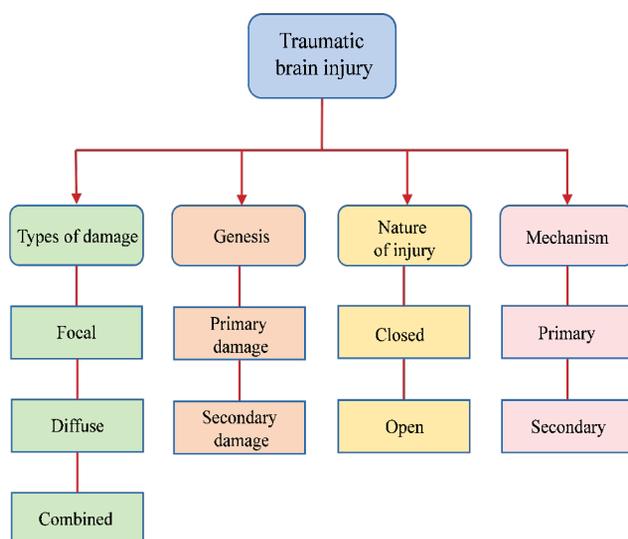


Рис. 1. Общепринятая классификация травматических повреждений мозга (ТБИ).

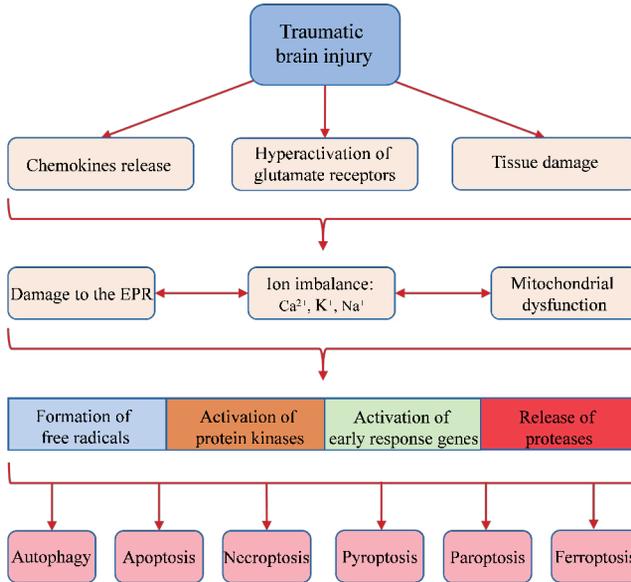


Рис. 2. Молекулярные дисфункции при травматическом повреждении мозга.

10, 11], приводя к дисбалансу между возбуждающей и тормозной нейротрансмиссией и нарушая синаптическую передачу. Внеклеточные концентрации глутамата также повышаются в результате клеточного лизиса, что приводит к ухудшению состояния нейронов, усиливая деполяризацию по механизму положительной обратной связи [11, 12–14]. Рост концентрации кальция активирует пути, усиливающие окислительный стресс, и инициирует запрограммированную гибель клеток (рис. 2), еще больше усиливая эксайтотоксичность [5, 12].

Избыточный приток кальция в клетку также нарушает функцию митохондрий, негативно влияя на процессы энергетического обмена и приводя к образованию активных форм кислорода (АФК), активации протеазы и фосфолипазы и высвобождению проапоптотических молекул [1]. Перегрузка митохондрий кальцием и высокая концентрация АФК приводит к образованию и открытию переходных пор митохондрий. Учитывая непосредственную близость их внешней мембраны к эндоплазматическому ретикулуму, эти поры начинают функционировать как механизм оттока кальция. Поскольку переходные поры митохондрий не являются селективными, выходит из клетки не только кальций, но и другие внутримитохондриальные компоненты (например, цитохром С), активируя цепную реакцию и в конечном счете приводя к гибели клеток. Далее, по мере высвобождения кальция и цитохрома С, вода и цитозольные растворенные вещества поступают в митохондрии, что приводит к набуханию и, следовательно, разрыву клеточного матрикса [10]. При этом особую опасность представляет окислительный стресс. Сопутствующее ему высвобождение цитохрома С из митохондрий запускает образование апоптосомы (многобелкового комплекса, активирующего каспазу-9). В свою очередь, каспаза-9 активирует каспазы-исполнители (каспаза-3, каспаза-12 и др.), которые расщепляют различные клеточные субстраты, провоцируя апоптоз (рис. 2) [1, 13].

При вызванном ТПМ нейровоспалении поврежденные клетки мозга выделяют активаторы пути мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) и клеточного повреждения, которые, в свою очередь, стимулируют рецепторы клеток микроглии и астроцитов [15]. Это индуцирует переход микроглии в реактивную форму M1 и высвобождение ею про-

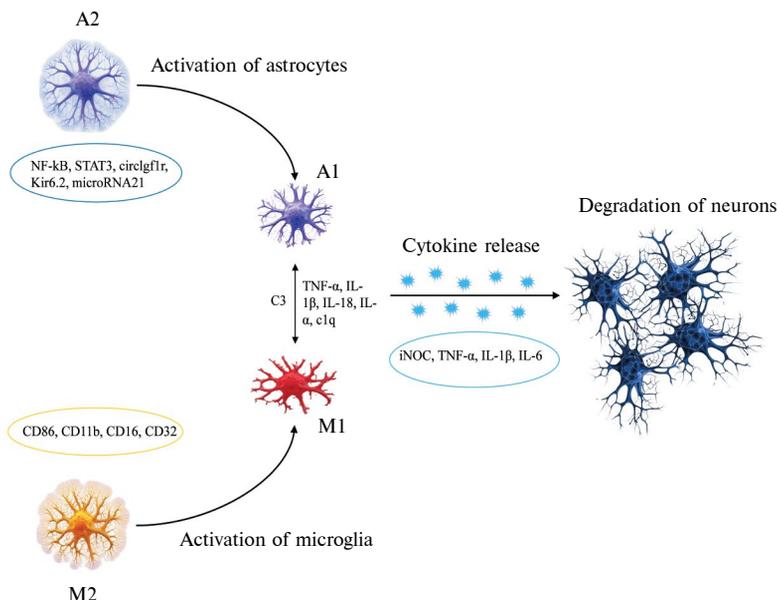


Рис. 3. Роль микроглии и астроцитов в процессе нейровоспаления при травматическом поражении мозга. M1, M2 – микроглия, A1, A2 – астроциты.

воспалительных цитокинов, прежде всего фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α), интерлейкина-1 бета (ИЛ-1 β) и интерлейкина-6 (ИЛ-6, табл. 1 и рис. 3). Последние запускают каскад реакций, приводящих к нарушению гематоэнцефалического барьера, отеку головного мозга и инфильтрации лейкоцитами, что приводит к усугублению вторичного повреждения головного мозга [14, 16, 17].

При этом хроническая активация микроглии приводит к усилению регуляции основного комплекса гистосовместимости II класса, что усиливает нейродегенерацию [12] на фоне снижения числа клеток нейропротективной защитной M2-микроглии. Активная микроглия также стимулирует периферические иммунные клетки, которые участвуют в воспалительной реакции и повреждении тканей [18, 19], а нарушение гематоэнцефалического барьера приводит к притоку дополнительных иммунных клеток в мозг [20–28].

Важными участниками нейровоспаления при ТПМ являются астроциты (рис. 3). В обычном состоянии их роль заключается в поддержании работоспособности нейронов, их нейрососудистых связей и гематоэнцефалического барьера [20]. Захватывая глутамат, астроциты предотвращают его накопление в синапсах, тем самым защищая последние от нейротоксичности глутамата [21]. Астроциты также действуют как положительные модуляторы синаптического торможения [22]. Однако при ТПМ астроциты приобретают новые свойства – дифференцируются в активную нейротоксичную форму (фенотип) A1, теряют свои синаптические функции и фагоцитарную способность и начинают убивать нейроны и олигодендроциты путем индукции клеточного апоптоза [23]. Как и M1-микроглия, активированные астроциты также способны выделять воспалительные цитокины и нарушать нормальный захват глутамата из внеклеточного пространства, что еще более способствует эксайтотоксичности и усиливает дегенерацию нейронов (рис. 3) [24].

Следует отметить, что при ТПМ микроглия не только опосредует острую воспалительную реакцию за счет активации M1-фенотипа, но и в форме M2-микроглии уча-

ствуется в последующем remodelировании тканей и контроле нейровоспаления. В этом случае клетки микроглии начинают продуцировать противовоспалительные цитокины интерлейкин-10 (ИЛ-10), трансформирующий фактор роста-бета (ТФР- β) и др. (табл. 1), способствующие восстановлению тканей [29, 30]. В качестве защитной реакции на ТПМ астроциты также активно выделяют мозговой нейротрофический фактор (BDNF) [31], усиливающий восстановление синаптической пластичности и функций поврежденного мозга (см. далее).

ТПМ является мощным индуктором гибели клеток ЦНС по пути некроза и апоптоза [32, 33]. При некрозе происходит нарушение ионного баланса клетки, сопровождающееся ее набуханием и гибелью в первые минуты после ТПМ [32, 33]. Апоптоз представляет собой энергозатратный клеточный процесс, характеризующийся фрагментацией цитоплазмы и ядра при сохранении общей структуры органелл. Он является примером запрограммированной клеточной гибели, при которой происходит уничтожение типов клеток, необратимо потерявших свои специфичные функции [34]. При апоптозе происходят изменения в морфологии клеток (фрагментация ядер, конденсация хроматина, образование апоптотических телец), а также активация маркеров фрагментации ДНК и проапоптотических белков [32, 35–37]. Ключевую роль в апоптозе играют каспазы-инициаторы (каспаза-2, -8 и -9), которые активируют каспазы-исполнители (каспаза-3, -6 и -7) [38]. Описаны два основных пути апоптоза – внутренний (митохондриальный) и внешний (инициируемый через “рецепторы смерти”) [1, 39].

Внутренний путь апоптоза начинается с повреждения митохондрий, чаще всего вызванного избыточным уровнем кальция внутри клетки из-за эксайтотоксичности [5]. Это сопровождается освобождением цитохрома С, который (взаимодействуя с ферментом Араф-1, АТФ и прокаспазой-9) формирует апоптосому, которая далее активирует каспазу-9 и каспазу-3, вызывая необратимое разрушение клетки. Напротив, внешний путь запускается с участием рецепторов клеточной стенки [32, 38, 39]. Взаимодействие на поверхности клетки фактора некроза опухоли TNF или рецептора *Fas* с внеклеточным *Fas*-лигандом ведет к запуску процессов тримеризации рецепторов с формированием комплекса внутриклеточных сигнальных молекул и образованием так называемого домена смерти – сигнального комплекса, индуцирующего активацию каспазы-3, -8 и/или -10 с последующим необратимым повреждением клетки. В отдельную категорию при ТПМ можно выделить пироптоз – форму каспаз-зависимой программы клеточной гибели, запускаемой внутри- или внеклеточным изменением гомеостаза в результате активации каспазы-1 (рис. 2). Этот механизм сопровождается выделением интерлейкина ИЛ-1 β и развитием выраженного воспаления [40]. Обычно пироптоз ассоциируют с патологическими процессами во время вирусной или бактериальной инфекции, однако он вовлечен и при ТПМ [41].

Помимо апоптоза и пироптоза, известны и каспаз-независимые молекулярные механизмы клеточной гибели – аутофагия, параптоз, некроптоз и ферроптоз (рис. 2) [12]. Аутофагическая гибель клеток включает лизосомальную деградацию органелл и белков и является распространенным явлением при отмирании клеток. В условиях ингибирования каспаз аутофагия часто является доминирующим механизмом запрограммированной гибели клеток [42]. Параптоз характеризуется вакуолизацией и повреждением эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Этот тип клеточной гибели часто встречается при онкологических заболеваниях, однако для травм мозга он также актуален [43]. Некроптоз является вариантом клеточной гибели, сопровождающимся набуханием клеток и их органелл с последующим увеличением проницаемости клеточных мембран. Этот тип регулируемой клеточной гибели происходит после активации рецептора некроза опухоли (ФНО- α) несмотря на то, что ФНО- α долгое время считался индуктором апоптоза [44]. Наконец, ферроптоз характеризуется мощным железом-зависимым перекисным окислением липидов и запускается ингибитором цистеин-глутаматого антипортера (эрастин), ингибитором глутатионпе-

Таблица 1. Основные медиаторы нейровоспаления, участвующие в травматическом повреждении мозга

Фено-тип	Биомаркер	Характеристика
M1	ФНО- α	Провоспалительный цитокин
	ИЛ-1 β , 6, 12	Провоспалительные цитокины (интерлейкины)
	IFN γ	Провоспалительный цитокин
	CCL5, 20	Хемокины
	CXCL1, 10	Хемокины
	GM-CSF	Хемокин
	CD16, 32, 86	Поверхностные рецепторы (провоцируют провоспалительный сигналинг)
	MHC-II	Поверхностный рецептор (регулирует дифференцировку Т-клеток)
	iNOS	Фермент синтеза оксида азота
M2	ТФР- β	Противовоспалительный цитокин
	ИЛ-4, 10	Противовоспалительные цитокины
	G-CSF	Цитокин выживания и дифференцировки микроглии и макрофагов
	CCL22	Хемокин (направляет дендритные клетки)
	CD206	Рецептор маннозы
	CD163	Поверхностный рецептор для очистки от комплексов гемоглобин-гаптоглобин
	Arg1	Противовоспалительный фермент
	Ym1	Противовоспалительный секреторный белок
	FIZZ1	Противовоспалительный секреторный белок
A1	NF- κ B	Фактор транскрипции (индуктор экспрессии противовоспалительных генов)
	STAT3	Активатор транскрипции (регулятор пролиферации астроцитов)
	circIgf1r	Кольцевая РНК (регулятор пролиферации астроцитов)
	Kir6.2	Субъединица K ⁺ канала (регулятор пролиферации астроцитов)
	microRNA21	МикроРНК (регулятор пролиферации астроцитов)
	C3	Провоспалительный поверхностный рецептор
	C1q	Провоспалительная субъединица системы комплемента
	Д-серин	Провоспалительная аминокислота
ФНО- α	Провоспалительный цитокин	

Фено-тип	Биомаркер	Характеристика
A2	PI3K	Киназа-регулятор пролиферации астроцитов
	Act	Киназа-регулятор пролиферации астроцитов
	STAT3	Активатор транскрипции (регулятор пролиферации астроцитов)
	TrkB	Тирозинкиназный рецептор B (пролиферация астроцитов)
	Connexin 30	Межклеточное соединение астроцитов (пролиферация астроцитов)
	CXCR7	Хемокин, регулирующий пролиферацию астроцитов
	E2	Эстрадиол (гормон, регулирующий пролиферацию астроцитов)
	FGF	Противовоспалительный фактор роста фибробластов
	MFG8	Эпидермальный фактор роста 8 (пролиферация астроцитов)
	ТФР-β	Противовоспалительный цитокин

роксидазы 4 (RSL3) и промотором разрушения глутатионпероксидазы 4 (FIN56) [45, 46]. При ферроптозе наблюдаются морфологические изменения митохондрий, сопровождающиеся их сжатием, исчезновением крист и разрывом внешней мембраны [47].

Как и каспаз-зависимые механизмы, данные процессы могут быть задействованы при ТПМ (рис. 2) [4, 12, 48, 49], однако конкретный механизм клеточной гибели зависит от множества внешних факторов. Например, клетки, оказавшиеся в эпицентре возникновения нейротравмы, будут преимущественно подвержены некрозу и аутофагии вследствие непосредственного нарушения целостности клеточных структур и окружающих сосудов, доставляющих питательные вещества и кислород. Далее, в результате вторичного ТПМ, могут быть задействованы остальные процессы, которые происходят в результате окислительного стресса, накопления воспалительных маркеров и нейромедиаторного дисбаланса (рис. 2 и 3).

Как уже отмечалось, помимо клеточной гибели на фоне первичного и особенно вторичного ТПМ, после нейротравмы также инициируются процессы восстановления структур мозга на анатомическом, молекулярном и функциональном уровнях (рис. 4). Последнее особенно актуально для зербранио. В частности, компенсаторные процессы в ЦНС в ответ на ТПМ могут происходить на нескольких системных уровнях (табл. 2), включая: 1) активацию нейро- и глиогенеза за счет пролиферации клеток радиальной глии [50–53], 2) повышение нейропластичности (за счет увеличения числа синапсов в нейронах, плотности дендритных шипиков и нейроглиальных контактов) на фоне 3) повышения экспрессии нейротрофинов (например, BDNF и NGF) [54–56], 4) снижение нейровоспаления и апоптоза (в том числе путем перераспределения M1/M2 и A1/A2 нейроглиальных фенотипов), 5) усиление нейротрансмиссии для компенсации активности утраченных нейронов [57], 6) изменение транскриптомного, протеомного и метаболомного профилей клеточного микроокружения в областях вторичного повреждения [58], 7) повышение фагоцитарной активности при ТПМ, которое может быть направлено на поврежденные фрагменты клеток, что снижает нейровоспаление и, наряду с увеличением экспрессии NGF, защищает от демиелинизации и в итоге дегенерации нейронов [59].

Таблица 2. Основные механизмы нейрорегенерации после травматического повреждения мозга у зебрании

Механизм	Ссылки
Нейрогенез	[50]
Глиогенез	[53]
Повышение синаптической пластичности	[54]
Активация других процессов нейропластичности	[56, 59]
Активация нейротрокторной глии (M2, A2 фенотипы)	[57]
Повышение фагоцитоза в мозге	[59, 60]
Выделение нейротрофных и противовоспалительных факторов	[49, 54]
Компенсаторное усиление нейротрансмиссии	[61]
Изменение метаболизма и транскриптомного профиля мозга	[58]

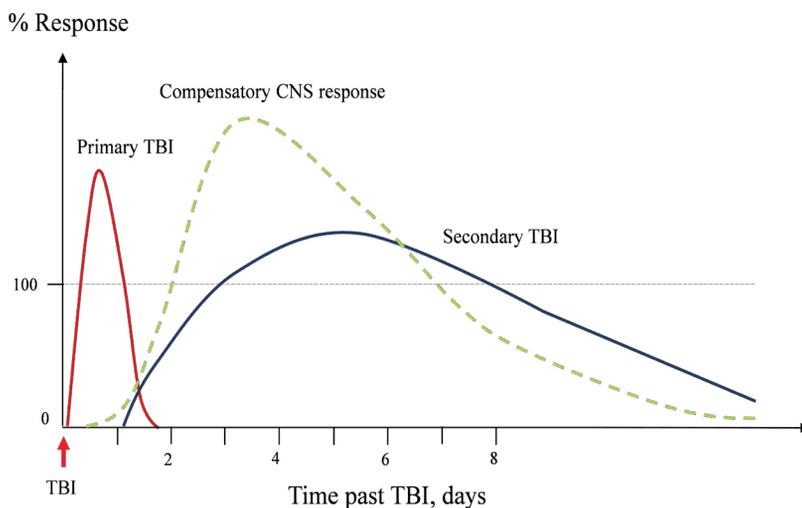


Рис. 4. Примерная временная динамика фаз клеточной гибели при нейротравме (TBI) у зебрании. Красной и синей линиями обозначены первичный и вторичный ответы (измеряется в уровне экспрессии NeuN). Зеленым пунктиром обозначен компенсаторный ответ (измеряется в уровне экспрессии BDNF). По оси Y отложен % ответа от нормы (взятой за 100%), по оси X – время (дни) после TBI (красная стрелка).

В общей динамике процесс адаптивного ответа мозга на нейротравму можно охарактеризовать через изменение экспрессии биомаркеров повреждения и репарации нейронов (NeuN и BDNF соответственно) (рис. 4) [62].

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОТРАВМЫ НА ЖИВОТНЫХ

Несмотря на сложность механизмов ТПМ человека, затрудняющую его точное воспроизведение на моделях *in vivo*, экспериментальное моделирование на животных является важным направлением исследования физиологических нарушений при нейротравме [63, 64]. На сегодня наиболее распространенными объектами для таких моде-

лей являются лабораторные грызуны (крысы и мыши), которые в силу малой стоимости, небольшого размера и стандартизированных результатов измерений превосходят более крупные объекты, которые значительно ближе по размеру и физиологии к людям. Для моделей на крупных животных проблемой являются более высокие затраты на покупку и содержание, сложность в разведении и обеспечении необходимых условий, сложность разработки оборудования для проведения эксперимента, большая трудоемкость в проведении хирургических операций (ввиду большого размера мозга), недостаточная изученность геномных и физиологических особенностей ТПМ, а также ограниченная доступность специфических реагентов для исследования (генетически модифицированных объектов, антител, мРНК-зондов и др.) [65]. При этом использование грызунов для моделирования ТПМ также имеет свои недостатки – например, сложность содержания и строгий биоэтический контроль, что нередко мешает достижению необходимого размера выборки и, следовательно, уменьшает потенциальную статистическую мощность и общую валидность исследования.

В последние годы большую актуальность в трансляционной нейробиологии приобрели рыбы зебранию (*zebrafish*, *Danio rerio*). Эти небольшие пресноводные костистые рыбы становятся популярны как модельный организм во многом благодаря своей легкости в разведении и уходе, высокой генетической и физиологической гомологии с человеком, наличию полностью собранного и аннотированного генома, а также возможности проведения как поведенческих, так и молекулярно-биологических экспериментов в малые сроки [66]. С учетом особенностей устройства ЦНС рыб моделирование ТПМ на зебранию представляет особый интерес. Например, зебранию не только имеют большое количество общих консервативных характеристик с высшими позвоночными, но и характеризуются отсутствием коры мозга, а также уникальной повышенной способностью к нейрогенезу (в многочисленных нейрогенных нишах по всему мозгу) и нейрорегенерации [67–69].

Нейрогенез представляет собой процесс образования новых нейронов из нейрональных стволовых клеток (НСК) и активно происходит в эмбриональном периоде и раннем детстве [70]. У взрослых млекопитающих новые нейроны также появляются (взрослый нейрогенез) в субвентрикулярной зоне боковых желудочков, субгранулярной зоне зубчатой извилины в гиппокампе и в обонятельных луковицах [71–73]. В этих участках мозга стволовые клетки нейронов размножаются, дифференцируются и интегрируются в существующие нейрональные сети взрослого мозга [70, 74] (например, после инсульта нейроны стволовых клеток могут мигрировать к месту повреждения [75, 76] и, возможно, способствовать восстановлению функции мозга [77]). В отличие от млекопитающих, у рыб нейрогенез происходит во многих областях мозга и, например, у взрослых костистых рыб демонстрирует высокую способность к регенерации нейронов после травмы [78].

Зебранию также отличаются от млекопитающих наличием нейрональных стволовых клеток (клетки радиальной глии), которые широко распространены в мозге как у эмбрионов, так и у взрослых особей [79]. У зебранию имеется как минимум 16 пролиферативных зон мозга, сохраняющих способность к нейрогенезу в течение всей жизни [80]. В нормальных условиях нейроны из стволовых клеток у зебранию мало размножаются, но при наличии нейротравмы и под влиянием химических сигналов они активно начинают делиться и мигрировать к месту повреждения [81]. В этом ключевую роль играют другие нейроны и клетки глии, которые предоставляют поддержку и направляют молодые нейроны в нужном направлении [82, 83]. В отличие от млекопитающих, у которых повреждение мозга часто сопровождается образованием глиальных шрамов, разрушением нейронных связей и последующими повреждениями, зебранию имеют способность относительно быстро регенерировать обширные повреждения без долгосрочных последствий. Подобный

существенный разрыв в способности к нейрорегенерации между зебраданио и млекопитающими открывает новые перспективы для трансляционных исследований ТПМ.

Часто применяемой моделью ТПМ у зебраданио является игольчатая травма (проникающее повреждение) мозга путем введения иглы через череп [84]. Важной особенностью данного подхода является возможность точечного нанесения повреждений, затрагивая только определенный отдел мозга зебраданио. Например, в некоторых протоколах применяется повреждение только одного из полушарий, оставив второе в качестве контроля [1]. Данный подход позволяет не только исследовать функциональные (например, поведенческие) нарушения ЦНС при ТПМ, но и изучать нейрохимические и геномные ответы мозга на нейротравму в его динамике [1]. Например, спустя четыре дня после индукции нейротравмы зебраданио демонстрируют гиполокомоцию в тесте незнакомого аквариума и нарушение рабочей памяти в Y-образном лабиринте, а также активацию экспрессии в теленцефалоне гена *isg15* (инсулин-стимулируемого гена 15), который является биомаркером повреждения нейронов, и снижение уровня норадреналина [1]. Тем не менее существенными недостатками данного метода являются его очевидная инвазивность, риск нейроинфекции, отсутствие возможности адекватно воспроизводить ТПМ закрытого типа (поскольку при проникновении иглы через эпидермальный слой происходит нарушение гематоэнцефалического барьера), а также воспроизводимость как в разных лабораториях, так и внутри одной группы.

Для рыб разработаны также модели ТПМ диффузного типа на основе ультразвукового воздействия, которые помогают нивелировать недостатки моделей с проникающим типом повреждений ЦНС [85]. Для этого рыб вначале подвергают анестезии, а затем фиксируют в специальном держателе, помещаемом в ультразвуковой аппарат с окном-мишенью, через которое проходят ультразвуковые волны [85]. Данный способ повреждения позволяет довольно точно воспроизводить молекулярные изменения и связанные с ними поведенческие нарушения аналогично моделям ТПМ у млекопитающих. Например, в обоих случаях происходит активация воспалительного ответа с повышением экспрессии соответствующих маркеров, провокация окислительного стресса и апоптотических процессов на фоне нарушений памяти и координации движений [85]. В целом ультразвуковое ТПМ у взрослых зебраданио демонстрирует высокую прогностическую валидность, важную для дальнейшего проецирования результатов данной модели на человека. Однако, несмотря на преимущества этого подхода, он не является заменой для более масштабных исследований на млекопитающих. Более того, на данный момент невозможно проводить локальное повреждение мозга с помощью ультразвукового воздействия из-за ограничений как по размеру ультразвуковой волны, так и по размеру мозга самих рыб зебраданио.

Для моделирования ТПМ на зебраданио недавно также разработана методика применения направленного лазера, вызывающего фокальное непроникающее ТПМ (рис. 5) [62]. Для этого анестезированных зебраданио фиксируют во влажной вискозной губке и подвергают краткому (мс) воздействию лазера. При этом прозрачные кожа головы и череп рыбы позволяют сфокусировать излучение непосредственно на мозге, не повреждая поверхность черепа (рис. 5). Эта особенность является одним из главных преимуществ лазерного повреждения тканей, позволяющая производить контролируемое неинвазивное ТПМ в обширных или более избирательных отделах ЦНС [62]. В данной модели основным повреждающим фактором является нагрев, поскольку кванты света инициируют возбужденное состояние молекул [86], что впоследствии приводит к активному межмолекулярному взаимодействию и гипертермии.

Патологические изменения, происходящие в ткани мозга, напрямую зависят от мощности излучения, времени воздействия и глубины проникновения. Так, при достижении уровня нагрева в 60°C начинается процесс денатурации белка, а при 100–150°C провоцируется абляция и карбонизация. И хотя подобные эффекты мо-

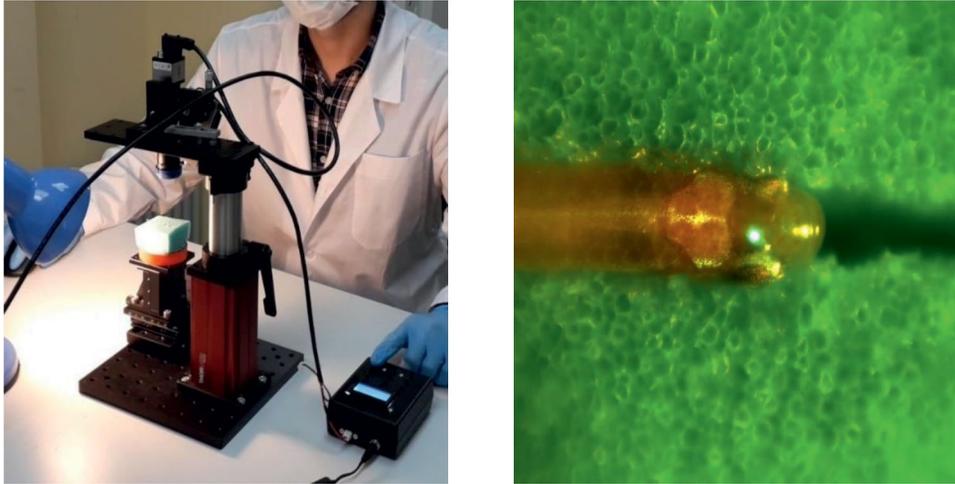


Рис. 5. Общая установка (слева) для лазерной индукции нейротравмы у взрослых зебрданио (справа) [62].

гут происходить одновременно, что является недостатком данного метода, его можно нивелировать путем тщательной настройки параметров лазерного излучения [62].

Особенно важно, что данная модель ТПМ позволяет не только повреждать мозг зебрданио, но и исследовать динамику молекулярных ответов на нейротравму. Например, повреждение лазером вызывает гиполокомоцию и тревожное поведение у рыб в тесте нового аквариума (напоминая последствия ТПМ у грызунов и человека) [62]. Окрашивание NeuN-положительных клеток снижается через день, но не через семь дней после ТПМ лазером, что указывает на усиление повреждения нейронов сразу после травмы и быстрое восстановление мозга после нее. Уровень нейротрофического фактора головного мозга BDNF в мозге снижается сразу после травмы, однако полностью восстанавливается через семь дней. Маркер активации микроглии, белковый фактор воспаления аллотрансплантата 1 (Iba1), повышается в мозге при ТПМ, но снижается к 3-му дню. Уровень индуцируемого гипоксией фактора 1-альфа (Hif1a) достигает пика через три дня и восстанавливается к 7-му дню после травмы [87]. В целом модель лазер-индуцированной нейротравмы зебрданио воспроизводит легкую форму ТПМ [87] и может быть полезным инструментом для исследования механизмов патогенеза и доклинического скрининга нейропротекторных препаратов.

Таким образом, последствия нейротравмы у человека могут иметь значительные отличия от результатов экспериментов на животных, так как число вариаций клинических случаев существенно превосходит количество разработанных моделей и, следовательно, потенциальных условий получения травмы. При этом наибольшие различия с человеком среди позвоночных животных моделей ТПМ стоит ожидать от рыб, поскольку в сравнении с млекопитающими, молекулярные ответы на нейротравму у них имеют ряд особенностей. Так, при ТПМ у зебрданио период активного нейровоспаления ниже, что видно по меньшему промежутку повышения активной экспрессии ФНО- α и каспазы-3, чем у млекопитающих [1]. Кроме того, в большей степени происходит активация генов, связанных с регенерацией и пролиферацией нервных клеток, что свидетельствует об активном нейрогенезе. В целом у рыб пик нейровоспаления наступает в среднем на 3-й день после травмы, а наиболее активная стадия нейрогенеза – на 21-й день [62]. При этом у млекопитающих такой тенденции к быстрому восстановлению не обнаружено, а время снижения активности провоспалительных маркеров значительно выше. Таким образом, у зебрданио происходит быст-

рый регенеративный ответ, что приводит к значительному снижению долговременных последствий нейротравмы [1] и может послужить стратегией таргетной терапии в клинике, направленной на активацию данных процессов в первые часы после ТПМ.

Еще одно эволюционно значимое отличие зебраданио от млекопитающих заключается в самой анатомии мозга. Расхождение предков костистых рыб и млекопитающих произошло около 420 миллионов лет назад, вызвав существенные различия в структурной организации ЦНС, в том числе отсутствие у рыб коры мозга, а также руброспинального и кортикоспинального спинномозговых трактов. Для анализа ТПМ это имеет особое значение, так как механизмы диссоциации (дезинтеграции функций) предполагают первичное повреждение более эволюционно поздних отделов мозга. В случае млекопитающих таким отделом является кора, берущая на себя основной удар во время травмы, и, как самая сложная в организации структура, при повреждении имеющая ограничения на процессы восстановления. Следовательно, последствия ТПМ у млекопитающих могут иметь большее влияние (чем у рыб) на дальнейшее функционирование организма. Однако хотя регенеративные способности зебраданио можно частично объяснить относительной простотой организации их ЦНС (по сравнению с человеком), рыбы имеют практически все ортологи ключевых генов человека, отвечающие за развитие ЦНС и коры, в частности, что говорит о большой гомологии не только на геномном уровне, но и на уровне клеточного сигналинга и молекулярных путей. Это важно в контексте создания генетических моделей пороков развития нервной системы, основанных на мутациях соответствующих генов. Последнее, с учетом большей доступности генетических манипуляций на зебраданио (в сравнении с грызунами), также является весомым аргументом в пользу расширения использования рыб при моделировании ТПМ, в том числе путем создания генетических моделей для оценки генетических факторов риска и, возможно, резистентности к развитию нейротравмы.

Различные модели ТПМ на зебраданио имеют и другие ограничения по сравнению с моделями нейротравмы на млекопитающих. Например, явное ограничение связано с большими анатомическими различиями ЦНС разных видов. Так, если грызуны и приматы имеют сходную организацию мозга с человеком, включая зоны коры и подкорковых областей, то у зебраданио отсутствие коры делает невозможным параллельную оценку высших когнитивных функций после ТПМ [88]. С другой стороны, отсутствие коры подразумевает, что при ТПМ у зебраданио большую долю повреждений (чем у человека и млекопитающих) получают подкорковые структуры. Данное обстоятельство, однако, не снижает ценности зебраданио как модели ТПМ, наоборот, предоставляет возможность подробнее исследовать поражение более глубоких слоев мозга, которые у млекопитающих обычно защищены от физической травмы корой.

Еще одно ограничение связано с масштабом самих используемых моделей. В частности, грызуны и обезьяны являются более крупными животными, что позволяет проводить точные измерения внутри мозга. Однако зебраданио имеют небольшие размеры тела (2.5–3 см) и мозга (< 0.5 см), что затрудняет подобные манипуляции и требует альтернативных методов. Кроме того, у зебраданио также имеется ряд отличий на уровне метаболизма, регенеративных способностей и скорости реакции на внешнее воздействие, что затрудняет прямой перенос результатов исследований на человека. Тем не менее существенное физиологическое и генетическое сходство рыб и человека [88] создает поле возможностей для частичного преодоления лимитирующих факторов. Например, использование комбинированных моделей (включающих и рыб, и грызунов), проведение параллельных исследований на разных моделях, а также учет анатомических и физиологических отличий помогут нивелировать недостатки применения зебраданио для изучения ТПМ.

Наконец, помимо ускоренного нейрогенеза, у рыб имеется ряд дополнительных уникальных особенностей для трансляционных исследований ТПМ, таких как ускоренное развитие (позволяющее проводить в короткие сроки анализ среди разных воз-

растных категорий) и прозрачность кожи и тонких тканей (что облегчает визуализацию процессов внутри мозга) [89]. И хотя остается достаточное количество открытых нерешенных вопросов в данной области (табл. 3), зебраданио позволяют проводить наиболее полные и комплексные исследования ТПМ на всех уровнях организации, от поведения до клеточных и молекулярных процессов, при минимальных затратах.

Таблица 3. Отдельные открытые вопросы в области экспериментального моделирования травматического повреждения мозга (ТПМ) на зебраданио

Вопросы
<ul style="list-style-type: none">• Какие модели животных, включая зебраданио, наиболее точно и надежно отражают процессы ТПМ у человека?• Является ли высокий уровень нейрорегенерации у зебраданио преимуществом, которое помогает изучать патологии нервной системы, или мешающим фактором при изучении ТПМ?• Экспрессия гена фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (Hif1a), оказывает двойственное действие, стимулируя нейровоспалительные реакции и повышая проницаемость гематоэнцефалического барьера, но также и провоцируя нейрогенез. Что будет, если подавить экспрессию гена и нанести ТПМ?• Какие механизмы определяют резистентность глиальных клеток к ТПМ?• Какие факторы могут определить прогноз и результаты нейрорегенерации у зебраданио с ТПМ? Как можно объективно измерить регенерацию тканей, функциональное восстановление и поведенческие изменения после лечения?• Какие факторы или сигнальные пути наиболее важны для организации ремоделирования и регенерации мозговых тканей после ТПМ?• Какими способами можно стимулировать регенерацию и повышать эффективность восстановления функций после повреждения мозга?• Какие молекулярные механизмы определяют выбор между различными путями клеточной смерти (апоптозом, некрозом, аутофагией, пироптозом, ферроптозом и др.) при ТПМ? Какие маркеры и сигнальные молекулы регулируют эти процессы?• Насколько данные типы клеточной гибели сходны в участии во временной динамике при ТПМ рыб и млекопитающих?• Как генетические, эпигенетические и окружающие факторы взаимодействуют с молекулярными механизмами патологии и ремоделирования мозга при ТПМ?• Можно ли скорректировать ТПМ путем воздействия на микроглию, учитывая ее активацию при патологиях ЦНС?• Как поможет искусственный интеллект (ИИ) при распознавании фенотипических признаков, соответствующих ТПМ? Например, как применить ИИ и анализ больших данных (big data) для более точной диагностики, классификации и прогнозирования ТПМ?• При ТПМ высвобождаются провоспалительные цитокины (ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6), что приводит ко вторичному повреждению мозга. Возможно ли облегчить течение и предотвратить последствия приемом нестероидных противовоспалительных препаратов и/или глюкокортикостероидов?

Вопросы

- Ведущим фактором вторичного повреждения нейронов при ТПМ является глутаматная эксайтотоксичность и увеличение концентрации Ca^{2+} . Поможет ли фармакологическая коррекция вальпроатом или блокаторами кальциевых каналов предотвратить или снизить патогенез ТПМ?
- Какие новые фармакологические препараты и подходы могут быть использованы для стимуляции регенерации при ТПМ?
- Каким образом можно преодолеть доставку лекарств через гематоэнцефалический барьер при терапии ТПМ?
- Как можно оценить внутренние гематомы, кровоизлияние и ишемию в мозге модельного организма (например, зебраданио) без патологического вскрытия?
- Какие возможности предоставляют новые техники и технологии (например, оптическая стимуляция, генетические модификации) для более точного и детального изучения молекулярных механизмов и патологии при ТПМ?
- Как можно использовать 3D-печать и тканевую инженерию для создания индивидуальных биологических конструкций и тканей, способных заменить поврежденные участки мозга при нейротравме?
- Как протекают последствия ТПМ у зебраданио в зависимости от возраста и пола? Как много общего в механизмах старения мозга рыб с человеком при ТПМ?

ПЕРСПЕКТИВЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ТПМ

Терапия ТПМ является важной биомедицинской задачей, и потенциальные мишени для лекарственных препаратов для снижения эффектов нейротравмы обычно основаны на молекулярных путях вторичного повреждения ЦНС. Так, его коррекция после ТПМ за счет подавления эксайтотоксичности может использовать антагонисты рецепторов глутамата (например, дексанабинол и дизоцилпин), которые препятствуют взаимодействию лиганда с рецептором и способствуют косвенному уменьшению притока кальция в клетку [90, 91]. Ингибиторы рецепторов глутамата являются отличной мишенью для зебраданио, которые благодаря высокой гомологии глутаматных рецепторов имеют сходный ответ с млекопитающими на терапию [85]. В качестве альтернативной терапии ТПМ могут выступать и прямые блокаторы кальциевых каналов (например, зиконотид и нимодипин), которые оказывают благоприятное влияние на уменьшение отека мозга и увеличение нейропротекции [92, 93]. Ингибирование каспаз-3 и кальпаинов также является эффективной стратегией для снижения процессов клеточной гибели после ТПМ. Например, использование ингибитора кальпаинов MDL-28170 совместно с митохондриальным протектором циклоспорином А имеет большой потенциал для достижения оптимальной степени нейропротекции после ТПМ [94, 95].

Повреждение головного мозга, вызванное посттравматическим окислительным стрессом, может быть уменьшено за счет выработки соответствующих антиоксидантов, которые уничтожают свободные радикалы, способствуют восстановлению митохондрий и уменьшают снижение биосинтеза АТФ после ТПМ [96]. Одним из примеров такого препарата является N-ацетилцистеин, который показал значимый терапевтиче-

ский эффект у крыс, улучшив выживание нервных клеток [97]. Гормональные препараты, например, метилпреднизолон, широко используются для снижения отека мозга при ТПМ. Являясь синтетическим глюкокортикоидом, последний ингибирует экспрессию ФНО- α и активирует NF- κ B [98]. Коэнзим Q₁₀ представляет собой ключевой антиоксидант и также доказал свою эффективность, поскольку его прием после ТПМ значительно уменьшает эффект вторичных повреждений и снижает окислительный стресс [99].

Защита от нейровоспаления и апоптоза достигается за счет контроля выработки про- и противовоспалительных цитокинов. Так, например, миноциклин ингибирует активацию патогенной микроглии M1 и выработку провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α) [100], а также уменьшает отек мозга и сохраняет целостность гематоэнцефалического барьера за счет ингибирования матриксных металлопротеиназ [101]. Эффективность миноциклина также подтверждается при коррекции последствий инсульта как на моделях грызунов, так и на зебраданио [102]. При этом важным отличием зебраданио от млекопитающих в контексте поиска новых терапевтических лекарств является их чрезвычайная эффективность, сопоставимая по производительности и затратности с *in vivo* скрининговыми системами [103, 104]. Таким образом, индукция ТПМ у большого числа зебраданио позволяет использовать данных рыб для создания высокопроизводительных доклинических скрининговых платформ, направленных на поиск новых препаратов для лечения нейротравмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТПМ остается актуальной нерешенной биомедицинской проблемой с тяжелыми последствиями для здоровья пациентов и общества. Ведущим направлением трансляционных междисциплинарных исследований в этой области является моделирование ТПМ на животных моделях с последующим изучением молекулярных механизмов патогенеза и поведенческих нарушений. Важное значение в данных исследованиях занимают зебраданио, имеющие ряд важных особенностей как модельный организм на фоне других лабораторных животных. Преимущества применения зебраданио как модели для исследования ТПМ заключаются также в возможности проецировать результаты на человека с использованием больших выборок, оценить роль нейрогенеза и нейрорегенерации при нейротравме, проанализировать роль некорковых структур мозга в ее патогенезе, использовать мощные генетические технологии на зебраданио и создавать на их основе высокопроизводительные платформы для *in vivo* тестирования нейротропных лекарственных препаратов [105–108].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (А. В. К.), проведение исследования (А. Д. Ш., Н. П. И., Д. С. Г., А. Н. И., А. В. К.), анализ и обсуждение результатов (А. Д. Ш., А. Н. И., Т. О. К., К. В. А., М. М. К., Т. Г. А., Е. В. П., А. В. К.), написание и редактирование манускрипта (А. Д. Ш., Н. П. И., К. В. А., А. Н. И., Д. В. Т., Т. Г. А., А. В. К.), обсуждение и одобрение финальной версии (все авторы).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины» (на базе Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова МЗ РФ). Работа А. В. К. – за счет средств бюджета Санкт-Петербургского государственного университета, работа Т. О. К. – за счет средств бюджета Научно-технологического университета «Сириус». Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильин НП, Галстян ДС, Демин КА, Калугев АВ (2023) Поведенческие, геномные и нейрохимические нарушения в модели нейротравмы на взрослых рыбах зебраданио (*Danio rerio*). Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1699–1717. [Ильин НП, Galstyan DS, Demin KA, Kalueff AV (2023) Behavioral, genomic and neurochemical disorders in the neurotrauma model on adult zebrafish (*Danio rerio*). Russ J Physiol 109(11): 1699–1717. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813923110043>
2. Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, Murray LS, Murray GD, Fabricius M, Maas AI, Woitzi J, Sakowitz O, Mathern B, Roozenbeek B, Lingsma H, Dreier JP, Puccio AM, Shutter LA, Pahl C, Strong AJ (2011) Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: A prospective observational study. Lancet Neurol 10(12): 1058–1064. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70243-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70243-5)
3. Szczygielski J, Mautes A, Steudel WI, Falkai P, Bayer TA, Wirths O (2005) Traumatic brain injury: Cause or risk of Alzheimer's disease? A review of experimental studies. J Neural Transmis 112(11): 1547–1564. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0326-0>
4. Young JS, Hobbs JG, Bailes JE (2016) The impact of traumatic brain injury on the aging brain. Current Psych Rep 18(9): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11920-016-0719-9>
5. Krishnamurthy K, Laskowitz DT (2015) Cellular and molecular mechanisms of secondary neuronal injury following traumatic brain injury. Transl Res Traumat Brain Injury 97–126. <https://doi.org/10.1201/b18959-6>
6. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK (2018) Oxidative stress: Major threat in traumatic brain injury. CNS Neurol Disord Drug Targets 17(9): 689–695. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180627120501>
7. Zheng R, Lee K, Qi Z, Wang Z, Xu Z, Wu X, Mao Y (2022) Neuroinflammation following traumatic brain injury: Take it seriously or not. Front Immunol 13: 855701. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855701>
8. Le Priault F, Thal SC, Engelhard K, Imbroschi B, Mittmann T (2017) Acute cortical transhemispheric diaschisis after unilateral traumatic brain injury. J Neurotrauma 34(5): 1097–1110. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4575>
9. Parellada E, Gassó P (2021) Glutamate and microglia activation as a driver of dendritic apoptosis: a core pathophysiological mechanism to understand schizophrenia. Translat Psychiatry 11(1): 271. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01385-9>
10. Baracaldo-Santamaría D, Ariza-Salamanca DF, Corrales-Hernández MG, Pachón-Londoño MJ, Hernandez-Duarte I, Calderon-Ospina CA (2022) Revisiting excitotoxicity in traumatic brain injury: from bench to bedside. Pharmaceutics 14(1): 152. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010152>
11. Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C (2010) Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury: Clinical article. J Neurosurg 113(3): 564–570. <https://doi.org/10.3171/2009.12.JNS09689>
12. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT (2019) A review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury. World Neurosurg 131: 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
13. Hong Z, Xinding Z, Tianlin Z, Liren C (2001) Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of patients with acute head injuries. Clin Chem 47(8): 1458–1462. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.8.1458>
14. Sattler R, Tymianski M (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. Mol Neurobiol 24(1–3): 107–130. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:10>

15. *Hu Y, Mai W, Chen L, Cao K, Zhang B, Zhang Z, Liu Y, Lou H, Duan S, Gao Z* (2020) Mtor-mediated metabolic reprogramming shapes distinct microglia functions in response to lipopolysaccharide and atp. *Glia* 68(5): 1031–1045.
<https://doi.org/10.1002/glia.23760>
16. *Hinzman JM, Wilson JA, Mazzeo AT, Bullock MR, Hartings JA* (2016) Excitotoxicity and metabolic crisis are associated with spreading depolarizations in severe traumatic brain injury patients. *J Neurotrauma* 33(19): 1775–1783.
<https://doi.org/10.1089/neu.2015.4226>
17. *Balu R* (2014) Inflammation and immune system activation after traumatic brain injury. *Current Neurol Neurosci Rep* 14(10): 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s11910-014-0484-2>
18. *Lehnardt S* (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58(3): 253–263.
<https://doi.org/10.1002/glia.20928>
19. *Karve IP, Taylor JM, Crack PJ* (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 173(4): 692–702.
<https://doi.org/10.1111/bph.13125>
20. *Colonna M, Butovsky O* (2017) Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35(1): 441–468.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
21. *Xu H, Wang Z, Li J, Wu H, Peng Y, Fan L, Chen J, Gu C, Yan F, Wang L, Chen G* (2017) The polarization states of microglia in tbi: A new paradigm for pharmacological intervention. *Neural Plasticity* 2017: 5405104.
<https://doi.org/10.1155/2017/5405104>
22. *Barres BA* (2008) The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60(3): 430–440.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
23. *Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF* (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3): 675–686.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80086-0)
24. *Christian CA, Huguenard JR* (2013) Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endoepine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50): 20278–20283.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1318031110>
25. *Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV* (2016) Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275: 305–315.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
26. *Landeghem FKHV, Weiss T, Oehmichen M, Deimling AV* (2006) Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 23(10): 1518–1528.
<https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1518>
27. *Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS* (2012) New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 9(1): 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-236>
28. *Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK* (1996) Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- α mRNA in the CNS. *Mol Brain Res* 36(2): 287–291.
[https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00274-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00274-V)
29. *Hang CH, Shi JX, Li JS, Li WQ, Wu W* (2005) Expressions of intestinal NF- κ B, TNF- α , and IL-6 following traumatic brain injury in rats. *J Surg Res* 123(2): 188–193.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.08.002>
30. *Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI* (2005) Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 22(8): 885–895.
<https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.885>
31. *Wu N, Sun X, Zhou C, Yan J, Cheng C* (2023) Neuroblasts migration under control of reactive astrocyte-derived BDNF: A promising therapy in late neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cell Res & Therapy* 14(1): 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-03232-0>
32. *Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandennebeele P* (1998) Inhibition of caspases increases the sensitivity of 1929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187(9): 1477–1485.
<https://doi.org/10.1084/jem.187.9.1477>

33. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC (2010) Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7(1): 22–30.
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.10.016>
34. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose) (Par) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48): 18314–18319.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0606528103>
35. Трофимов АО, Кравец ЛЯ (2010) Апоптоз нейронов при черепно-мозговой травме. *Совр технол в мед 3*: 92–97. [Trofimov AO, Kravets LY (2010) Apoptosis of neurons in traumatic brain injury. *Modern Technol Med 3*: 92–97. (In Russ)].
36. Jenkins L, Dixon CE, Peters G, Gao WM, Zhang X, Adelson PD, Kochanek PM (2001) Cell signaling: serine/threonine protein kinases and traumatic brain injury. *Brain Injury* 163–180.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1721-4_8
37. Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC, Clark RSB (2003) Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB J* 17(10): 1367–1369.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-1067fje>
38. Akamatsu Y, Hanafy KA (2020) Cell death and recovery in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 17(2): 446–456.
<https://doi.org/10.1007/s13311-020-00840-7>
39. Clark RSB, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH (1999) Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J* 13(8): 813–821.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.8.813>
40. Brough D, Rothwell NJ (2007) Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci* 120(5): 772–781.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03377>
41. Liu W, Chen Y, Meng J, Wu M, Bi F, Chang C, Li H, Zhang L (2018) Ablation of caspase-1 protects against TBI-induced pyroptosis *in vitro* and *in vivo*. *J Neuroinflammat* 15(1): 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1083-y>
42. Bredesen DE (2008) Programmed cell death mechanisms in neurological disease. *Current Mol Med* 8(3): 173–186.
<https://doi.org/10.2174/156652408784221315>
43. Hanson S, Dharan A, PV J, Pal S, Nair BG, Kar R, Mishra N (2023) Paraptosis: A unique cell death mode for targeting cancer. *Front Pharmacol* 14: 1159409.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1159409>
44. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS (2021) Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* 18(5): 1106–1121.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
45. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR (2003) Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3(3): 285–296.
[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00050-3)
46. Yang WS, Stockwell BR (2008) Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-ras-harboring cancer cells. *Chem Biolol* 15(3): 234–245.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.02.010>
47. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M (2021) Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(4): 266–282.
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
48. Hu X, Xu Y, Zhang H, Li Y, Wang X, Xu C, Ni W, Zhou K (2022). Role of necroptosis in traumatic brain and spinal cord injuries. *J Adv Res* 40: 125–134.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.002>
49. Geng Z, Guo Z, Guo R, Ye R, Zhu W, Yan B (2021) Ferroptosis and traumatic brain injury. *Brain Res Bull* 172: 212–219.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.023>
50. Kyritsis N, Kizil C, Zocher S, Kroehne V, Kaslin J, Freudenreich D, Iltzsche A, Brand M (2012) Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338(6112): 1353–1356.
<https://doi.org/10.1126/science.1228773>

51. *Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J* (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* 36(2): 249–266.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199808\)36:2<249:AID-NEU11>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<249:AID-NEU11>3.0.CO;2-9)
52. *Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M* (2012) Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Development Neurobiol* 72(3): 429–461.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20918>
53. *Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Trembovler V, Leker RR* (2012) The anti-inflammatory drug carprofen improves long-term outcome and induces gliogenesis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 29(2): 375–384.
<https://doi.org/10.1089/neu.2010.1673>
54. *Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM* (2017) Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: Ngf, bdnf, and nt-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury. *International J Mol Sci* 18(3): 548.
<https://doi.org/10.3390/ijms18030548>
55. *Cacialli P* (2021) Neurotrophins time point intervention after traumatic brain injury: From zebrafish to human. *Int J Mol Sci* 22(4): 1585.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041585>
56. *Xiong Y, Mahmood A, Chopp M* (2019) Remodeling dendritic spines for treatment of traumatic brain injury. *Neural Regener Res* 14(9): 1477.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.255957>
57. *Xue J, Zhang Y, Zhang J, Zhu Z, Lv Q, Su J* (2021) Astrocyte-derived CCL7 promotes microglia-mediated inflammation following traumatic brain injury. *Int Immunopharmacol* 99: 107975.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107975>
58. *Zheng P, Zhang N, Ren D, Yu C, Zhao B, Zhang Y* (2023) Integrated spatial transcriptome and metabolomic study reveals metabolic heterogeneity in human injured brain. *Cell Rep Med* 4(6): 101057.
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101057>
59. *Pijet B, Stefaniuk M, Kaczmarek L* (2019) MMP-9 contributes to dendritic spine remodeling following traumatic brain injury. *Neural Plasticity* 2019: 3259295.
<https://doi.org/10.1155/2019/3259295>
60. *Zhou H, Hu L, Li J, Ruan W, Cao Y, Zhuang J, Xu H, Peng Y, Zhang Z, Xu C, Yu Q, Li Y, Dou Z, Hu J, Wu X, Yu X, Gu C, Cao S, Yan F, Chen G* (2021) AXL kinase-mediated astrocytic phagocytosis modulates outcomes of traumatic brain injury. *J Neuroinflammat* 18(1): 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02201-3>
61. *Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EAK, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE* (2017) Glutamate neurotransmission in rodent models of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 34(2): 263–272.
<https://doi.org/10.1089/neu.2015.4373>
62. *Tikhonova MA, Maslov NA, Bashirzade AA, Nehoroshev EV, Babchenko VY, Chizhova ND, Tsubulskaya EO, Akopyan AA, Markova EV, Yang YL, Lu KT, Kalueff AV, Aftanas LI, Amstislavskaya TG* (2022) A novel laser-based zebrafish model for studying traumatic brain injury and its molecular targets. *Pharmaceutics* 14(8): 1751.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081751>
63. *Drefßler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD* (2007) Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *Int J Legal Med* 121(5): 365–375.
<https://doi.org/10.1007/s00414-006-0126-6>
64. *Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR* (2000) Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery* 46(4): 949–956.
<https://doi.org/10.1097/00006123-200004000-00034>
65. *Dai JX, Ma YB, Le NY, Cao J, Wang Y* (2018) Large animal models of traumatic brain injury. *International J Neurosci* 128(3): 243–254.
<https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1380008>
66. *McIlwain DR, Berger T, Mak TW* (2015) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 7(4): a026716.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026716>
67. *Seyfried D, Han Y, Zheng Z, Day N, Moin K, Rempel S, Sloane B, Chopp M* (1997) Cathepsin B and middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurosurg* 87(5): 716–723.
<https://doi.org/10.3171/jns.1997.87.5.0716>
68. *Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabó C, Watkins SC, Clark RSB* (2002) Intracellular localization of apoptosis-inducing factor (Aif) and large scale dna fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 82(1): 181–191.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00975.x>

69. *Xiong Y, Mahmood A, Chopp M* (2013) Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci* 14(2): 128–142.
<https://doi.org/10.1038/nrn3407>
70. *Ma X, Aravind A, Pfister BJ, Chandra N, Haorah J* (2019) Animal models of traumatic brain injury and assessment of injury severity. *Mol Neurobiol* 56(8): 5332–5345.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1454-5>
71. *Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV* (2014) Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. *Trends Neurosci* 37(5): 264–278.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>
72. *Kishimoto N, Shimizu K, Sawamoto K* (2012) Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease Models & Mechan* 5(2): 200–209.
<https://doi.org/10.1242/dmm.007336>
73. *Lim DA, Alvarez-Buylla A* (2016) The adult ventricular–subventricular zone (V–svz) and olfactory bulb (Ob) neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 8(5): a018820.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
74. *Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V* (2010). The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Disease* 40(1): 46–57.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>
75. *Blaser RE, Rosemberg DB* (2012) Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black/white preference and novel tank test. *PLoS One* 7(5): e36931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036931>
76. *Hentig J, Cloghessy K, Hyde DR* (2021) Shuttle box assay as an associative learning tool for cognitive assessment in learning and memory studies using adult zebrafish. *J Visual Exp* 173: 62745.
<https://doi.org/10.3791/62745>
77. *Oppenheim RW* (2019) Adult hippocampal neurogenesis in mammals (And humans): The death of a central dogma in neuroscience and its replacement by a new dogma. *Development Neurobiol* 79(3): 268–280.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22674>
78. *Zupanc GKH* (2001) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav and Evol* 58(5): 250–275.
<https://doi.org/10.1159/000057569>
79. *Schmidt R, Strähle U, Scholpp S* (2013) Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Development* 8(1): 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
80. *Zhao C, Deng W, Gage FH* (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132(4): 645–660.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
81. *Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Augustine KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A* (2018) Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555(7696): 377–381.
<https://doi.org/10.1038/nature25975>
82. *Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA* (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35): 13198–13202.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603512103>
83. *Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM* (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52(6): 802–813.
<https://doi.org/10.1002/ana.10393>
84. *Cuartero MI, García-Culebras A, Torres-López C, Medina V, Fraga E, Vázquez-Reyes S, Jareño-Flores T, García-Segura JM, Lizasoain I, Moro MA* (2021) Post-stroke neurogenesis: Friend or foe? *Front Cell and Development Biol* 9: 657846.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.657846>
85. *McCutcheon V, Park E, Liu E, Sobhebidari P, Tavakkoli J, Wen XY, Baker AJ* (2017) A novel model of traumatic brain injury in adult zebrafish demonstrates response to injury and treatment comparable with mammalian models. *J Neurotrauma* 34(7): 1382–1393.
<https://doi.org/10.1089/neu.2016.4497>
86. *Schupper AJ, Chanenchuk T, Racanelli A, Price G, Hadjipanayis CG* (2022) Laser hyperthermia: Past, present, and future. *Neuro Oncol* 24 (Suppl 6): S42–S51.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noac208>

87. Yuan D, Guan S, Wang Z, Ni H, Ding D, Xu W, Li G (2021) HIF-1 α aggravated traumatic brain injury by NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and activation of microglia. *J Chem Neuroanat* 116: 101994.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2021.101994>
88. Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Development Biol* 295(1): 263–277.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.040>
89. Hasani H, Sun J, Zhu SI, Rong Q, Willomitzer F, Amor R, McConnell G, Cossairt O, Goodhill GJ (2023) Whole-brain imaging of freely-moving zebrafish. *Front Neurosci* 17: 1127574.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1127574>
90. Shohami E, Mechoulam R (2000) Dexanabinol (HU-211): A nonpsychotropic cannabinoid with neuroprotective properties. *Drug Development Res* 50: 211–215.
[https://doi.org/10.1002/1098-2299\(200007/08\)50:3/4](https://doi.org/10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4)
91. Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R (1997) Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 17(10): 1007–1019.
<https://doi.org/10.1097/00004647-199710000-00002>
92. Samii A, Badie H, Fu K, Luther RR, Hovda DA (1999) Effects of an N-type calcium channel antagonist (SNX 111; Ziconotide) on calcium-45 accumulation following fluid-percussion injury. *J Neurotrauma* 16(10): 879–892.
<https://doi.org/10.1089/neu.1999.16.879>
93. Hassan H, Grecksch G, R  thrich H, Krug M (1999) Effects of nifedipine, an antagonist of L-type voltage-dependent calcium channels, on kindling development, kindling-induced learning deficits and hippocampal potentiation phenomena. *Neuropharmacology* 38(12): 1841–1850.
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00067-2)
94. Thompson SN, Carrico KM, Mustafa AG, Bains M, Hall ED (2010) A pharmacological analysis of the neuroprotective efficacy of the brain-and cell-permeable calpain inhibitor MDL-28170 in the mouse controlled cortical impact traumatic brain injury model. *J Neurotrauma* 27(12): 2233–2243.
<https://doi.org/10.1089/neu.2010.1474>
95. Mbye LH, Singh IN, Sullivan PG, Springer JE, Hall ED (2008) Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog. *Exp Neurol* 209(1): 243–253.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.09.025>
96. Bains M, Hall ED (2012) Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Basis Disease* 1822(5): 675–684.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.017>
97. Pandya JD, Readnow RD, Patel SP, Yonutas HM, Pauly JR, Goldstein GA, Rabchevsky AG, Sullivan PG (2014) N-acetylcysteine amide confers neuroprotection, improves bioenergetics and behavioral outcome following TBI. *Exp Neurol* 257: 106–113.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.020>
98. Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY (1998) Methylprednisolone inhibition of TNF- α expression and NF- κ B activation after spinal cord injury in rats. *Mol Brain Res* 59(2): 135–142.
[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00142-9)
99. Duberley KE, Heales SJR, Abramov AY, Chalasani A, Land JM, Rahman S, Hargreaves IP (2014) Effect of Coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial electron transport chain activity and mitochondrial oxidative stress in Coenzyme Q10 deficient human neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol* 50: 60–63.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.003>
100. Homsı S, Federico F, Croci N, Palmier E, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2009) Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res* 1291: 122–132.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.031>
101. Bye N, Habgood MD, Callaway JK, Malakooti N, Potter A, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC (2007) Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp Neurol* 204(1): 220–233.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.10.013>

102. *McCutcheon V, Park E, Liu E, Sobhebidari P, Tavakkoli J, Wen XY, Baker AJ* (2017) A novel model of traumatic brain injury in adult zebrafish demonstrates response to injury and treatment comparable with mammalian models. *J Neurotrauma* 34(7): 1382–1393.
<https://doi.org/10.1089/neu.2016.4497>
103. *Stewart AM, Gerlai R, Kalueff AV* (2015) Developing highER-throughput zebrafish screens for in-vivo CNS drug discovery. *Front Behav Neurosci* 9: 14.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00014>
104. *Bozhko DV, Myrov VO, Kolchanova SM, Polovian AI, Galumov GK, Demin KA, Zabegalov KN, Strekalova T, de Abreu MS, Petersen EV, Kalueff AV* (2022) Artificial intelligence-driven phenotyping of zebrafish psychoactive drug responses. *Progress Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 112: 110405.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110405>
105. *Ghaddar B, Lübke L, Coure, D, Rastega S, Diotel N* (2021) Cellular mechanisms participating in brain repair of adult zebrafish and mammals after injury. *Cells* 10(2): 391.
<https://doi.org/10.3390/cells10020391>
106. *Diotel N, Lübke L, Strähle U, Rastegar S* (2020) Common and distinct features of adult neurogenesis and regeneration in the telencephalon of zebrafish and mammals. *Front Neurosci* 14: 568930.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.568930>
107. *Schmidt R, Beil T, Strähle U, Rastegar S* (2014) Stab wound injury of the zebrafish adult telencephalon: A method to investigate vertebrate brain neurogenesis and regeneration. *J Visual Exp* 90: 51753.
<https://doi.org/10.3791/51753>
108. *Колесникова ТО, Ильин НП, Котова ММ, Калуев АВ* (2023) Зебраданио как перспективная модель в трансляционной нейробиологии и биомедицине. *Успехи физиол наук* 54(3): 1–18. [*Kolesnikova TO, Ilyin NP, Kotova MM, Kaluev AV* (2023) Zebrafish as a promising model in translational neuroscience and biomedicine. *Advanc Physiol Sci* 54(3): 1–18. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919110062>

Zebrafish as a Promising Experimental Model of Traumatic Brain Injury

A. D. Shevlyakov^{a, b}, N. P. Ilyin^{a, c}, D. S. Galstyan^{a, c, d}, A. N. Ikrin^b, T. O. Kolesnikova^b, K. V. Apukhtin^b, M. M. Kotova^b, V. S. Nikitin^b, T. G. Amstislavskaya^e, E. V. Petersen^f, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, *}

^a*World-class Scientific Center “Center for Personalized Medicine”, Almazov National Medical Research Center; Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russia*

^b*Neurobiology Program and Immunobiology and Biomedicine Program, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russia*

^c*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^d*Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russia*

^e*Research Institute of Neuroscience and Medicine, Novosibirsk, Russia*

^f*Laboratory of Molecular Biological and Neurobiological Problems and Bioscreening, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

* e-mail: avkalueff@gmail.com

Traumatic brain injury (TBI) involves various types of physical injuries to brain tissue. TBI is a highly heterogeneous clinical condition, whose symptoms include cognitive, motor and emotional deficits, as well as neurodegeneration and neuroinflammation. Animal modeling plays a key role in studying TBI, expanding our knowledge of TBI and its temporal dynamics, and to develop new drugs for its treatment. Recently, the use of the bony zebrafish (*Danio rerio*) as an aquatic model organism has attracted particular interest

in translational neurobiology. Zebrafish are presently second (after mice) laboratory animal species most used in biomedicine. Here, we discuss the prospects of using zebrafish to model TBI, as well as problems and new directions of research in this area. We also emphasize the importance of zebrafish as a highly translational model for studying the molecular mechanisms and neurological disorders in TBI, as well as screening for potential therapeutic agents.

Keywords: neurotrama; neuroinflammation; zebrafish; neurogenesis; experimental models

ОБЗОРЫ

УЧАСТИЕ ТАНДЕМА «ТУЧНАЯ КЛЕТКА – НЕЙРОН» В РЕГУЛЯЦИИ
РАБОТЫ СЕРДЦА ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ПАТОЛОГИЯХ

© 2024 г. М. П. Морозова^{1, *}, А. Д. Куренкова², Б. А. Умарова³

¹*Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

²*Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет), Москва, Россия*

³*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: mormasha@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 22.01.2024 г.

Принята к публикации 22.01.2024 г.

Данный обзор посвящен изложению новых данных об участии тучных клеток (ТК) в регуляции работы сердца при развитии некоторых сердечно-сосудистых патологий. В норме содержание ТК в сердце невелико по сравнению с их количеством в барьерных тканях. Они отвечают за гомеостаз сердечной ткани и обеспечение взаимодействия органа с нервной и эндокринной системами на протяжении всей жизни организма. Патологические процессы в сердце сопровождаются развитием реакции воспаления, в формировании всех этапов которой значительная роль принадлежит ТК. На фоне развития инфаркта миокарда, фибротического поражения сердца и атеросклероза сосудов число ТК существенно возрастает. Их вклад в патогенез заболевания неодонозначен, поскольку с одной стороны направлен на адаптацию ткани к повреждению, а с другой – лавинообразный синтез и высвобождение медиаторов из активированных ТК усугубляет течение процесса. В результате ТК меняют свой секреторный профиль, вмешиваются в реализацию функций сердца на фоне воспаления, но вместе с тем и модулируют афферентный поток информации от сердца и эфферентные влияния нервной системы. Слаженная работа системы теряет свою устойчивость, что может привести к тяжелым последствиям для жизнедеятельности всего организма. Анализ современного состояния проблемы свидетельствует, что от функционального состояния ТК, их сложного взаимодействия с нервной системой зависит деятельность сердца как в норме, так и, особенно, на фоне развития патологических процессов.

Ключевые слова: кардиальные тучные клетки, симпатическая нервная система, инфаркт, фиброз, атеросклероз

DOI: 10.31857/S0869813924030031, **EDN:** CPYNFR

ВВЕДЕНИЕ

Тучные клетки (ТК) обнаруживаются во всех тканях и органах, преимущественно в слизистых оболочках, соединительной ткани и коже [1–3]. В эмбриогенезе ТК заселяют ткани и органы в результате трех волн миграции, а в постнатальном периоде пополняют свои популяции из клеток-предшественников красного костного мозга

[1, 3, 4]. ТК почти не встречаются в кровотоке, а их окончательная дифференцировка и созревание происходит под действием регуляторных факторов тканеспецифического микроокружения [2, 3].

В гранулах ТК находятся заранее синтезируемые или преобразованные соединения: гистамин, серотонин, нейтральные протеазы (химаза, триптаза, карбоксипептидаза А, G), кислые гидролазы, протеогликаны (гепарин, хондроитин-4, -6, гиалуроновая кислота), эндотелин, эндорфины, кортикотропин-рилизинг гормон, субстанция P (SP) [1–3, 5]. ТК различных тканей гетерогенны по своим морфологическим, цитохимическим (первичная гетерогенность) и функциональным (вторичная гетерогенность) характеристикам. Традиционная классификация ТК основывается, в том числе, на содержимом гранул покоящихся, т. е. в отсутствие активирующего сигнала, ТК (табл. 1). Воздействие отдельных сигнальных молекул на ТК может запускать синтез медиаторов *de novo*, например, метаболитов арахидоновой кислоты: простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов и липоксидов. Заново в ТК синтезируются разные цитокины: интерлейкины, интерферон γ (INF γ), фактор, ингибирующий миграцию (MIF), фактор некроза опухоли α (TNF α). Также ТК являются источником факторов роста и пролиферации других клеток: колониестимулирующего фактора гранулоцит-макрофагальной линии клеток (GM-CSF), основного фактора роста фибробластов (b-FGF), фактора роста нервов (NGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [1, 2, 5]. ТК экспрессируют отличительные мембранные рецепторы: Fc ϵ RI – высокоаффинные рецепторы, связывающие IgE, и MGF – рецепторы факторов роста ТК, или SCF-рецепторы, являющиеся продуктом считывания *c-kit* протоонкогена. Активация этих рецепторов на мембране ТК запускает внутриклеточные сигнальные пути и высвобождение медиаторов.

Визуализацию ТК в исследованиях производят с помощью методов гистохимии и иммуногистохимии. Поскольку состав медиаторов гранул ТК различается, то и гистологический краситель по-разному будет окрашивать такие клетки [5]. Другими более специфичными для визуализации ТК методами являются те, что выявляют ферменты – триптазу и химазу – сериновые протеазы, которые составляют до 35–50% всех белковых медиаторов ТК [6]. В результате ТК были классифицированы на те, что содержат триптазу, химазу или оба фермента сразу. В экспериментах на грызунах были описаны две субпопуляции ТК: мукозальные ТК (почти не содержат гепарина, но присутствуют другие кислые мукополисахариды – хондроитинсульфаты А и В) и соединительнотканые ТК (с большим содержанием гепарина в гранулах) [1, 4, 6, 7]. Существует видовая специфичность ТК: паттерн распределения химаз и протеаз в мукозальных и соединительнотканых ТК у разных видов животных различен [6]. Таким образом, традиционная классификация ТК опирается на их локализацию в тканях организма и ферментативный состав преобразованных медиаторов (табл. 1).

ТК способны высвобождать аутокринно действующие сигнальные факторы, модулирующие собственный синтетический профиль [7]. Благодаря этому возможно формирование разнообразных по секреторному фенотипу местных тканеспецифичных ТК, которые вовлечены в поддержание гомеостаза ткани в норме, возможна также функциональная трансформация мигрирующих в ткань ТК в случае развития патологического процесса. Именно поэтому классификация ТК является сложной задачей. Одни исследователи делят популяции ТК на клетки с конститутивным, работающим в норме фенотипом и клетки с индуцибельным фенотипом, спектр секретируемых медиаторов которых зависит от способа активации, типа и/или стадии патологического процесса. Другие ученые указывают на то, что классификация ТК, основанная на содержании протеаз и гистохимических свойствах клеток в состоянии физиологического покоя в норме, слишком проста, поскольку не учитывает потенциал конечного фенотипа клетки и ее дифференциальные секреторные возможности [6].

Секреторная активность ТК во многом определяется их способностью реагировать на сигналы микроокружения. Полная дегрануляция ТК, вызываемая связывани-

Таблица 1. Характеристика различных популяций ТК мышей [5, 6, 8]

Характеристика	Соединительнотканые ТК	Мукозальные ТК
Размер ТК	10–20 мкм	5–10 мкм
Содержащиеся протеазы	Химаза (mMCP-4), триптазы (mMCP-5 и -6), карбоксипептидаза А	Химаза (mMCP-1, mMCP-2)
Протеогликаны и их молекулярная масса	Гепарин (750–1000 Да)	Хондроитинсульфат (100–150 Да)
Серотонин	1–2 пг/клетка	Менее 0.5 пг/клетка
Гистамин	10–20 пг/клетка	1 пг/клетка
При активации секретируют	Большое количество гистамина и простагландина D	Небольшое количество гистамина и много лейкотриенов

ем IgE с FcεR, сопровождается высвобождением всех преобразованных медиаторов и анафилактической реакцией организма: резким увеличением проницаемости сосудов, экстравазацией плазмы крови, отеком дыхательных путей, гипотонией, развитием тахикардии и активацией стресс-системы организма [6, 9]. В физиологических условиях полной дегрануляции ТК не происходит, а наблюдается частичное, регулируемое факторами микроокружения, высвобождение отдельных гранул или селективная секреция медиаторов [6]. Механизмы высвобождения медиаторов ТК с помощью клатрин-зависимого классического эндоцитоза, эндоцитоза по типу «kiss-and-run» или объемного эндоцитоза помогают защитить клетку от полного истощения, поддержать структурную и функциональную целостность ее мембраны [2, 6]. Сигналы микроокружения модулируют секреторную активность местных ТК, подстраивая ее под потребности ткани: дифференциальный характер высвобождения преобразованных медиаторов ТК и регулируемую через различные сигнальные пути продукцию факторов *de novo* [6].

Через активацию разнообразных рецепторов на ТК возможен тонкий контроль инициации синтеза и секреции медиаторов, благодаря чему ТК активно вовлекаются в широкий спектр физиологических и патологических процессов. Цепь событий, следующая за первичным сигналом, реализуется высвобождением из ТК медиаторов, оказывающих разнообразные, нередко противоположные биологические эффекты. Так, в ходе воспалительной реакции ТК координируют как начальные процессы альтерации и экссудации, так и финальные – пролиферацию и регенерацию. В случае развития патологического процесса в ткани число ТК в ней увеличивается, и «новоприбывшие» ТК дифференцируются и формируют новый уникальный фенотип в соответствии с изменением сигналов микроокружения [6, 7]. Такая функциональная пластичность ТК позволяет им действовать по принципу «здесь и сейчас» и обеспечивает плавное встраивание в поддержание гомеостаза тканей от нарушения до восстановления.

ОСОБЕННОСТИ КАРДИАЛЬНЫХ ТК

В сердце ТК присутствуют в небольшом количестве: у мышей в норме встречается менее 1 ТК на 1 мм³ ткани, что составляет менее 3% всех CD45-позитивных клеток в сердце, а у человека еще меньше – около 0.5–1.5% [6, 7, 10]. Кардиальные ТК преимущественно располагаются в области ушек предсердий, тогда как в ткани пе-

регородки сердца или желудочка их менее 0.1%. В эпикарде и миокарде локализуется основная масса ТК, 50 и 45% соответственно, а в эндокарде они почти не встречаются, что подтверждено для крыс, мышей и человека. В сердце ТК располагаются вдоль коронарных и лимфатических сосудов, среди окончаний нервных волокон [1, 10]. Кардиальные ТК, выделенные из сердец человека, так же как и у крыс, относятся к фенотипу соединительнотканых ТК и содержат как химазу, так и триптазу [10, 11].

Исследования параметров сердечно-сосудистой системы мышей дикого типа (C57BL/6) и различных ТК-дефицитных линий (Kit^{W-sh/W-sh} (дефицит ТК связан с отсутствием чувствительности ТК к фактору роста SCF), WBB6F1-W/W^v, линии HDC^{-/-} (дефицит фермента гистидин-декарбоксилазы, т. е. ТК не содержат гистамина) показали, что исходно (до моделирования различных патологий) линейные размеры сердца и размеры его отделов в систолу и диастолу [12, 13], а также параметры работы сердца: ЧСС [12, 13], фракция выброса [12], уровень коронарного кровотока [13] – не отличались. Это указывает на то, что в норме, в отсутствие чрезвычайных воздействий на организм животного, наличие или отсутствие кардиальных ТК принципиально не сказывается на регуляции работы сердца как органа в целом. Можно сказать, что нормальное здоровое сердце находится под императивным регуляторным влиянием вегетативной нервной системы. При этом сложная взаимосвязь кардиальных ТК с нервной системой обеспечивает координацию потоков сигнальной информации между ТК и другими клетками сердечной ткани и поддержание гомеостаза в этом органе.

Увеличение числа кардиальных ТК может быть адаптивно связано с процессами ангиогенеза, например, в периоды интенсивного роста органа или с необходимостью ремоделирования ткани сердца при патологии, например, после инфаркта миокарда [6, 8].

Функциональная роль ТК в деятельности сердца очень многогранна. Они вовлечены в работу локальной ренин-ангиотензиновой системы (РАС). Ренин, карбоксипептидаза А и химаза, запасаемые в гранулах кардиальных ТК, способны расщеплять ангиотензиноген до ангиотензина I (АТI) и в дальнейшем – до ангиотензина II (АТII) [14]. Причем химаза ТК, расщепляющая АТI до АТII, обладает в 20 раз более эффективной каталитической активностью, чем ангиотензин-превращающий фермент [15]. Таким образом, активированные кардиальные ТК через локальную РАС регулируют тонус коронарных сосудов, уровень кровоснабжения миокарда, а также могут запускать как апоптоз кардиомиоцитов (КМиЦ), так и способствовать развитию гипертрофии сердца [15]. Последствия активации кардиальных ТК могут быть как адаптивными, так и носить патогенный характер. Это определяется количеством ТК, их секреторным фенотипом и степенью активации и, конечно, разнообразием сигналов микроокружения.

Показано, что кардиальные ТК могут выполнять трофическую роль в процессах иннервации сердца. Активированные ТК могут высвобождать NGF и другие нейротрофины, которые влияют на ростовые процессы в нейронах, а также, действуя совместно с SCF и IL-3, аутокринно способствуют дифференцировке предшественников ТК и созреванию ТК [16–18]. Гистамин, выделяемый ТК в эмбриональном периоде развития, модулирует пролиферацию и дифференцировку нервных клеток, а также клеток глии [16, 18]. Через гистамин ТК могут участвовать в синаптической пластичности формирующихся нейронных контуров. А в раннем постнатальном периоде гистамин проникает через незрелый гематоэнцефалический барьер и модулирует высвобождение медиаторов в центральной нервной системе [18]. Денервация органа, например, десимпатизация сердца приводит к увеличению числа ТК и их степени дегрануляции в ткани миокарда, что указывает на важность нейронального контроля в секреторной активности ТК [19].

Предполагается, что ТК сопровождают процесс старения сердца и являются сенсорами нейрогенного воспаления, развивающегося с возрастом. У возрастных крыс показано увеличение инфильтратов в околосердечных структурах и формирование нейромунных комплексов в миокарде: терминали парасимпатических и симпатических

нейронов формировали «контакты» с местными ТК, макрофагами и фибробластами [20]. При этом ТК находились в состоянии дегрануляции, а аксоны – в виде зернистого распада. С возрастом наряду с увеличением числа ТК в инфильтратах показано общее ослабление иннервации: снижается плотность нервных окончаний, появляются дистрофические и дегенеративные повреждения нейронов [20]. Совместное культивирование активированных ТК и КМЦ вызывает апоптотическую гибель последних: химаза ТК нарушает структуру внеклеточного матрикса и плотных контактов между клетками, способствует деградации миозиновых филаментов в КМЦ и нарушению работы сердца в целом. Высвобождение цитокинов IL-1 β и TNF α из ТК вызывает токсическое повреждение и гибель КМЦ [7].

Таким образом, несмотря на небольшое количество, кардиальные ТК регулируют гомеостаз ткани и тонко координируют нормальные процессы в ней, например, эмбриогенез, рост и старение, а при развитии патологического процесса роль ТК значительно меняется (табл. 2). Благодаря близости к коронарным сосудам ТК могут вмешиваться в гуморальную регуляцию работы сердца. Кроме того, образуя структурно-функциональный тандем с нейронами, ТК могут модулировать регуляторные влияния нервной системы в ткани сердца.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СВЯЗЬ ТК И НЕЙРОНОВ

Локализация ТК вблизи кровеносных и лимфатических сосудов, в непосредственной близости от нервных окончаний предполагает двунаправленное посредничество между нервной и иммунной системами. Гистологическое исследование расположения ТК и нервных терминалей в сердце возрастных крыс [17, 20] показало, что расстояние между ними достаточное для осуществления паракринного взаимодействия [17]. Так, в правом предсердии крыс около 1% ТК находится на расстоянии менее 100 нм до нервных терминалей, около 13% ТК – на расстоянии от 101 до 500 нм. ТК обладают огромным разнообразием рецепторов на своей мембране, в том числе к нейропептидам, а также сами способны выделять сигнальные соединения: гистамин, серотонин, дофамин, нейропептиды VIP, кортикотропин-рилизинг гормон, гонадотропин-рилизинг гормон, NGF – взаимодействующие с рецепторами на нервных терминалях [17, 21]. Таким образом, активность ТК зависит от нервных влияний, и ТК сами могут влиять на работу нервных терминалей и нейронов в целом [17, 18, 21, 22].

Показано, что нейропептиды, вазоактивный интестинальный пептид (VIP) и SP вызывают дегрануляцию соединительнотканых ТК человека (LAD2), сходных по фенотипу с кардиальными ТК, и инициируют продукцию цитокинов: моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), индуцибельного белка-10, MIG и IL-8, TNF α , IL-3 и GM-CSF [21]. На этих ТК показана экспрессия рецепторов, связывающихся с нейропептидами: поверхностный рецептор нейрокина 1 (NK₁R), NK₂R, NK₃R и рецептор к VIP – VPAC2. Любопытно, что иммунная активация LAD2 ТК с помощью IgE/анти-IgE повышала экспрессию VPAC2, NK₂R и NK₃R, таким образом происходило увеличение чувствительности ТК к нейрональным сигналам. Кардиальные ТК крыс также содержат рецепторы к нейрокину 1 и могут быть активированы SP [10, 21].

Также было обнаружено, что ТК и нервные терминали могут образовывать клеточные контакты с участием интегринов N-кадгерина, нектин-3, молекул клеточной адгезии CADM-1, напоминающие «синапсы» [17, 18]. В экспериментах по совместному культивированию ТК, выделенных из костного мозга мыши, и нейронов верхнего шейного ганглия показано, что плотные синапсopodobные контакты этих клеток обеспечиваются N-кадгерином, ассоциированным с β -катенином и другими белками цитоскелета. Любопытно, что SP из нейронов шейного ганглия через NK₁R активирует секреторную активность ТК через эти синапсopodobные структуры [23]. Кроме того, гранулы ТК и их содержимое могут проникать в нейроны по механизму трансгрануля-

ции, когда ТК находятся в непосредственном контакте с нейронами, а их экзоцитированные гранулы поглощаются соседним нейроном [9, 18, 24]. Процесс трансгрануляции был подтвержден как для периферических ТК [25], так и для ТК, расположенных в центральной нервной системе [24]. В исследованиях с помощью методов иммуногистохимии и электронной микроскопии на клетках медиальной грабелулы – области мозга между лимбическим передним отделом и средним мозгом голубя – показано, что содержимое гранул ТК может проникать в нейроны тремя путями: путем прямого слияния гранул ТК и плазматической мембраны нейрона; за счет захвата нерастворимых остатков гранул нервными терминалями и, возможно, за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза гранул, содержащих гонадотропин-рилизинг гормон. В результате секреторный материал ТК по-разному распределяется в цитоплазме нервных терминалей: свободно, в связанном состоянии с мембраной в гранулоподобных компартментах или в ассоциации с мелкими везикулами и сетью аппарата Гольджи. А это, в свою очередь, увеличивает возможность влиять на разнообразные мишени в нервной клетке, скорость доставки медиаторов ТК к ним и реализацию конечных эффектов такого взаимодействия.

Таким образом, ТК являются важным связующим звеном между нервной и иммунной системой, осуществляя взаимодействие между ними на понятном языке – языке медиаторов. Ввиду наличия свойства автоматии у сердца и регуляции его работы под контролем вегетативной нервной системы (ВНС), роль кардиальных ТК видится особенно важной. С одной стороны, они обеспечивают тонкую гуморальную координацию клеток сердечной ткани, а с другой – модулируют афферентные и эфферентные потоки информации со стороны нервной системы. Нарушение этой связи может сопровождаться расстройством функционирования ткани и активацией так называемого нейрогенного воспалительного ответа.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАРДИАЛЬНЫХ ТК И НЕЙРОНОВ

ТК играют важную роль в нервной регуляции сердечной деятельности. Взаимодействие кардиальных ТК и нейронов представлено на рис. 1.

Сенсорные нейроны и кардиальные ТК

Сенсорная информация о деятельности сердца непрерывно поступает в центральные отделы нервной системы в первую очередь через афферентные волокна в составе блуждающего нерва, а также через спинномозговые нервы. Отдельную роль играют афферентные нейроны интракардиальной нервной системы (ИКНС), тела которых располагаются непосредственно в ганглионарных сплетениях в ткани сердца. Чувствительные нейроны ИКНС могут быть активированы механической деформацией ткани во время насосной деятельности или под действием медиаторов, например, аденозина, АТФ, брадикинина, SP [26]. Источником некоторых из этих соединений могут быть, в том числе, кардиальные ТК. Сенсорные волокна в сердце содержат медиаторы пептидной природы: кальцитонин-ген родственный пептид (CGRP), SP и другие тахикинины. Различные факторы могут активировать сенсорные волокна сердца, что сопровождается ортодромным и антидромным распространением импульсной активности.

Сенсорные нервные волокна в сердце, в частности, те, что опосредуют передачу болевой информации, содержат на своих окончаниях рецепторы TPRV1 – ванилоидные рецепторы 1-го типа или тепловые температурные рецепторы, активируемые также капсаицином. Помимо рецепторов TPRV1, на нервных терминалях обнаружены рецепторы к АТФ, брадикинину, серотонину, рецепторы, активируемые протеиназами типа 2 (PAR2), к IL-4, IL-13, IL-31, рецепторы к гистамину (H_1 , H_2), MRGPRA3, MRGPC11, рецепторы к лейкотриенам – медиаторам, которые могут высвобождаться

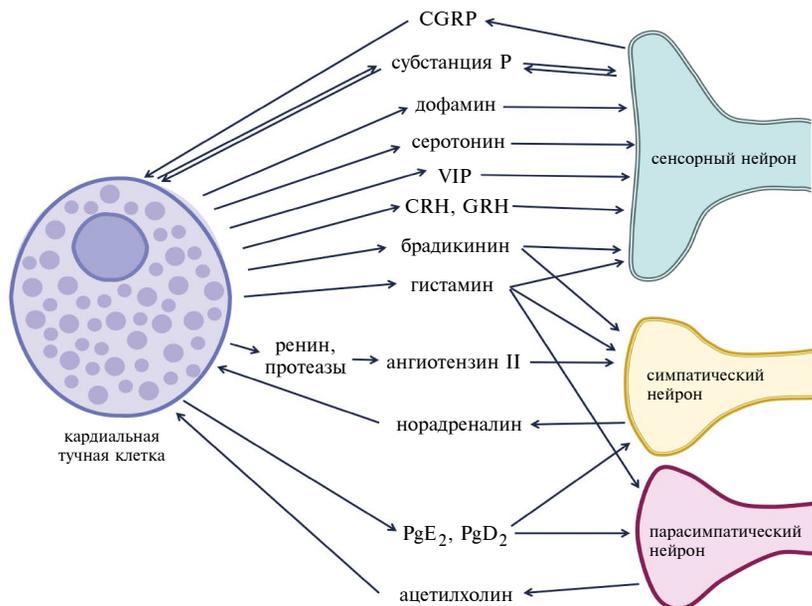


Рис. 1. Взаимодействие кардиальных тучных клеток и нейронов. Условные обозначения: сплошными линиями указаны сигнальные соединения ТК, действующие на нейроны, а пунктирными – нейромедиаторы нейронов, активные в отношении кардиальных ТК.

из местных ТК. При дегрануляции и/или секреции кардиальных ТК эти медиаторы могут дополнительно усиливать восприятие боли через активацию внутриклеточных сигнальных путей, включающих протеинкиназы A и C, фосфорилирование белков канала TRPV1 [27].

В экспериментах *ex vivo* на изолированных сердцах мыши стимуляция капсаицином, агонистом TPRV1, нервных окончаний приводит к выделению нейропептидов SP и CGRP, которые через свои рецепторы NK₁R и CGRPR вызывают секрецию ренина и других протеаз из близлежащих кардиальных ТК. Применение блокаторов рецепторов к SP или стабилизаторов мембран ТК отменяло выявленные эффекты [10, 28].

Через брадикинин кардиальных ТК реализуется и моделирование нервной регуляции органа: так, брадикинин вместе с аденозином воздействуют на рецепторы симпатического и блуждающего нервов и способны изменять чувствительность хемо- и механорецепторов в сердце, что указывает на участие брадикинина в опосредовании болевого синдрома при приступе стенокардии. В экспериментах *ex vivo* на сердцах морских свинок инфузия капсаицина стимулировала С-афференты сердца и увеличивала содержание CGRP в образцах коронарного перфузата. Также было показано, что брадикинин через B2-рецепторы способствует высвобождению CGRP из сенсорных волокон. Установлено, что через CGRP С-афференты активируют рядом расположенные кардиальные ТК, в результате чего последние начинают секретировать гистамин. Гистамин, в свою очередь, через H₃-рецепторы на терминалах С-волокон ингибирует высвобождение CGRP. Таким образом, существует гистамин-опосредованная петля обратной связи, регулирующая высвобождение CGRP из нервных волокон. Это наблюдение указывает на тесное взаимодействие сенсорных нервных волокон и кардиальных ТК.

Таким образом, кардиальные ТК выступают модуляторами афферентного потока информации, необходимого для тонкой настройки и оптимальной регуляции насосной

деятельности сердца в норме. А при патологических процессах в сердце, когда число кардиальных ТК увеличено и изменена их секреторная активность, эти клетки могут существенно вмешиваться в афферентную сигнализацию и усиливать передачу болевой информации.

Симпатические нервные терминалы и ТК

Традиционно считается, что работа сердца находится под контролем ВНС, осуществляемым ее симпатическим и парасимпатическим отделами, хотя регуляция работы сердца представляет собой более сложную иерархически организованную систему вложенных нейронных контуров. Катехоламинергические нервные волокна и ТК часто описываются в тесном морфологическом и функциональном взаимодействии в различных органах, в том числе и в сердце [29]. Взаимодействие кардиальных ТК с симпатическими нервными терминалами предположительно осуществляется двумя способами. Один из них связан с запасаемым в гранулах ТК ренином и другими протеазами, который через активацию локальной РАС и образование АПГ через АТ₁-R на нервных окончаниях потенцируют выброс норадреналина [30]. Второй механизм связан с прямым действием гистамина ТК на терминалы как симпатических, так и парасимпатических нервных волокон [30]. На пресинаптических симпатических терминалах располагаются гистаминовые H₃-рецепторы, которые модулируют высвобождение норадреналина через Gi/Go-внутриклеточный каскад и опосредованно блокируют вход Ca²⁺ через потенциал-активируемые каналы и/или активируют фосфолипазу A2 и через образование арахидоновой кислоты модулируют ионную проводимость мембраны [31]. В экспериментах на крысах было показано, что брадикинин кардиальных ТК через V2-рецепторы на симпатических нервных терминалах может модулировать высвобождение норадреналина. Таким образом, активность кардиальных ТК может определять уровень высвобождения норадреналина, а в патологических ситуациях, когда число ТК и степень их активации возрастает, например, при ишемии миокарда, определять риски развития патологических состояний сердца [30]. Гистамин кардиальных ТК через H₁- и H₂-рецепторы может оказывать прямое действие на работу сердца: модулировать частоту и силу сердечных сокращений, влиять на тонус коронарных сосудов [31]. Показано, что сродство H₃-рецепторов к гистамину гораздо выше, чем у H₁- или H₂-рецепторов, это указывает на то, что в первую очередь будет происходить адаптивное торможение симпатических влияний, а уже потом, при увеличении концентрации гистамина его эффекты распространятся на другие мишени.

В исследованиях на морских свинках показано, что гистамин запасается совместно с норадреналином в симпатических терминалах нейронов верхнего шейного ганглия. Стимуляция электрическим полем приводила к высвобождению гистамина и норадреналина из нервных окончаний в тканях предсердий, а стимуляция кардиальных ТК веществом 48/80 дополнительно снижала высвобождение эндогенного гистамина в образцах перфузата [32]. В этом случае гистамин мог действовать как нейромедиатор, а кардиальные ТК модулировали эффективность этого сигнального пути. Позднее совместная локализация гистамина и норадреналина была подтверждена для нейронов верхнего шейного ганглия макаки, то есть гистамин из кардиальных ТК через H₃-рецепторы запускает высвобождение гистамина и норадреналина из симпатических терминалов [32].

ВНС через влияние на ТК модулирует ход воспалительной реакции: активация симпатического отдела ВНС увеличивает инфильтрацию ткани нейтрофилами и запускает фазу альтерации, в то время как парасимпатическая нервная система ограничивает воспалительный ответ [19]. На ТК показана экспрессия β2-адренергических рецепторов. При исследовании сердца симпатэктомию и ингибирование активности β2-AR вызывали увеличение количества ТК и их дегрануляцию. Нейроны парасимпатического

отдела ВНС через мускариновые рецепторы на ТК также запускают дегрануляцию ТК, тогда как применение атропина отменяет ее. Таким образом, координация воспалительного ответа локальными ТК зависит от баланса влияний ВНС [19].

Таким образом, кардиальные ТК выступают в качестве модуляторов влияния симпатического отдела ВНС на сердце: через гистамин и его H_3 -рецепторы, стабилизируя высвобождение норадреналина из терминалей, а через брадикинин – напротив, облегчая его секрецию. Кроме того, через влияния симпатической нервной системы реализуется контроль количества и секреторной активности кардиальных ТК.

Связь ТК и внутрисердечной нервной системы

ИКНС является финальным уровнем реализации влияний ВНС на работу сердца. Постганглионарные нейроны парасимпатического отдела ВНС располагаются в ганглионарных сплетениях в сердце, в составе ИКНС [33]. Нейроны ИКНС модулируют работу синоатриального узла и проводящей системы сердца, что отражается на ритмической и насосной функции сердца. В модуляции работы сердца задействованы и гуморальные механизмы, важными участниками которых могут выступать кардиальные ТК. Предполагается, что взаимодействие ИКНС и кардиальных ТК может определять механизмы пластичности влияний ВНС на сердце [33].

Иммуногистохимические исследования популяции нейронов в ганглионарном сплетении в сердце человека и экспериментальных животных демонстрируют положительную иммунореактивность на ацетилхолинэстеразу и тирозингидроксилазу, а также к SP, CGRP, нейропептид Y (NPY), VIP, нейрональную изоформу NOS. Как правило, большинство нейронов, около 83%, позитивно иммунореактивны к ацетилхолинэстеразе, поскольку являются, в том числе, постганглионарными нейронами парасимпатического отдела ВНС [34]. Интересно, что ТК экспрессируют на своей поверхности целый спектр рецепторов к ацетилхолину: как ионотропные, так и метаботропные изоформы [35]. Исследование терминалей нейронов ИКНС показало, что 40% нейронов ганглионарных сплетений сердца экспрессируют гистидин-декарбоксилазу – фермент, участвующий в биосинтезе гистамина, и 50% клеток иммунореактивны при окрашивании на гистамин. Предполагается, что нейроны ИКНС обладают определенной пластичностью и могут менять свой биохимический профиль под действием пока неопределенных факторов, что может наблюдаться при развитии патологий сердца [36].

В экспериментах на морских свинках было показано, что гистамин, высвобождаемый кардиальными ТК, может через H_1 -рецепторы увеличивать электрическую активность нейронов ИКНС [37]. Кроме того, высвобождение медиаторов воспаления кардиальными ТК приводит к фенотипическим изменениям и повышению экспрессии nNOS и iNOS в нейронах ИКНС. Также кардиальные ТК могут быть задействованы в модуляции передачи сигналов с преганглионаров парасимпатического отдела ВНС на постганглионарные нейроны. В случае активации воспалительной реакции и изменения активности кардиальных ТК может произойти и общее изменение баланса влияний ВНС [37]. Есть свидетельства того, что кардиальные ТК способны модулировать активность нейронов ИКНС через простагландины PgE_2 и PgD_2 .

Считается, что в патогенезе многих заболеваний сердца лежит нарушение баланса влияний парасимпатического и симпатического отделов ВНС в пользу преобладания последнего [38–41], однако непонятно, в какой степени вклад ВНС модулируется нейронным контуром ИКНС и в какой мере участвуют в этом кардиальные ТК. Учитывая разнообразие медиаторного профиля нейронов ИКНС, взаимодействие с кардиальными ТК может оказаться очень сложным. Кроме того, при старении, инфаркте миокарда или сахарном диабете происходит гибель отдельных нейронов ИКНС, что приводит к изменению соотношения функциональных и медиаторных субпопуляций

клеток и опосредуемых ими воздействий на сердце. Это, в свою очередь, может приводить к изменению роли ИКНС в финальной координации работы сердца [26, 36, 42].

Таким образом, становится понятной уникальная роль кардиальных ТК. В норме кардиальные ТК стоят на страже гомеостаза ткани и воспринимают малейшие изменения микроокружения – выступают модуляторами афферентного потока информации, необходимого для тонкой настройки и оптимальной регуляции насосной деятельности сердца. А при патологических процессах в сердце, когда число кардиальных ТК увеличено и изменена их секреторная активность, они существенно вмешиваются в афферентную сигнализацию и усиливают передачу болевой информации. Участие кардиальных ТК в модуляции влияния симпатического отдела ВНС на сердце может осуществляться через гистамин и его H_3 -рецепторы путем стабилизации высвобождения норадреналина из терминалей, а также через брадикинин, который, напротив, облегчает его секрецию. В свою очередь, симпатическая нервная система осуществляет контроль секреторной активности кардиальных ТК, регулируя синтез и высвобождение медиаторов.

Таким образом, при патологии кардиальные ТК выступают главными локальными координаторами взаимодействия многих клеток ткани. Медиаторы активированных ТК влияют на работу как клеток собственно ткани: кардиомиоцитов, эндотелия сосудов, гладкомышечных клеток, фибробластов, так и привлеченных иммунных клеток в очаг воспаления, а также модулируют потоки афферентной и эфферентной информации от нервной системы и способны вмешиваться в регуляцию работы всего сердца.

РОЛЬ КАРДИАЛЬНЫХ ТК В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Кардиальные ТК в развитии инфаркта миокарда

Ишемическое воздействие на миокард запускает высвобождение преобразованных медиаторов кардиальными ТК и активацию воспалительной реакции [28, 43, 44] (табл. 2). В очаге воспаления увеличивается число ТК за счет пролиферации этих клеток, мигрирующих из белой жировой ткани под действием SCF [1, 44].

Активация местных ТК в сердце может быть вызвана факторами различного происхождения. Например, болевое ощущение при инфаркте опосредовано выделением нейропептидов SP и CGRP из сенсорных нервных терминалей, которые, помимо стимуляции ноцицепторов, активируют кардиальные ТК [10, 28, 45, 46]. Стрессорное воздействие также может привести к инфаркту через выделение кортикотропин-релизинг гормона (КРГ) и нейротензина из нервных терминалей в миокарде и активацию рецепторов на ТК [47]. Возникновение ацидоза в зоне ишемии миокарда, накопление лактата и повышенный уровень ионов K^+ могут изменить чувствительность кардиальных ТК к сигнальным факторам микроокружения [1]. Активация ТК приводит к секреции протеаз, запуску локальной PAC, спазму коронарных сосудов и, следовательно, нарушению перфузии миокарда [10, 47]. Индукторами активации кардиальных ТК выступают и активные формы кислорода, образующиеся при реперфузии ишемизированного миокарда [48, 49]. Воздействие ишемии уже в течение 15 мин приводит к активации кардиальных ТК, их дегрануляции и высвобождению медиаторов, которые при реперфузионных мероприятиях могут приводить к возникновению феномена «no-reflow» или явления невосстановления кровотока. Нарушение микроциркуляции при попытке восстановить кровоток в ишемизированной области миокарда может быть связано с набуханием эндотелия в очаге поражения, адгезией активированных иммунных клеток в нем, повреждением гликокаликса и увеличением прокоагулянтной активности крови – причинами, которые могут быть вызваны в том числе активацией локальных ТК. В связи с тем, что феномен no-reflow является одним из серьезных негативных последствий после реперфузионной терапии или при чрескожных коронарных вмеша-

Таблица 2. Медиаторы кардиальных ТК и их роль в сердечно-сосудистых патологиях

Медиаторы кардиальных ТК	Патология	Патогенетическое действие медиатора	Условно-адаптивные эффекты
Гистамин	Инфаркт миокарда	<ul style="list-style-type: none"> • Увеличение проницаемости сосудов и инфильтрации иммунными клетками [7] • Спазм коронарных сосудов через H_2R на гладкомышечных клетках [1, 31] • Тахикардия через H_2R на пейсмейкерных КМЦ и снижение скорости проведения в атриовентрикулярном узле, что вкуче провоцирует аритмию [31, 52] • Выброс из симпатических терминалей норадреналина и гистамина [1, 7, 28, 50, 54, 58, 59] 	Через H_1R на эндотелии выделение NO, который приводит к дилатации сосудов [1, 31]
	Фиброз миокарда	<ul style="list-style-type: none"> • Стимуляция пролиферации фибробластов [15, 61–63] 	
	Атеросклероз	<ul style="list-style-type: none"> • Стимуляция фибробластов и разрастание бляшки • Увеличение проницаемости эндотелия для частиц ЛПНП и ЛПВП 	Стимуляция пролиферации эндотелия
Протеазы ренин, химазы, триптаза	Инфаркт миокарда	<ul style="list-style-type: none"> • Активация локальной РАС и запуск спазма коронарных сосудов [10, 28, 54] • Разрушение коллагенового матрикса миокарда • Активация сенсорных окончаний, выделение SP и усиление боли при ишемии, а также рекрутирование дополнительных ТК в очаг воспаления [10] • Через PAR-2 повышение чувствительности миофиламентов КМЦ к Ca^{2+} и увеличение сократительного резерва [1, 54] • Разрушение химазой калликреина с образованием брадикинина [56] 	Протеолиз провоспалительных цитокинов, что сдвигает воспалительную реакцию в сторону фазы пролиферации [7, 63]

Продолжение табл. 2

Медиаторы кардиальных ТК	Патология	Патогенетическое действие медиатора	Условно-адаптивные эффекты
	Фиброз миокарда	<ul style="list-style-type: none"> • Хемотаксис фибробластов [7, 11, 63] • Активация апоптоза КМЦ [1] • Деградация внеклеточного матрикса [11] 	Запуск дифференцировки фибробластов в миофибробласты [63, 65]
	Атеросклероз	<ul style="list-style-type: none"> • Индукция секреции ММП макрофагами и повреждение эндотелия [68, 69] • Митотическая активность фибробластов [68] • Индукция апоптоза эндотелиальных клеток [1, 53, 68] • Расщепление АпоА-I в ЛПВП [70] 	
Гепарин	Фиброз миокарда	<ul style="list-style-type: none"> • Запуск пролиферации фибробластов [7, 63] • Усиление пролиферативного эффекта фактора роста фибробластов [63, 65] 	
	Атеросклероз	<ul style="list-style-type: none"> • Перерождение макрофагов в пенные клетки [68] • Повышение устойчивости ЛПНП к окислению [68] 	Усиление миграции клеток эндотелия [68]
Брадикинин	Инфаркт миокарда	Активация продукции провоспалительных цитокинов в кардиальных ТК и хемотаксис других иммунных клеток [55]	Снижение экспрессии коллагена в кардиальных фибробластах и увеличение секреции ММП-2 и ММП-9 для ремоделирования матрикса миокарда [56]
Фактор роста фибробластов	Фиброз миокарда	Стимуляция пролиферации фибробластов [10, 63]	Трансформация фибробластов в миофибробласты
	Атеросклероз		Вызывает новообразование кровеносных сосудов в бляшке [1]
IL-1 β , TNF α , IL-6, IL4, IFN γ	Инфаркт миокарда	Активация воспалительного ответа, апоптоз КМЦ [1]	

Окончание табл. 2

Медиаторы кардиальных ТК	Патология	Патогенетическое действие медиатора	Условно-адаптивные эффекты
	Атеросклероз	<ul style="list-style-type: none"> • Стимуляция миграции нейтрофилов • Апоптоз эндотелиальных клеток и риск разрыва атеросклеротической бляшки [1, 10, 68] 	
VEGF-A, VEGF-C,	Инфаркт миокарда		Новообразование кровеносных и лимфатических сосудов [1, 57]
	Атеросклероз		Новообразование кровеносных сосудов в бляшке [1]
IL-10, IL-13, IL-37	Инфаркт миокарда		Сдвиг в сторону пролиферативной фазы воспалительной реакции [7]
Метаболиты арахидоновой кислоты	Атеросклероз	<ul style="list-style-type: none"> • Запуск ремоделирования сосудистой стенки [1] • Коронароспазм [1] 	

тельствах у пациентов с ИБС, исследователи предполагают, что ТК могут выступать терапевтическими мишенями коррекции состояния [49].

Гистамин ТК играет важную роль в нарушении работы сердца при развитии инфаркта миокарда: вместе с TNF α он увеличивает проницаемость эндотелия коронарных сосудов, запускает экспрессию молекул P- и E-селектинов и молекул адгезии ICAM-1, что обеспечивает инфильтрацию иммунными клетками очага поражения [7]. Через H₁-рецепторы на эндотелиальных клетках гистамин способствует выделению NO и модулирует тонус коронарных сосудов. А при связывании с H₁-рецепторами на гладкой мускулатуре гистамин, напротив, вызывает спазм коронарных сосудов, что дополнительно усиливает ишемическое воздействие на миокард и может привести к расширению зоны инфаркта [1, 31]. Через H₂-рецепторы на пейсмейкерных клетках сердца гистамин индуцирует тахикардию, а через H₁-рецепторы снижает скорость проведения возбуждения в атриовентрикулярном узле, что в купе является условием возникновения аритмии [31, 50–52]. В моделях острой ишемии сердца показано, что концентрация гистамина в крови артерии синусного узла значительно возрастает, что коррелирует с частотой развития желудочковых аритмий, а блокада H₂-рецепторов снижает их развитие [50–52]. Моделирование инфаркта на мышях с дефицитом ТК также показало увеличение выделения гистамина из сердца, что указывало на отличный от ТК источник гистамина. Опыты с нокаутом гена гистидин-декарбоксилазы, фермента биосинтеза гистамина, а также химическая симпатэктомия отменяли выраженное выделение

гистамина ишемизированным сердцем, указывая на его нейрогенное происхождение [50]. Таким образом, проаритмогенное действие гистамина может быть связано не только с увеличением числа активированных ТК в очаге поражения, но и с гиперактивацией симпатических влияний, наблюдаемой при инфаркте миокарда. Кроме того, гистамин кардиальных ТК участвует в ремоделировании миокарда. Блокада фамоти-дином H_2 -, но не H_1 -рецепторов при моделировании ишемии-реперфузии на собаках уменьшала размер инфаркта, хотя не приводила к функциональным улучшениям работы сердца [53]. Снижение числа ТК в миокарде после инфаркта в опытах на мышах с дефицитом ТК или применение стабилизаторов мембран ТК приводило к нарушению ремоделирования миокарда в зоне инфаркта: площадь поражения через 14 дней после инфаркта была увеличена, был дилатирован левый желудочек и уменьшена толщина пораженной стенки желудочка. Эти признаки связывали с нарушением рекрутирования миофибробластов, хотя объем жизнеспособного миокарда увеличился [53]. С другой стороны, активация ТК и индукция PAC после инфаркта запускает профибротическое ремоделирование сердечной ткани, что также сопровождается негативными последствиями для сердечной функции [15]. Таким образом, эти данные показывают, что кардиальные ТК включаются в регуляцию ремоделирования после инфаркта.

Протеазы кардиальных ТК: химаза, триптаза и другие – играют отдельную роль в развитии инфаркта, поскольку разрушают коллагеновый матрикс миокарда. Взаимодействие триптазы с PAR2-рецепторами на сенсорных нервных волокнах стимулирует высвобождение SP, тем самым повышая болевую чувствительность [10]. Также SP через рецепторы MRGPRX2 на самих ТК потенцирует секрецию ренина и химазы, которые через локальную PAC изменяют кровоснабжение миокарда в зоне инфаркта. Кроме того, SP может вовлекать в активацию дополнительные популяции ТК, что было показано в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [10, 28]. Взаимодействие триптазы с PAR2-рецепторами на КМЦ через PKA-зависимый внутриклеточный путь повышает чувствительность миофиламентов к Ca^{2+} и позволяет сохранить сократительный резерв сердца в постинфарктном периоде [1, 54]. Таким образом, протеазы кардиальных ТК могут играть и адаптивную роль при развитии инфаркта. Кроме того, кардиальные ТК могут высвобождать брадикинин, который стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов самими ТК и хемотаксис других иммунных клеток [55]. Через VK_2 -рецепторы к брадикинину происходит активация и дегрануляция ТК, высвобождение протеаз, активирующих локальную PAC. Химаза ТК может активировать калликреин, что еще больше увеличивает уровень брадикинина в тканях. Кроме того, через брадикинин возможно снижение мРНК коллагена I и III в кардиальных фибробластах, активации ММП через систему активатора плазминогена и усиление экспрессии ММП-2 и ММП-9 [56] и таким образом участие в ремоделировании матрикса миокарда.

Кардиальные ТК также являются источником ростовых факторов VEGF-A и VEGF-C, которые способствуют новообразованию кровеносных и лимфатических сосудов в миокарде, что необходимо для ремоделирования миокарда в пограничной инфарктной зоне и предотвращения ишемических событий [1]. Однако *de novo* формирующееся сосудистое русло характеризуется высокой проницаемостью, а значит, и повышенным риском образования отека миокарда. Отек может сдавливать питающие миокард кровеносные сосуды и вызывать вторичное нарушение перфузии ткани, в результате чего зона инфаркта расширяется и «поглощает» пограничный к зоне воспаления исходно незатронутый ишемией миокард [57].

Гибель части миокарда в результате инфаркта, изменение геометрии сокращения сердца, снижение насосной функции сердца рефлекторно активирует симпатический отдел ВНС [46, 58, 59]. Изменение ионного баланса вблизи симпатических терминалей увеличивает их возбудимость и высвобождение медиаторов норадреналина и гистамина. В физиологических условиях в ответ на секрецию нейромедиаторов активируются гомеостатические механизмы отрицательной обратной связи: через α_2 -

адренорецепторы и H_3 -рецепторы ограничивается секреция норадреналина и гистамина соответственно. Однако в условиях ишемии возможностей протективных механизмов может оказаться недостаточно. В экспериментах по моделированию инфаркта показано, что кардиальные ТК секретируют многочисленные протеазы [7, 28, 54], которые через локальную РАС потенцируют высвобождение норадреналина из симпатических терминалей [28, 58, 59]. В экспериментах на изолированных сердцах морских свинок и мышей после 20-минутной глобальной ишемии и последующей 30-минутной реперфузии в коронарных сосудах наблюдали увеличение в 6 раз содержания ренина и в 70 раз норадреналина, что в 100% случаев сопровождалось фибрилляцией желудочков длительностью в среднем около 6 мин [28]. Синтезируемый АП II способствует высвобождению норадреналина путем как классического экзоцитоза, так и через невезикулярный механизм, связанный с реверсией транспортеров обратного захвата норадреналина на пресинаптической мембране [1, 7, 54]. Дефицит ТК, применение препаратов кромолина или лодоксамида, стабилизирующих мембраны ТК, а также антагонистов AT_1R ослабляло выброс норадреналина и уменьшало частоту развития аритмии [28]. Активация симпатического отдела ВНС при развитии инфаркта миокарда направлена на восстановление насосной функции сердца: для нейтрализации кислородного долга в периферических тканях сердце начинает сокращаться с большей частотой и силой. Однако повышенные нагрузки на миокард дополнительно повреждают сердце и расширяют зону инфаркта. Таким образом, помимо изменения микроокружения и стимуляции кардиальных ТК, адаптивная активация симпатической системы при инфаркте миокарда будет вносить дополнительный негативный вклад в развитие инфаркта [46, 58, 59].

Показано, что повышенное количество ТК после инфаркта сохраняется в течение 4 недель – на протяжении всего срока ремоделирования миокарда. При этом ТК вносят свой вклад в повреждение миокарда, могут модулировать нервные влияния со стороны симпатического отдела ВНС и выполнять защитную функцию. Кардиальные ТК выступают источником противовоспалительных медиаторов IL-10 и IL-13, которые сдвигают ход воспалительной реакции в сторону пролиферативной фазы [7]. Кроме того, протеазы кардиальных ТК могут расщеплять пептидные связи провоспалительных цитокинов, в том числе TNF α и других сигнальных соединений белковой природы, а также усиливать биологическую активность противовоспалительного цитокина IL-37 [7].

Таким образом, инфаркт миокарда сопровождается изменением афферентной сигнализации, гибелью не только КМЦ, но и нервных клеток и последующим адапционным ремоделированием системы регуляции на уровне интракардиальной ИКНС, звездчатом ганглии, стволе головного мозга и выше. Показано, что в постинфарктный период происходит изменение размеров нервных клеток ИКНС. Также повышается возбудимость нейронов, изменяется эффективность синаптической передачи и медиаторный фенотип нейронов. Таким образом, реализуется общая реорганизация системы управления работой сердца, где важную роль играют кардиальные ТК. Ограниченные сократительные ресурсы инфарктного сердца, нарастающий кислородный долг в периферических тканях и изменение регуляторных влияний со стороны нервной системы приводят к общему напряжению систем организма, снижению адаптивного диапазона и разбалансировке. В конечном итоге это влечет за собой прогрессирование сердечной недостаточности, развитие повторных ишемических приступов, возникновение аритмий, которые могут быть причиной внезапной сердечной смерти.

Значение кардиальных ТК в развитии фиброза миокарда

Развитие инфаркта миокарда сопровождается воспалительным процессом в сердце, направленным на зачистку ткани от погибших клеток и внеклеточного матрикса и подготовку к пролиферативной фазе заживления ткани [60, 61]. Поскольку миокард обладает незначительной регенеративной способностью, то инфаркт приводит к развитию

репаративного фиброза, сопряженного с систолической и диастолической дисфункцией, повышенным риском возникновения аритмий и неблагоприятным прогнозом для жизни [45, 57, 60, 61].

Кардиальные ТК участвуют в формировании фиброза миокарда: они регулируют формирование внеклеточного матрикса, способны прямо и опосредованно влиять на фибробласты (табл. 2). Так, гистамин ТК стимулирует пролиферацию фибробластов [61, 62, 63]. У мышей с делецией гена H_2 -рецепторов к гистамину трансортальное сужение в меньшей степени потенцировало развитие фиброза, чем у мышей дикого типа [64]. Гепарин в малых концентрациях и карбоксипептидаза АЗ также увеличивают пролиферацию фибробластов и усиливают пролиферативный эффект фактора роста фибробластов (FGF2), синтезируемого кардиальными ТК [63]. Цитокин TGF β 1, являющийся маркером фиброза и запасаемый в гранулах ТК, способен модулировать фенотип и пролиферацию фибробластов. Протеазы триптаза и химаза, фактор роста тромбоцитов, PDGF-A, а также TNF α , секретируемые ТК, также способны влиять на ремоделирование ткани миокарда и стимулировать фиброз [11].

Исследования препаратов сердца человека, а также в экспериментах у крыс демонстрируют значимую корреляцию степени фибротических изменений в сердце, уровня TGF β 1 и коллагена III с количеством кардиальных ТК и степенью их дегрануляции [62]. Применение кромолина, стабилизатора мембран ТК, существенно снижало уровень TGF β 1 и выраженность фиброза в миокарде крыс. В экспериментах на спонтанно-гипертензивных крысах применение недокромила, стабилизатора мембран ТК, также значительно снижало фиброз миокарда из-за предотвращения рекрутирования макрофагов в сердце, что сопровождалось нормализацией уровня цитокинов INF- γ , IL-4, IL-6 и IL-10 [11]. Одновременная блокада химазы ТК и катепсина G с помощью препарата DCCI также предотвращало развитие фиброза [65].

Медиаторы кардиальных ТК: химаза, триптаза, TGF β 1 и гистамин активируют пролиферацию и активацию фибробластов и образование коллагена в матриксе ремоделирующего миокарда [7, 11, 63]. Триптаза и химаза ТК также усиливают хемотаксис фибробластов, их подвижность [63]. Химаза также активирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты, т. е. последние начинают экспрессировать сократительные белки, например, α -гладкомышечный актин, и участвовать в репарации ткани миокарда [65]. В низких концентрациях химаза вызывает пролиферацию фибробластов, а в высоких, напротив, активирует апоптоз КМЦ, поэтому ее вклад в ремоделирование миокарда неоднозначен. Химаза ТК опосредует развитие фиброза в миокарде через продукцию АТФ в локальной РАС и образование TGF β 1 кардиальными фибробластами [11]. А TGF β 1 повышает синтез ингибиторов тканевых протеаз, например, ММП-1, что способствует сохранению коллагенового матрикса во время ремоделирования миокарда [60]. Показано, что химаза ТК также участвует в деградации некоторых цитокинов IL-5, IL-6, IL-13, усиливает эффекты IL-33, что приводит к изменению микроокружения в очаге заживления [63]. Триптаза кардиальных ТК также стимулирует фибробласты уже через 24 ч, а увеличивает синтез внеклеточного матрикса через 72 ч после воздействия. Позже было показано, что эффекты триптазы на фибробласты опосредованы активацией PAR2 и индукцией митогенактивируемого протеинкиназного пути MAP-киназы с ERK1/2, который также задействован в преобразовании фибробластов в миофибробласты. Другими факторами, способствующими трансформации фибробластов в миофибробласты, являются основной фактор роста фибробластов из гранул ТК, экспрессия и отложение фибронектина и матрицеллюлярных белков матрикса, повышенная механическая нагрузка, вызванная нарушением нормальной матричной сети и отсутствие в микроокружении провоспалительных медиаторов, таких как IL-1 β , которые ингибируют этот процесс [60].

Активированные фибробласты, в свою очередь, продуцируют фактор стволовых клеток (SCF), который через рецептор c-kit поддерживает рост и дифференцировку

ТК. Кардиальные ТК сами продуцируют SCF и пролиферируют под его воздействием, что в конечном итоге способствует формированию фиброза в сердце [7]. Однако гиперпродукция коллагена и избыточный фиброз матрикса миокарда может ограничить сократительную функцию сердца и привести к хронической сердечной недостаточности.

Особенность репаративного процесса в миокарде связана с ритмическим сокращением сердца и повышенной нагрузкой как на поврежденную ткань, так и ткань, незатрогнутую повреждением. Поэтому активируются и процессы перестройки внеклеточного матрикса, которая осуществляется латентной системой матричных металлопротеиназ (ММП) [45]. ММП обеспечивают быструю деградацию коллагена, на месте которого фибробласты формируют новый, устойчивый к увеличенным нагрузкам внеклеточный матрикс. Кардиальные ТК за счет высвобождения своих протеаз, а также TNF- α принимают непосредственное участие в этом процессе. Триптаза активирует интерстициальную коллагеназу (ММП-1), а химаза способна активировать ММП-2 и -9, способствующие деградации внеклеточного матрикса [63]. Кроме того, сами ТК способны синтезировать матричные металлопротеиназы стромелизин (ММП-3) и ММП13.

При моделировании хронической объемной перегрузки желудочков сердца, сопровождающейся перестройкой внеклеточного матрикса, обнаружено повышение плотности ТК, увеличение активности ММП-2 и деградация внеклеточного коллагенового матрикса на 50–60% уже на 3-и – 5-е сутки после установки аорто-кавальной фистулы [53]. Применение недокромила, стабилизатора мембран ТК, снижает гипертрофию, дилатацию и растяжимость левого желудочка, что сопровождалось лучшей выживаемостью животных. Дефицит ТК у генетически-модифицированных линий мышей или применение стабилизаторов мембран ТК, например, кромолина, предотвращает нежелательные профибротические изменения в миокарде. Получается, что с одной стороны, кардиальные ТК через активацию ММП разрушают коллагеновую сеть ремоделированной ткани, а с другой – способствуют развитию дилатационной кардиомиопатии [7]. Кроме того, ремоделирование ткани миокарда сопровождается и перестройкой регуляторных влияний ВНС. Учитывая тесное морфологическое соседство и функциональное взаимодействие кардиальных ТК и симпатических нервных терминалей, были обнаружены исследования на тему их связи с развитием фибротических изменений в сердце. Применение нейротоксина – 6-гидроксидофамина (6-OHDA) – у крыс приводило к химической симпатэктомии, которая значительно увеличивала плотность ТК и долю дегранулирующих ТК [29]. Хроническое применение 6-OHDA приводило к повышенному отложению коллагена в миокарде и развитию интерстициального фиброза. Применение пропранолола, неселективного β -адреноблокатора, также вызывало увеличение активности ТК, но с меньшей степенью приводило к отложению коллагена по сравнению с химической симпатэктомией. Эти эксперименты указывают на связь кардиальных ТК, катехоламинергической системы и отложения коллагена в ткани сердца.

Таким образом, кардиальные ТК задействованы в ремоделировании миокарда, однако их роль неоднозначна. Во-первых, это связано как с патогенетическим, так и с адаптивным значением медиаторов ТК. Во-вторых, с тем, что созревание кардиальных ТК и формирование их определенного фенотипа зависит от факторов окружения, а фенотип кардиальных ТК определяет их функциональную роль в процессе. В-третьих, взаимодействие медиаторов ТК с симпатическими терминалями модифицирует нейрональное ремоделирование ткани миокарда. От тонкого баланса регуляторных влияний кардиальных ТК критически зависят особенности ремоделирования миокарда после инфаркта и сохранность сердечной функции.

Кардиальные ТК в развитии атеросклероза

Атеросклероз представляет собой «тлеющий» хронический воспалительный процесс в сосудистой стенке с одновременным протеканием фаз альтерации, экссудации и пролиферации [1]. Кардиальные ТК, расположенные вдоль русла коронарных сосудов, участвуют во всех стадиях атерогенеза [66] (табл. 2). У пациентов с атеросклерозом, умерших от коронарной недостаточности, было показано увеличение кардиальных ТК в биоптатах и их скопление вблизи атеросклеротических бляшек [1, 53, 67]. Показано, что гепарин ТК взаимодействует с апоВ-100 на поверхности липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), после чего нейтральные протеазы, химаза и карбоксипептидаза А разрушают гидрофильную протеиновую оболочку ЛПНП, а оставшееся липидное ядро поглощается макрофагами. Накопление эфиров холестерина в макрофагах приводит к их перерождению в пенные клетки. Кроме того, гепарин может образовывать большие нерастворимые комплексы с ЛПНП, которые затем также поглощаются макрофагами [68]. Взаимодействие ЛПНП с гепарином и протеазами ТК повышает устойчивость первых к окислению и к утилизации клетками эндотелия. Кроме того, активированные ТК стимулируют миграцию нейтрофилов к очагам воспаления в сосудистой стенке через продукцию воспалительных цитокинов IL-6, IL4, TNF- α и IFN γ , что приводит к разрушению структуры и дестабилизации атеросклеротических бляшек [68].

Другие медиаторы ТК: гистамин, триптаза, протеогликаны [66–68] также задействованы в атерогенезе. Триптаза, лейкотриены и гистамин ТК обладают митогенными факторами для фибробластов. В результате их активации происходит разрастание структуры бляшки: она на 30% процентов массы состоит из белков, половину из которых составляет коллаген. Также гистамин ТК через H₁-рецепторы увеличивает проницаемость эндотелия для частиц ЛПНП и липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [68]. Триптаза участвует в метаболизме ЛПВП. Показано, что уровень триптазы в сыворотке крови выше у пациентов с ишемической болезнью сердца по сравнению со здоровыми людьми [68, 69]. Кроме того, триптаза индуцирует секрецию ММП макрофагами и активацию ММП, что дестабилизирует атеросклеротическую бляшку [68]. А ММП повреждают эндотелий, что приводит к агрегации тромбоцитов и спазму коронарных сосудов в очаге воспаления. Эндотелиальные клетки продуцируют тканевой фактор, вызывающий некроз пенных клеток. Химаза и TNF- α , выделяемые активированными ТК, индуцируют апоптоз эндотелиальных клеток, в результате чего может быть инициирован разрыв атеросклеротической бляшки [1, 53, 68]. В исследованиях на линии мышей ApoE2/2 показано, что введение активаторов ТК сопровождалось меньшей стабильностью атеросклеротических бляшек, тогда как стабилизаторы ТК уменьшали количество нестабильных поражений [68]. Эпизоды системной активации ТК во время прогрессирования атеросклероза у мышей с дефицитом ApoE приводят к значительному разрастанию бляшки. Целенаправленная активация периваскулярных ТК увеличивает частоту кровоизлияний внутри бляшек, апоптоза макрофагов, экстравазации сосудов и опосредованного CXCR2/VLA-4 рекрутирования лейкоцитов в бляшку. Применение кромолина, стабилизатора ТК, предотвращало неблагоприятные эффекты на состояние атеросклеротической бляшки, вызванные активацией ТК.

Увеличение толщины стенки сосуда в результате образования в ней атеросклеротических изменений приводит к гипоксии внутренних слоев, в результате чего ТК индуцируют высвобождение ростовых факторов VEGF-A, bFGF, запускают новообразование кровеносных сосудов и привлекают в очаг ремоделирования фибробласты, в результате чего структура атеросклеротической бляшки становится рыхлой и потенциально нестабильной [68]. Новообразованные сосуды с незрелой базальной мембраной способствуют утечке протеаз и других сигнальных факторов ТК в глубокие слои атеросклеротических отложений, повреждению их структуры, возникновению кровоизлияний и микротромбов [1]. Считается, что TNF- α , продуцируемый ТК, также выполняет роль стимулятора ангиогенеза. Есть данные, что клеточные гранулы ТК

и гистамин стимулируют пролиферацию клеток эндотелия, а гепарин стимулирует их миграцию. Эти эффекты медиаторов указывают на защитную роль ТК от гипоксии. Однако в других экспериментах на изолированных сердцах было показано, что химаза активированных ТК способна расщеплять АпоА-I – основной белок ЛПВП, обладающий кардиопротекторным действием [70]. Позже в экспериментах *in vitro* показано, что продукт протеолиза под действием химазы, укороченный с С-конца АпоА-I, хуже стимулировал миграцию эндотелиальных клеток коронарной артерии человека в исследовании репарационных процессов ран. Таким образом, кардиальные ТК могут осложнять репарацию поврежденного эндотелия сосудов, способствовать агрегации тромбоцитов и коронарному спазму.

ТК через секрецию вазоконстриктора PgD_2 и в комплексе с атеросклерозом могут провоцировать резкое ухудшение перфузии тканей сердца и развитие ишемии. Через липоксигеназный путь и синтез лейкотриенов ТК способны модулировать активность фибробластов, что приводит к ремоделированию сосудистой стенки и затрагивает внеклеточный матрикс КМЦ. В посмертных исследованиях коронарных сосудов пациентов показано, что кроме PgD_2 и лейкотриенов, эти сосуды интенсивно окрашиваются на гистамин, который также задействован в реализации коронарного спазма [1].

Роль нейрогенного компонента в активации кардиальных ТК и атеросклерозе также интенсивно изучается. Так, например, было показано, что стресс стимулирует ТК через активацию высокоаффинных поверхностных рецепторов к кортикотропин-рилизинг гормону (КРГ), что приводит к зависимому от КРГ увеличению уровня IL-6 в сыворотке [71]. Нейротензин, секретируемый из периферических нервов, усиливает эффект КРГ и стимулирует кардиальные ТК к секреции гистамина и IL-6, уровень которого повышен при остром коронарном синдроме и является независимым фактором риска ишемии миокарда [47]. Кроме того, нейротензин способен сам провоцировать коронарный спазм и препятствовать кровотоку, необходимому для обеспечения высоких метаболических потребностей миокарда. Кардиальные ТК сами могут выступать источниками КРГ и укортина, которые индуцируют высвобождение IL-6 из КМЦ. А наличие атеросклероза увеличивает риск активации кардиальных ТК за счет стимулирующего действия липопротеинов и адипоциткинов. Нейрогенное воспаление, вызванное продукцией SP и активацией рецептора нейрокина 1 на эндотелиальных клетках, независимо от эффектов гистамина на проницаемость сосудов, способствует дополнительному повреждению эндотелия и дисфункции сосудов. Кроме того, инфузия SP в экспериментах приводила к повышению количества и активации адвентициальных ТК, что приводило к повышенному кровоизлиянию в атеросклеротических бляшках. Применение антагонистов рецепторов к SP или врожденный дефицит ТК у мышей отменяли наблюдаемые эффекты [72]. Следовательно, состояние нервной системы прямо влияет на активность ТК и риски возникновения осложнений атеросклероза.

Таким образом, кардиальные ТК в патогенезе атеросклероза могут выступать в качестве проатерогенных участников, а также выполнять защитную функцию по ликвидации ишемических зон атеросклеротической бляшки, что в конечном счете приводит к ее дестабилизации, риску отрыва и эмболии сосуда. Исследование функционального фенотипа кардиальных ТК на разных стадиях атерогенеза может иметь перспективное значение для поиска мишеней для фармакологического воздействия. Другим важным фактором, определяющим фенотип ТК, могут выступать нейрогенные влияния ВНС.

Патогенез заболеваний сердечно-сосудистой системы нередко сопровождается изменением регуляторных влияний ВНС в сторону преобладания вклада симпатического отдела ВНС [38–41]. Кроме того, ВНС оказывает регуляторное воздействие на реализацию иммунных функций, которые сопровождают любое повреждение клеточных элементов [19]. Высвобождение цитокинов и других медиаторов воспаления воспринимается местными афферентными волокнами, которые в составе блуждающего нерва несут информацию в продолговатый мозг, в центры гипоталамо-гипофизарно-надпо-

чечниковой системы, в передний мозг и на эфферентные преганглинарные нейроны парасимпатического отдела ВНС. Через высвобождение ацетилхолина и его взаимодействие с α_n AChR происходит подавление экспрессии и высвобождения провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6 и переключение провоспалительного ответа на процессы пролиферации. Интересно, что ТК экспрессируют на своей поверхности целый спектр рецепторов к ацетилхолину: как инотропные, так и метаботропные изоформы [35]. Таким образом, ремоделирование вегетативных влияний на сердце, происходящее во время инфаркта миокарда, предположительно может по-разному отражаться на деятельности местных кардиальных ТК. По результатам нашего исследования было показано, что после моделирования инфаркта на всех сроках опыта количество ТК отличалось у крыс с разным типом вегетативной регуляции, а исходный тип вегетативной регуляции определял выживаемость и регуляторное ремоделирование сердечной функции у крыс [43].

Кардиальные ТК – как терапевтические мишени заболеваний сердца

Многочисленные эксперименты на животных, посвященные роли ТК в развитии патологий сердца, представленные в нашем обзоре литературы, указывают на важную роль кардиальных ТК на всех стадиях развития кардиальных заболеваний. Применение блокаторов кардиальных ТК на начальных этапах развития патологии сопровождалось, как правило, снижением патогенетического влияния начальных фаз воспалительного ответа, но приводило к нарушению и отставленной пролиферативной фазы, что также имело негативные последствия. Таким образом, блокада кардиальных ТК, например, через ингибирование c-kit или SCF или ингибирование рецепторов активации и дегрануляции ТК скорее всего не должна быть оправдана и может нести очень отдаленные последствия.

Более тонким инструментом воздействия может выступать блокировка эффектов отдельных медиаторов ТК. Например, для терапии острого инфаркта миокарда вследствие развития аллергической реакции (синдром Куниса) применяют антигистаминные препараты и гидрокортизон (73, 74). Однако на мышах с дефицитом гистидин-декарбоксилазы после инфаркта миокарда показана повышенная смертность, нарушение ремоделирования ткани сердца и склонность к фибротическому поражению миокарда [50, 53, 75]. В этом случае гистамин оказывал защитное действие, модулируя сердечный фиброз и ремоделируя постинфарктный миокард [15, 75]. Подобные исследования еще раз указывают на ключевую роль ТК в координации функций многих клеток, особенно при развитии патологического процесса.

Мы предполагаем, что при оценке состояния пациента необходимо учитывать не только возможные патогенетические эффекты отдельных медиаторов ТК, но и фазу заболевания, в зависимости от которой меняется профиль секретлируемых медиаторов. Кроме того, следует учесть тот факт, что привлеченные в очаг иммунные клетки могут так же, как и ТК синтезировать и секретировать провоспалительные медиаторы и другие важные факторы.

Кардиальные ТК как главные координаторы воспалительного ответа, сопровождающего развитие многих заболеваний сердца, могут выступать в качестве потенциальной терапевтической мишени. Однако результаты многочисленных экспериментов показывают, насколько важной и сложной является их координирующая роль и насколько взвешанным и обдуманым должен стать выбор схемы терапевтического вмешательства со стороны врача.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТК являются ключевыми клетками всех тканей организма, они сопровождают процессы его жизнедеятельности от эмбрионального периода развития до смерти. Уникальное расположение ТК вдоль нервов и кровеносных и лимфатических сосудов

позволяет им управлять потоками сигнальной информации и корректировать свою секреторную активность в ответ на изменение микроокружения. Таким образом, ТК являются связующим звеном коммуникации нервной, эндокринной систем и ткани, а в случае развития патологического процесса – важным регулятором инициации и развития воспалительного процесса и ремоделирования ткани как структурного, функционального, так и регуляторного со стороны ВНС.

ТК являются источником цитокинов воспаления, спектр которых изменяется в зависимости от стадии процесса. Реакция воспаления лежит в основе многих заболеваний, является врожденным адаптивным ответом на повреждение ткани и направлена на удаление патогена и восстановление целостности ткани. Ярким примером воспалительного ответа с разной динамикой процесса и различной ролью ТК служат распространенные сердечно-сосудистые заболевания, которые существенно осложняют качество жизни пациента и связаны с риском для жизни. Воспалительная составляющая при таких заболеваниях в определенной степени обязана кардиальным ТК. Терапевтические подходы, влияющие на активность ТК, могут оказаться перспективными в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому находятся в фокусе внимания ученых и клиницистов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея написания обзора (М. П. М.), поиск и анализ литературных источников на тему обзора (М. П. М., А. Д. К., Б. А. У.), написание и редактирование манускрипта (М. П. М., А. Д. К., Б. А. У.), окончательный дизайн и одобрение финальной версии (А. Д. К., Б. А. У.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова, Института регенеративной медицины Первого московского медицинского университета им. И.М. Сеченова, Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Varricchi G, Rossi FW, Galdiero MR, Granata F, Criscuolo G, Spadaro G, de Paulis A, Marone G* (2019) Physiological Roles of Mast Cells: Collegium Internationale Allergologicum Update 2019. *Int Arch Allergy Immunol* 179(4): 247–261. <https://doi.org/10.1159/000500088>
2. *Elieh Ali Komi D, Wohrl S, Bielory L* (2020) Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 58(3): 342–365. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08769-2>
3. *Zhang Z, Ernst PB, Kiyono H, Kurashima Y* (2022) Utilizing mast cells in a positive manner to overcome inflammatory and allergic diseases. *Front Immunol* 13: 937120. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.937120>
4. *Nilsson G, Dahlin JS* (2019) New insights into the origin of mast cells. *Allergy* 74(4): 844–845. <https://doi.org/10.1111/all.13668>
5. *Dahlin JS, Maurer M, Metcalfe DD, Pejler G, Sagi-Eisenberg R, Nilsson G* (2022) The ingenious mast cell: Contemporary insights into mast cell behavior and function. *Allergy* 77(1): 83–99. <https://doi.org/10.1111/all.14881>
6. *Григорьев ИП, Коржевский ДЭ* (2021) Современные технологии визуализации тучных клеток для биологии и медицины (обзор). *Совр технол в мед* 13(4): 93–109. [Grigorev IP,

- Korzhevskii DE* (2021) Modern imaging technologies of mast cell for biology and medicine (review). *Modern Technol Med* 13(4): 93–109. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10>
7. *Jin J, Jiang Y, Chakrabarti S, Su Z* (2022) Cardiac Mast Cells: A Two-Head Regulator in Cardiac Homeostasis and Pathogenesis Following Injury. *Front Immunol* 13: 963444.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963444>
 8. *Da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C* (2014) Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 62(10): 698–738.
<https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
 9. *Vukman KV, Forsonits A, Oszvald A, Tyth EA, Buzas EI* (2017) Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol* 67: 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.02.002>
 10. *Levick SP, Brower GL, Janicki J* (2019) Substance P-mediated cardiac mast cell activation: An *in vitro* study. *Neuropeptides* 74: 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.01.002>
 11. *Levick SP, Widiapradja A* (2018) Mast Cells: Key Contributors to Cardiac Fibrosis. *Int J Mol Sci* 19(1): 231.
<https://doi.org/10.3390/ijms19010231>
 12. *He A, Fang W, Zhao K, Wang Y, Li J, Yang C, Benadjaoud F, Shi GP* (2019) Mast cell-deficiency protects mice from streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Transl Res* 208: 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.01.005>
 13. *He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X* (2012) Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Mol Med* 18(1): 1–9.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00225>
 14. *Ahmad S, Wright KN, Sun X, Groban L, Ferrario CM* (2019) Mast cell peptidases (carboxypeptidase A and chymase)-mediated hydrolysis of human angiotensin-(1-12) substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 518(4): 651–656.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.098>
 15. *Zhang X, Shao C, Cheng S, Zhu Y, Liang B, Gu N* (2021) Effect of Guanxin V in animal model of acute myocardial infarction. *BMC Complement Med Ther* 21(1): 72.
<https://doi.org/10.1186/s12906-021-03211-7>
 16. *Kritas SK, Caraffa A, Antinolfi P, Saggini A, Pantalone A, Rosati M, Tei M, Speziali A, Saggini R, Pandolfi F, Cerulli G, Conti P* (2014) Nerve growth factor interactions with mast cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 27(1): 15–19.
<https://doi.org/10.1177/039463201402700103>
 17. *Forsythe P* (2019) Mast Cells in Neuroimmune Interactions. *Trends Neurosci* 42(1): 43–55.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.006>
 18. *Carthy E, Ellender T* (2021) Histamine, Neuroinflammation and Neurodevelopment: A Review. *Front Neurosci* 15: 680214.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.680214>
 19. *Li F, Yu R, Sun X, Chen X, Xu P, Huang Y, Huang S, Xue Y, Fu T, Liu J, Li Z* (2022) Autonomic nervous system receptor-mediated regulation of mast cell degranulation modulates the inflammation after corneal epithelial abrasion. *Exp Eye Res* 219: 109065.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109065>
 20. *Чумасов ЕИ, Петрова ЕС, Коржевский ДЭ* (2021) Морфологические признаки нейрогенного воспаления в сердце крыс при старении. *Успехи геронтол* 34(6): 831–841. [*Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii DE* (2021) Morphological signs of neurogenic inflammation in the heart of rats during aging. *Uspehi gerontol* 34(6): 831–841. (In Russ)].
 21. *Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP* (2008) Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 123(3): 398–410.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02705.x>
 22. *Siiskonen H, Harvima I* (2019) Mast Cells and Sensory Nerves Contribute to Neurogenic Inflammation and Pruritus in Chronic Skin Inflammation. *Front Cell Neurosci* 13: 422.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00422>
 23. *Suzuki A, Suzuki R, Furuno T, Teshima R, Nakanishi M* (2004) N-cadherin plays a role in the synapse-like structures between mast cells and neurites. *Biol Pharm Bull* 27(12): 1891–1894.
<https://doi.org/10.1248/bpb.27.1891>
 24. *Wilhelm M, Silver R, Silverman AJ* (2005) Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. *Eur J Neurosci* 22(9): 2238–2248.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04429.x>
 25. *Greenberg G, Burnstock G* (1983) A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. *Exp Cell Res* 147(1): 1–13.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90265-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90265-3)

26. *Ardell JL, Armour JA* (2016) Neurocardiology: Structure-Based Function. *Compr Physiol* 6(4): 1635–1653.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150046>
27. *Li F, Wang F* (2021) TRPV1 in Pain and Itch. *Adv Exp Med Biol* 1349: 249–273.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-4254-8_12
28. *Morrey C, Brazin J, Seyedi N, Corti F, Silver RB, Levi R* (2010). Interaction between sensory C-fibers and cardiac mast cells in ischemia/reperfusion: activation of a local renin-angiotensin system culminating in severe arrhythmic dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 76–84.
<https://doi.org/10.1124/jpet.110.172262>
29. *Facoetti A, Fallarini S, Miserere S, Bertolotti A, Ferrero I, Tozzi R, Gatti C, Palladini G, Perlini S, Nano R* (2006) Histochemical study of cardiac mast cells degranulation and collagen deposition: interaction with the catecholaminergic system in the rat. *Eur J Histochem* 50(2): 133–140.
30. *Reid AC, Brazin JA, Morrey C, Silver RB, Levi R* (2011) Targeting cardiac mast cells: pharmacological modulation of the local renin-angiotensin system. *Curr Pharm Des* 17(34): 3744–3752.
<https://doi.org/10.2174/138161211798357908>
31. *Levick SP* (2022) Histamine receptors in heart failure. *Heart Fail Rev* 27(4): 1355–1372.
<https://doi.org/10.1007/s10741-021-10166-x>
32. *Li M, Luo X, Chen L, Zhang J, Hu J, Lu B* (2003) Co-localization of histamine and dopamine-beta-hydroxylase in sympathetic ganglion and release of histamine from cardiac sympathetic terminals of guinea-pig. *Auton Autacoid Pharmacol* 23(5-6): 327–333.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2004.00305.x>
33. *Winbo A, Ashton JL, Montgomery JM* (2020) Neuroscience in the heart: Recent advances in neurocardiac communication and its role in cardiac arrhythmias. *Int J Biochem Cell Biol* 122: 105737.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105737>
34. *Hanna P, Rajendran PS, Ajjola OA, Vaseghi M, Andrew Armour J, Ardell JL, Shivkumar K* (2017) Cardiac neuroanatomy – Imaging nerves to define functional control. *Auton Neurosci* 207: 48–58.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.07.008>
35. *Shi L, Xu H, Wu Y, Li X, Zou L, Gao J, Chen H* (2017) Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors involve the imidacloprid-induced inhibition of IgE-mediated rat and human mast cell activation. *RSC Adv* 7: 51896–51906.
<https://doi.org/10.1039/C7RA07862E>
36. *Duraes Campos I, Pinto V, Sousa N, Pereira VH* (2018) A brain within the heart: A review on the intracardiac nervous system. *J Mol Cell Cardiol* 119: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.04.005>
37. *Powers MJ, Peterson BA, Hardwick JC* (2001) Regulation of parasympathetic neurons by mast cells and histamine in the guinea pig heart. *Auton Neurosci* 87(1): 37–45.
[https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00260-5)
38. *Alfonso A, Le Sueur ANV, Geraldès SS, Guimaraes-Okamoto PTC, Tsunemi MH, Santana DF, Ribeiro VRF, Melchert A, Chiacchio SB, Lourenco MLG* (2020) Heart Rate Variability and Electrocardiographic Parameters Predictive of Arrhythmias in Dogs with Stage IV Chronic Kidney Disease Undergoing Intermittent Haemodialysis. *Animals (Basel)* 10(10): 1829.
<https://doi.org/10.3390/ani10101829>
39. *Pongkan W, Jitnapakarn W, Phetnoi W, Punyapornwithaya V, Boonyapakorn C* (2020) Obesity-Induced Heart Rate Variability Impairment and Decreased Systolic Function in Obese Male Dogs. *Animals (Basel)* 10(8): 1383.
<https://doi.org/10.3390/ani10081383>
40. *Chang YT, Huang WC, Cheng CC, Ke MW, Tsai JS, Hung YM, Huang NC, Huang MS, Wann SR* (2020) Effects of epinephrine on heart rate variability and cytokines in a rat sepsis model. *Bosn J Basic Med Sci* 20(1): 88–98.
<https://doi.org/10.17305/bjbm.2018.3565>
41. Biering-Sorensen F, Biering-Sorensen T, Liu N, Malmqvist L, Wecht JM, Krassioukov A (2018) Alterations in cardiac autonomic control in spinal cord injury. *Auton Neurosci* 209: 4–18.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.02.004>
42. *Flood S, Tordoff C* (2020) A new heart for organ donation after circulatory death. *BJA Educ* 20(4): 126–132.
<https://doi.org/10.1016/j.bjae.2019.12.004>
43. *Morozova MP, Kurenkova AD, Volkova JuL, Berdalin AB, Banzeluk EN, Umarova BA, Lukoshkova EV, Gavrilova SA* (2023) The Initial Autonomic Tone Determines the Progress of Irreversible Myocardial Ischemia in Rats. *Biol Bull* 50(3): 437–448.
<https://doi.org/10.1134/S106235902270011X>

44. *Simões FC, Riley PR* (2022) Immune cells in cardiac repair and regeneration. *Development* 149(8): dev199906.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664457>
45. *Janicki JS, Brower GL, Levick SP* (2015) The emerging prominence of the cardiac mast cell as a potent mediator of adverse myocardial remodeling. *Methods Mol Biol* 1220: 121–139.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_8
46. *Elia A, Fossati S* (2023) Autonomic nervous system and cardiac neuro-signaling pathway modulation in cardiovascular disorders and Alzheimer's disease. *Front Physiol* 14: 1060666.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1060666>
47. *Alevizos M, Karagkouni A, Panagiotidou S, Vasiadi M, Theoharides TC* (2014) Stress triggers coronary mast cells leading to cardiac events. *Ann Allergy Asthma Immunol* 112(4): 309–316.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.09.017>
48. *Xiong W, Zhou R, Qu Y, Yang Y, Wang Z, Song N, Liang R, Qian J* (2021) Dexmedetomidine preconditioning mitigates myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibition of mast cell degranulation. *Biomed Pharmacother* 141: 111853.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111853>
49. *Galagudza MM, Sonin DL, Pochkaeva EI* (2018) The no-reflow phenomenon: mechanisms and therapeutic targets. *Region Blood Circulat and Microcirculat* 17(1): 5–12.
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2018-17-1-5-12>
50. *He GH, Xu GL, Cai WK, Zhang J* (2016) Is Histamine H2 Receptor a Real Promising Target for Prevention or Treatment of Heart Failure? *J Am Coll Cardiol* 68(18): 2029.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.06.078>
51. *Huang YH, Cai WK, Yin SJ, Wang P, Li ZR, Yang Q, Zhou T, Meng R, Yang M, Guo Y, He GH* (2022) Histamine H2 receptor antagonist exposure was related to decreased all-cause mortality in critical ill patients with heart failure: a cohort study. *Eur J Prev Cardiol* 29(14): 1854–1865.
<https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac122>
52. *Meng R, Chen LR, Zhang ML, Cai WK, Yin SJ, Fan YX, Zhou T, Huang YH, He GH* (2023) Effectiveness and Safety of Histamine H2 Receptor Antagonists: An Umbrella Review of Meta-Analyses. *J Clin Pharmacol* 63(1): 7–20.
<https://doi.org/10.1002/jcph.2147>
53. *Levick SP, Meléndez GC, Plante E, McLarty JL, Brower GL, Janicki JS* (2011) Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 89(1): 12–19.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq272>
54. *Ngkelo A, Richart A, Kirk JA, Bonnin P, Vilar J, Lemitre M, Marck P, Branchereau M, Le Gall S, Renault N, Guerin C, Ranek MJ, Kervadec A, Danelli L, Gautier G, Blank U, Launay P, Camerer E, Bruneval P, Menasche P, Heymes C, Luche E, Casteilla L, Cousin B, Rodewald HR, Kass DA, Silvestre JS* (2016) Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J Exp Med* 213(7): 1353–1374.
<https://doi.org/10.1084/jem.20160081>
55. *Wei CC, Chen Y, Powell LC, Zheng J, Shi K, Bradley WE, Powell PC, Ahmad S, Ferrario CM, Dell'Italia LJ* (2012) Cardiac kallikrein-kinin system is upregulated in chronic volume overload and mediates an inflammatory induced collagen loss. *PLoS One* 7(6): e40110.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040110>
56. *Sharma JN* (2005) The kallikrein-kinin system: from mediator of inflammation to modulator of cardioprotection. *Inflammopharmacology* 12(5-6): 591–596.
<https://doi.org/10.1163/156856005774382760>
57. *Li Y, Sun X, Juan Z, Guan X, Wang M, Meng Y, Ma R* (2022) Propofol pretreatment alleviates mast cell degranulation by inhibiting SOC to protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother* 150: 113014.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113014>
58. *Goldberger JJ, Arora R, Buckley U, Shivkumar K* (2019) Autonomic Nervous System Dysfunction: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol* 73(10): 1189–1206.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.064>
59. *Stoyek MR, Hortells L, Quinn TA* (2021) From Mice to Mainframes: Experimental Models for Investigation of the Intracardiac Nervous System. *J Cardiovasc Dev Dis* 8(11): 149.
<https://doi.org/10.3390/jcdd8110149>
60. *Frangogiannis NG* (2019) Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med* 65: 70–99.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.07.001>
61. *Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, Ryabov V* (2021) Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front Immunol* 12: 664457.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664457>

62. *Palaniyandi Selvaraj S, Watanabe K, Ma M, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y* (2005) Involvement of mast cells in the development of fibrosis in rats with postmyocarditis dilated cardiomyopathy. *Biol Pharm Bull* 28(11): 2128–2132.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.2128>
63. *Bradding P, Pejler G* (2018) The controversial role of mast cells in fibrosis. *Immunol Rev* 282(1): 198–231.
<https://doi.org/10.1111/imr.12626>
64. *Zeng Z, Shen L, Li X, Luo T, Wei X, Zhang J, Cao S, Huang X, Fukushima Y, Bin J, Kitakaze M, Xu D, Liao Y* (2014) Disruption of histamine H2 receptor slows heart failure progression through reducing myocardial apoptosis and fibrosis. *Clin Sci* 127: 435–448.
<https://doi.org/10.1042/CS20130716>
65. *Hooshdaran B, Kolpakov MA, Guo X, Miller SA, Wang T, Tilley DG, Rafiq K, Sabri A* (2017) Dual inhibition of cathepsin G and chymase reduces myocyte death and improves cardiac remodeling after myocardial ischemia reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 112(6): 62.
<https://doi.org/10.1007/s00395-017-0652-z>
66. *Hermans M, Lennep JRV, van Daele P, Bot I* (2019) Mast Cells in Cardiovascular Disease: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci* 20(14): 3395.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143395>
67. *Moreno M, Puig J, Serrano M, Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Ricart W, Fernandez-Real JM* (2014) Circulating tryptase as a marker for subclinical atherosclerosis in obese subjects. *PLoS One* 9(5): e97014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097014>
68. *Kouhpeikar H, Delbari Z, Sathyapalan T, Simental-Mendía LE, Jamialahmadi T, Sahebkar A* (2020) The Effect of Statins through Mast Cells in the Pathophysiology of Atherosclerosis: a Review. *Curr Atheroscler Rep* 22(5): 19.
<https://doi.org/10.1007/s11883-020-00837-9>
69. *Palmiere C, Comment L, Vilarino R, Mangin P, Reggiani Bonetti L* (2014) Measurement of β -tryptase in postmortem serum in cardiac deaths. *J Forensic Leg Med* 23: 12–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2014.01.009>
70. *Kareinen I, Baumann M, Nguyen SD, Maaninka K, Anisimov A, Tozuka M, Jauhiainen M, Lee-Rueckert M, Kovanen PT* (2018) Chymase released from hypoxia-activated cardiac mast cells cleaves human apoA-I at Tyr¹⁹² and compromises its cardioprotective activity. *J Lipid Res* 59(6): 945–957.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M077503>
71. *Cao J, Papadopoulou N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL, Theoharides TC* (2005) Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 174(12): 7665–7675.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7665>
72. *Bot I, de Jager SC, Bot M, van Heiningen SH, de Groot P, Veldhuizen RW, van Berkel TJ, von der Thüsen JH, Biessen EA* (2018) The neuropeptide substance P mediates adventitial mast cell activation and induces intraplaque hemorrhage in advanced atherosclerosis. *Circ Res* 106(1): 89–92.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.204875>
73. *Xu GZ, Wang G* (2022) Acute myocardial infarction due to Kounis syndrome: A case report. *World J Clin Cases* 10(31): 11555–11560.
<https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i31.11555>
74. *Kounis NG, Cervellin G, Konari I, Bonfanti L, Dousdampanis P, Charokopos N, Assimakopoulos SF, Kakkos SK, Ntouvas IG, Soufras GD, Tsolakis I* (2018) Anaphylactic cardiovascular collapse and Kounis syndrome: systemic vasodilation or coronary vasoconstriction? *Ann Transl Med* 6(17): 332.
<https://doi.org/10.21037/atm.2018.09.05>
75. *Chen J, Hong T, Ding S, Deng L, Abudupataer M, Zhang W, Tong M, Jia J, Gong H, Zou Y, Wang TC, Ge J, Yang X* (2017) Aggravated myocardial infarction-induced cardiac remodeling and heart failure in histamine-deficient mice. *Sci Rep* 7: 44007.
<https://doi.org/10.1038/srep44007>

The Role of Mast Cell-Neuron Tandem in the Regulation of Cardiac Function in Cardiovascular Pathologies

M. P. Morozova^{a, *}, A. D. Kurenkova^b, and B. A. Umarova^c

^a*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^b*Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow Medical University, Moscow, Russia*

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

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

This review is consisted of new data about participation of mast cells (MCs) in the regulation of cardiac function in the development of some cardiovascular pathologies. In norm the number of MCs in the heart is very small compared to their number in barrier tissues. They are responsible for homeostasis of cardiac tissue and ensuring the interaction of the organ with the nervous and endocrine systems throughout the life of the organism.

Pathological processes in the heart are accompanied by the development of inflammation reaction. MCs fulfil a significant role in the all stages of inflammation. The number of MCs significantly increases against the background of myocardial infarction development, fibrotic heart disease and vascular atherosclerosis. Their contribution to the pathogenesis of the disease is ambiguous, because on the one hand it is aimed at tissue adaptation to damage, and on the other hand - avalanche-like synthesis and release of mediators from activated MCs aggravates the course of the process. As a result, MCs change their secretory profile, interfere in the realization of cardiac functions against the background of inflammation, but at the same time modulate afferent information flow from the heart and efferent influences of the nervous system. The coordinated work of the system loses its stability, which can lead to severe consequences for the vital activity of the whole organism.

The analysis of the current state of the problem indicates that the heart activity depends on the functional state of MCs, their complex interaction with the nervous system both in the norm and, especially, against the background of pathological processes development.

Keywords: cardiac mast cells, sympathetic nervous system, infarction, fibrosis, atherosclerosis

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТИТИНА В ИЗМЕНЕНИИ ЖЕСТКОСТИ МИОКАРДА ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

© 2024 г. Г. З. Михайлова¹, И. М. Вихлянцев^{1, *}, В. Л. Лакомкин²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино,
Московская обл., Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова
Минздрава РФ, Москва, Россия

*E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2024 г.

После доработки 09.02.2024 г.

Принята к публикации 18.02.2024 г.

В обзоре представлен краткий анализ современных знаний о такой посттрансляционной модификации титина как фосфорилирование, с акцентом на изменения, происходящие при развитии сердечных заболеваний. Исследования, проведенные с использованием животных моделей заболеваний сердца, а также с использованием биоматериала сердечной ткани пациентов с различными патологиями, показывают изменения уровня фосфорилирования титина. При развитии патологических изменений наблюдается, как правило, гиперфосфорилирование сайта S11878 и гипофосфорилирование сайта S12022 в PEVK-последовательности титина, а также изменения уровня фосфорилирования сайтов в N2B-последовательности этого белка. Функциональным суммарным эффектом этих изменений является увеличение жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом, в основе которой лежат вязкоупругие свойства титина, изменение которых, в свою очередь, наблюдается вследствие гипо- или гиперфосфорилирования определенных сайтов этого белка. В обзоре представлено описание ряда терапевтических воздействий, способствующих изменению уровня фосфорилирования титина, которые рассматриваются как способ изменения вязкоупругих свойств патологического миокарда с целью нормализации его сократительной способности.

Ключевые слова: сердечная мышца, титин, фосфорилирование, кардиомиопатии

DOI: 10.31857/S0869813924030042, **EDN:** CPYIMK

ВВЕДЕНИЕ

Исследования механизмов адаптации сердечной ткани и скорости изменений функционирования сердца в процессе индивидуального развития, при старении, а также при развитии дисфункций остаются актуальными и на сегодняшний день. В этой области науки многие нюансы остаются до конца не изученными. Например, сложны для изучения, особенно *in vivo*, механизмы сигнальных путей сердечной механотрансдукции, которые взаимосвязаны с процессами увеличения наполнения и давления желудочков [1]. Сигналы гемодинамической (механической) нагрузки, передаваемые через стенки сердца, воспринимаются миоцитами, которые реагируют изменениями сокра-

тительной способности и экспрессии генов. Нарушение хорошо сбалансированного механизма восприятия гемодинамической нагрузки вызывает нарушения регуляции, ремоделирование сердца и сердечную недостаточность. Узловые точки механочувствительности в кардиомиоцитах могут располагаться в областях Z-диска, I-зоны и M-линии саркомеров. Продольное соединение/объединение этих областей обеспечивается гигантским эластичным механочувствительным белком титином (в русскоязычной научной литературе используется также название тайтин) [2, 3] (рис. 1). Молекула титина вследствие гигантских размеров и расположения во всех зонах саркомера (рис. 1) становится уязвима при развитии сердечно-сосудистых заболеваний: сердечной недостаточности, диастолической дисфункции левого желудочка (в том числе вызванной сахарным диабетом), аортального стеноза, ишемического повреждения, а также наследственных кардиомиопатий с патогенными вариантами гена титина [4, 5]. Эластичные свойства молекул титина вносят вклад в модуляцию жесткости миокарда. Одним из важных молекулярных механизмов регулирования вязкоупругих свойств титина и вследствие этого жесткости саркомеров и мышцы в целом является изменение изоформного состава этого белка, что обеспечивает необходимый уровень пассивной жесткости его молекул в течение длительного периода. Известно, что изменения изоформного состава титина наблюдаются при патологических состояниях, например, при развитии терминальной стадии сердечной недостаточности у человека. Однако сердцу также необходим более быстрый и точный контроль над жесткостью молекул титина и мышцы в целом. Этого можно добиться за счет посттрансляционных модификаций титина, в частности, фосфорилирования определенных участков его молекулы. Цель нашего обзора – проанализировать, как свойства титина могут быть изменены посредством его фосфорилирования с акцентом на изменения вязкоупругих свойств молекул этого белка при развитии/лечении заболеваний сердца.

*История исследования фосфорилирования титина *in vitro* и *in vivo**

Исследования фосфорилирования последовательностей молекулы титина, расположенных в А-зоне и М-линии саркомера

В 1987 г. впервые было показано, что титин фосфорилируется *in vivo* [6]. Так, через трое суток после инъекции радиоактивного неорганического фосфата в дорсальные лимфатические мешки гладкой шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) очищенные препараты титина икроножной мышцы содержали от 0.92 до 1.7 моля радиоактивного фосфосерина на 1 моль титина. Авторы также показали, что очищенные препараты титина, выделенные из скелетных мышц лягушки, содержали от 5 до 6 молей связанного неорганического фосфата на 1 моль белка [6]. В 1988 г. были получены аналогичные данные для титина диафрагмальной мышцы мыши [7]. После пятичасовой инкубации диафрагмы мыши в растворе, содержащем радиоактивный неорганический фосфат, обнаружено, что 1 моль титина содержал 2 моля радиоактивного фосфосерина. При этом очищенные препараты титина диафрагмальной мышцы мыши содержали около 12 молей неорганического фосфата на 1 моль белка [7].

В 1992 г. была обнаружена способность бета-коннектина (протеолитического T2-фрагмента титина с м. м. ~ 2.2 МДа, взаимодействующего с миофиламентными нитями в А-зоне саркомера, см. рис. 1), выделенного из скелетной мышцы курицы, аутофосфорилироваться *in vitro* в присутствии [гамма-³²P]-АТФ [8]. При этом такие киназы, как киназа легкой цепи миозина, цАМФ-зависимая протеинкиназа А (РКА) и протеинкиназа С (РКС), не фосфорилировали бета-коннектин *in vitro* в вышеуказанных условиях. Позднее Yamasaki и соавт. выявили способность титина к фосфорилированию после 24-часовой инкубации скинированных (лишенных мембраны) кардиомиоцитов крысы в растворе, содержащем [гамма-³²P]-АТФ и протеинкиназу А [9]. Авторы подсчитали, что 1 моль титина содержал 0.85–0.89 моля неорганического радиоактивного фосфата.

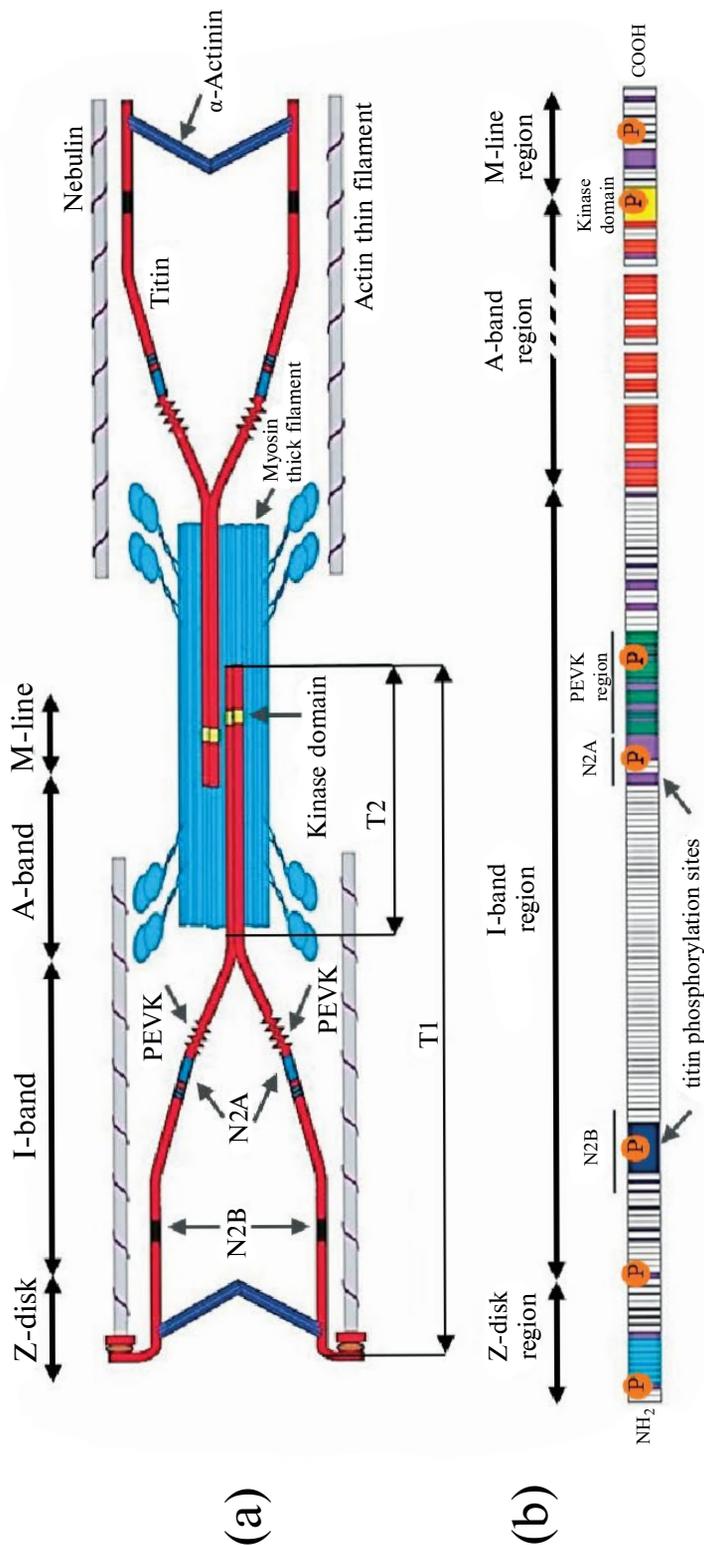


Рис. 1. Схема расположения титина в саркомере и его доменная структура.

(a) – схематическое изображение расположения молекул титина в саркомере. Полноразмерные молекулы титина, перекрывающие расстояние от M-линии до Z-диска в саркомерах поперечно-полосатых мышц позвоночных. Часть молекул титина, расположенная в A-зоне, получила название T2. На каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится, предположительно, по шесть полноразмерных молекул титина. Указаны домены титина (N2B, N2A, PEVK, Kinase domain), а также участки фосфорилирования молекул титина, расположенные в M-линии, I-зоне и Z-диске. Адаптировано из [3].

Таким образом, эти авторы впервые показали, что бета-адренергическая стимуляция посредством протеинкиназы А приводит к фосфорилированию титина в сердечной мышце млекопитающих [9].

В 1992 г. Labeit и соавт. выделили кДНК, кодирующие эпитопы части молекулы титина, расположенной в А-зоне саркомера, а также определили 30 т. п. н. (1000 кДа) первичной структуры титина [10]. Первое, на что обратили внимание эти авторы, было наличие каталитического домена серин/треониновой протеинкиназы, расположенного вблизи С-конца молекулы титина в М-линии саркомера [10]. Функция киназного домена титина некоторое время была не ясна. Впоследствии было сделано предположение о роли киназного домена титина [11], а также способных к фосфорилированию KSP-последовательностей, расположенных в С-концевой части молекулы титина в М-зоне саркомера [12], в миофибриллогенезе. Результаты, полученные в 2006 г. Musa и соавт. [13], подтвердили правильность высказанного предположения. С использованием линии эмбриональных стволовых клеток мыши было показано, что делеция участка гена титина (*TTN*), кодирующего М-область его молекулы, включающую и киназный домен, предотвращает формирование саркомеров на ранних стадиях миофибриллогенеза [13]. Роль киназного домена титина в зрелых поперечнополосатых мышцах заключается в регуляции экспрессии мышечных генов и белкового обмена в саркомерах [14, 15], а также в регуляции сократительной функции мышцы [16]. В частности, в статье [16] авторы разработали нокаут, с помощью которого можно индуцировать экспрессию титина с дефицитом М-линии у взрослых мышей, и исследовали роль киназного домена титина в функционировании сердечной мышцы. Эксперименты на изолированном сердце показали, что у нокаутных мышей сократительный ответ на бета-адренергические агонисты и внеклеточный кальций снижается. В частности, было обнаружено снижение скорости поглощения кальция, что могло быть связано с уменьшением содержания кальмодулина, фосфоламбана и SERCA2. В конечном итоге у нокаутных мышей развивалась гипертрофия сердца и сердечная недостаточность, которая, по мнению авторов, была связана с активацией сигнального пути протеинкиназы С, но не митоген-активируемых протеинкиназ. Авторы заключили, что киназный домен титина выступает в качестве регулятора сократительной функции сердечной мышцы за счет изменения кальциевого гомеостаза и активности протеинкиназ.

Исследования фосфорилирования последовательностей N-концевой части молекулы титина, расположенной в Z-диске саркомера

Первые данные о последовательности N-концевой части молекулы титина были получены Sebestyén и соавт. в 1995 г. [17]. Авторы, используя тотальную мРНК, выделенную из сердечной мышцы кролика, получили кДНК с целью определения последовательности, кодирующей N-концевую часть молекулы титина. Для идентификации соответствующих клонов авторы использовали моноклональные антитела (Т12), связывающиеся с частью молекулы титина, расположенной вблизи Z-диска саркомера. Была получена последовательность размером 5,4 т. п. н. [17]. Кодированный полипептид проявлял способность к ERK1-зависимому фосфорилированию *in vitro*. Впоследствии в N-концевой части молекулы титина были идентифицированы сайты, богатые серином/пролином, которые фосфорилировались *in vitro* с помощью ERK-киназы и циклин-зависимой протеинкиназы-2 (CDC2) [18]. Анализ N-концевой последовательности титина выявил наличие «Z-повторов», содержащих 45 аминокислотных остатков. Поскольку количество «Z-повторов» титина варьирует в разных типах мышц, авторы [17] высказали предположение о роли фосфорилирования сайтов N-концевой части молекулы титина в сборке Z-дисков различной толщины и механической прочности.

Исследования фосфорилирования последовательностей молекулы титина, расположенных в I-диске саркомера

Растяжимая часть молекулы титина, расположенная в I-зоне саркомера, имеет молекулярную массу от ~0.8 до ~1.5 МДа в зависимости от изоформ титина и их изовариантов [19]. Эта часть молекулы титина состоит из растяжимых в разной степени эластичных последовательностей: проксимальной и дистальной областей иммуноглобулин-подобных доменов, а также уникальных последовательностей N2A, N2B и PEVK [20] (рис. 1). Альтернативный сплайсинг I-области титина, определяющий размеры PEVK-последовательности и последовательностей иммуноглобулин-подобных доменов, является основой разнообразия изоформ титина и их изовариантов. К настоящему времени известно, что в разных отделах сердца взрослых животных и человека экспрессируются две основные изоформы титина: короткая N2B-изоформа с молекулярной массой 2970 кДа и длинная N2BA-изоформа с молекулярными массами ее вариантов от 3200 до 3350 кДа [21, 22]. Более длинная (менее жесткая) N2BA-изоформа содержит N2A и N2B уникальные последовательности, тогда как более короткая (более жесткая) N2B-изоформа содержит соответственно только N2B-уникальную последовательность [21–24]. Изоварианты N2BA-изоформы титина имеют также более длинную PEVK-последовательность и большее количество растяжимых иммуноглобулин-подобных доменов [21, 22]. Функционирование описанных растяжимых элементов определяет титин как молекулярную пружину, развивающую вязкоупругое напряжение при растяжении саркомера («пассивное напряжение») [25–28] и развивающую «возвратную силу» при сокращении/сжатии саркомера [29]. Впоследствии было установлено, что содержание более эластичной N2BA- и более жесткой N2B-изоформ титина различается в разных отделах сердца у млекопитающих, включая человека [24, 30–34]. Постепенно складывалось представление о том, что неодинаковое содержание N2BA- и N2B-изоформ титина и вследствие этого их разное соотношение в миокарде – это важная молекулярная детерминанта, определяющая различия жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом.

Научная парадигма, сложившаяся в конце XX века и связывающая вязкоупругие свойства титиновых молекул с жесткостью сердечной мышцы, получила развитие в XXI веке. Было высказано предположение, что изменения вязкоупругих свойств молекул титина могут происходить вследствие фосфорилирования/дефосфорилирования этого белка, что, в свою очередь, будет иметь последствия для диастолического наполнения и последующей систолической функции сердца через механизм, известный как закон Франка – Старлинга [35]. В связи с этим последовал цикл работ, связанных с фосфорилированием титина и влиянием этой посттрансляционной модификации на жесткость сердечной ткани.

Как упоминалось выше, в 2002 г. Yamasaki и соавт. показали, что фосфорилирование титина в скинированных кардиомиоцитах крысы наблюдалось после бета-адренергической стимуляции, активирующей протеинкиназу A [9]. При этом авторы обнаружили фосфорилирование только интактных молекул титина-1 (T1), тогда как протеолитические T2-фрагменты титина не подвергались фосфорилированию. Значимость этой работы в то время была велика, поскольку методически было очень трудно оценить фосфорилирование титина вследствие его гигантских размеров, а также вследствие высокой деградации этого белка. Кроме того, авторами был получен еще один важный результат: опосредованное протеинкиназой A фосфорилирование титина значительно снижало пассивное напряжение, развиваемое изолированными кардиомиоцитами в ответ на их растяжение [9]. Эксперименты по фосфорилированию *in vitro* рекомбинантных фрагментов титина совместно с данными, полученными методом иммуноэлектронной микроскопии, позволили Yamasaki и соавт. сделать заключение, что протеинкиназа A фосфорилирует N2B-последовательность титина.

В 2005 г. Fukuda и соавт. [35] исследовали влияние опосредованного протеинкиназой А фосфорилирования титина на изменение уровня пассивного напряжения скинированных препаратов сердечной ткани разных животных, имеющих различное N2BA/N2B соотношение. Обнаружено, что увеличение уровня фосфорилирования титина сопровождалось уменьшением уровня пассивного напряжения. Это уменьшение было более выражено в сердечной ткани с повышенным содержанием более жесткой (короткой) N2B-изоформы титина [35]. Авторы предположили, что опосредованное протеинкиназой А фосфорилирование титина способствует увеличению эластичности молекул титина, что, в свою очередь, способствует наполнению желудочков сердца за счет снижения жесткости их стенок. Позднее эти результаты, полученные на сердечной мышце крысы и крупного рогатого скота [9, 35], подтвердились и на сердечной мышце человека [36]. Авторы [36] также предположили, что базальный уровень фосфорилирования титина в интактных мышцах, по-видимому, играет некую роль в определении уровня пассивного напряжения в норме [36]. Подобное предположение было высказано авторами на основании полученных ими данных, свидетельствующих о том, что если до обработки протеинкиназой А проводить дефосфорилирование миофиламентов протеинфосфатазой 1, то последующее фосфорилирование титина было более значительным.

Впоследствии были открыты сайты фосфорилирования в уникальной N2B-последовательности (N2Bus) титина. Так, S4185 является первым подтвержденным сайтом N2B-последовательности, фосфорилирование которого было опосредовано как протеинкиназой А, так и протеинкиназой G [37]. Было изучено влияние протеинкиназы G (PKG) на изменение уровня пассивного напряжения скинированных волокон донорских сердец и обнаружено значительное снижение этого уровня после обработки вышеуказанных мышечных образцов протеинфосфатазой 1. Данные *in vitro*, полученные на отдельных молекулах титина, показали, что фосфорилирование протеинкиназой G увеличивает изгибную жесткость N2B-последовательности, что согласуется с данными об уменьшении уровня пассивного напряжения скинированных волокон [37]. Таким образом, Klüger и соавт. показали, что опосредованное протеинкиназой G фосфорилирование титина сопровождается уменьшением жесткости скинированных волокон сердечной мышцы человека [37].

В 2013 г. Kötter и соавт. создали рекомбинантные конструкции N2B-последовательности титина человека, крысы и собаки и проанализировали их фосфорилирование протеинкиназами А и G [38]. Было идентифицировано семь сайтов фосфорилирования в N2B-последовательности титина человека и крысы [38]. При этом было показано, что часть сайтов (S4010, T4065, S4065) фосфорилируется только протеинкиназой А, сайт S4092/S4099 – только протеинкиназой G. Сайты S3744 и S4185 фосфорилируются обеими протеинкиназами [38]. Сайт S4010 подвергается фосфорилированию также и ERK2-киназой [39]. Было высказано предположение, что это фосфорилирование на основе ERK2 снижает уровень пассивного напряжения, развиваемого молекулами титина при их растяжении. При этом авторы показали, что киназа ERK2 может фосфорилировать и другие сайты в N2B-последовательности титина (S3873, S3915 и S3965). Известны также данные о фосфорилировании сайта S4062 кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II (CaMKII δ) [40]. Фосфорилирование всех вышеуказанных сайтов в N2B-последовательности молекул титина сопровождалось уменьшением уровня пассивного напряжения кардиомиоцитов при их растяжении [37, 41].

Одной из важных киназ, участвующих в процессе фосфорилирования PEVK-последовательности титина, является PKC α – преобладающая изоформа протеинкиназы С, экспрессируемая в сердце животных и человека, играющая важную роль в функционировании миофиламентов, а также в развитии сократительной дисфункции и прогрессировании сердечной недостаточности [42]. Было показано, что фосфорилирование PEVK-последовательности титина протеинкиназой С сопровождается увеличением

уровня пассивного напряжения, развиваемого кардиомиоцитами при их растяжении [43]. Авторы, используя масс-спектрометрию в сочетании с сайт-направленным мутагенезом, выявили два сайта в области PEVK-последовательности сердечной N2B-изоформы, которые фосфорилируются РКСа (S11878 и S12022, или S26 и S170); при этом показано, что, когда эти два сайта мутируют на аланин, фосфорилирование эффективно прекращается [43]. Связь между РКСа, фосфорилированием PEVK-последовательности титина и пассивным напряжением была исследована и в работе других авторов [44]. Они показали, что РКСа-опосредованное фосфорилирование не влияло на уровень пассивного напряжения в кардиомиоцитах мышей, у которых были генетически удалены сайты PEVK-последовательности титина [44]. Таким образом, данные, полученные в работах [43, 44], указывают на то, что опосредованное протеинкиназой С фосфорилирование PEVK-последовательности титина приводит к увеличению жесткости молекул этого белка и вследствие этого к увеличению жесткости кардиомиоцитов.

В PEVK-последовательности титина обнаружены сайты, которые подвергаются фосфорилированию кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II (CaMKII δ), а также протеинкиназой D [45, 46]. И если вклад опосредованного протеинкиназой D фосфорилирования титина обсуждается в контексте уменьшения уровня пассивного напряжения, то роль фосфорилирования PEVK-последовательности титина кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II до конца не ясна. В 2013 г. Hidalgo и соавт. обнаружили, что в присутствии CaMKII δ , Ca²⁺/кальмодулина и [γ -³²P]-АТФ наблюдалось фосфорилирование титина в скинированных волокнах левого желудочка сердца мыши [45]. Было обнаружено, что эта киназа фосфорилирует как N2B-, так и PEVK-последовательности титина [40, 45]. Методом масс-спектрометрии [45] было выявлено пять сайтов фосфорилирования в PEVK-последовательности титина, распределенные более или менее равномерно по всей ее длине (S26, T70, T80, T117 и S170), из которых только S26 и S170 были высококонсервативны. Интересно, что мутация сайтов S26 и S170 одновременно устраняла ~75% включения неорганического фосфата. Именно эти два сайта с высокой достоверности подвергаются фосфорилированию протеинкиназой РКСа [43] и кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II [40, 45]. Вполне вероятно, что и CaMKII δ , и РКСа могут фосфорилировать эти сайты титина. Теоретически совместное фосфорилирование обоих этих сайтов титина может не вызвать изменения уровня пассивного напряжения, поскольку механические эффекты способны нейтрализовать друг друга. Однако показано, что CaMKII-опосредованное фосфорилирование титина сопровождалось уменьшением уровня пассивного напряжения (в основе которого лежат вязкоупругие свойства титиновых молекул) при растяжении кардиомиоцитов [40, 41]. Кроме того, известны данные, что уровень пассивного напряжения был выше в кардиомиоцитах мышей с двойным нокаутом CaMKII δ / γ и ниже – в сердце у трансгенных мышей со сверхэкспрессией CaMKII δ по сравнению с кардиомиоцитами мышей дикого типа. Принимая во внимание вышесказанное, можно полагать, что CaMKII-опосредованное фосфорилирование N2B- и PEVK-последовательностей титина сопровождается уменьшением жесткости молекул этого белка и вносит вклад в уменьшение жесткости кардиомиоцитов и сердечной ткани в целом.

В связи с вышесказанным необходимо обратить внимание на следующее. Нельзя исключить, что сродство CaMKII δ может быть разным к N2B- и PEVK-последовательностям титина. Вполне вероятно, что в растянутом саркомере сайты N2B-последовательности могут быть более доступными для фосфорилирования CaMKII δ , чем, например, сайты PEVK-последовательности. В подтверждение этих слов можно привести следующие данные. Недавно показано, что CaMKII δ может фосфорилировать иммуноглобулин-подобные домены титина, расположенные в I-части его молекулы, при этом фосфорилируются они только после их разворачивания вследствие окисления [47]. Таким образом, подходит к интерпретации описанных выше результатов о роли

фосфорилирования титина в изменении вязкоупругих свойств его молекул необходимо с некой осторожностью. Необходимо также учитывать, что возможно существование достаточно большого количества еще не открытых потенциальных сайтов фосфорилирования титина, функциональное значение которых еще предстоит выяснить.

ИССЛЕДОВАНИЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТИТИНА ПРИ СЕРДЕЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Фосфорилирование титина является наиболее изученной посттрансляционной модификацией титина, регулирующей не только жесткость его молекул, но и вследствие этого объем фракции сердечного выброса (изгнания) как при нормальной работе сердца, так и при сердечной патологии. Особенно это касается тех пациентов, у которых сохраняется систолическая функция и объем фракции выброса левого желудочка, но наблюдается диастолическая дисфункция, а именно: замедленное расслабление и повышенное диастолическое давление в левом желудочке. Установлено, что в основе этого явления лежит феномен эластической отдачи, который может быть объяснен наличием так называемой «возвратной силы», которая отодвигает концы миозиновых нитей от Z-линии. Титин и, в частности, наиболее вязкоупругая часть его молекулы – N2B-последовательность играют главную роль как в создании пассивного напряжения в покое (т. е. при низкой концентрации Ca^{2+}), так и в развитии «возвратной силы» в систоло-диастолическом переходе, что неоднократно было подтверждено в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на животных [29, 48, 49]. Впоследствии были обнаружены и клинические корреляции, подтверждающие, что изменения изоформного состава титина (соотношения N2BA- и N2B-изоформ) имеют отношение как к диастолической, так и к систолической дисфункции левого желудочка у пациентов с сердечной недостаточностью, возникшей в результате неишемической дилатационной кардиомиопатии [50].

Первые сведения об уровне пассивного напряжения и фосфорилировании титина протеинкиназой А в кардиомиоцитах пациентов с сердечной патологией

Надо отметить, что вплоть до 2002 г. исследователи получали противоречивые данные о жесткости патологического миокарда человека и животных. В частности, работы того времени на животных моделях дилатационной кардиомиопатии [51] и на моделях перегрузки давлением [31] демонстрировали увеличение жесткости миокарда. В то же время было выявлено снижение уровня пассивного напряжения в саркомерах сердечной мышцы пациентов с ишемической болезнью сердца с высоким конечно-диастолическим давлением левого желудочка [30]. Дело осложнялось еще разнообразием форм кардиомиопатий и отсутствием большого количества биоптатов. В 2004 г. Nagueh и соавт. впервые получили данные, свидетельствующие о корреляции между соотношением N2BA- и N2B-изоформ титина и параметрами наполнения камеры левого желудочка сердца пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности, возникшей в результате развития неишемической дилатационной кардиомиопатии [50]. В частности, авторы обнаружили прямую корреляцию между увеличением доли более эластичной N2BA-изоформы титина и уменьшением жесткости препаратов миокарда левого желудочка сердца пациентов. Эти изменения наблюдались на фоне увеличения конечного диастолического объема и уменьшения конечного систолического объема и фракции выброса сердечной мышцы пациентов. Авторы сделали заключение, что повышенная экспрессия N2BA-изоформы титина может отрицательно влиять на систолическую функцию, способствуя уменьшению конечного систолического объема и фракции выброса, но улучшать диастолическую функцию, способствуя увеличению эластичности миокарда.

Первые работы по исследованию взаимосвязи жесткости миокарда и ее коррекции с помощью изменения уровня фосфорилирования титина у пациентов с систолической и диастолической дисфункциями были проведены около 20 лет назад [51–53]. Van Heerebeek и соавт. пришли к выводу, что пассивное напряжение, обусловленное вязкоупругими свойствами молекул титина, в кардиомиоцитах пациентов с систолической дисфункцией значительно менее чувствительно к обработке протеинкиназой А, чем в кардиомиоцитах пациентов с сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса и диастолической дисфункцией [51]. В дальнейшем, в работе [52] из образцов эндомикардиальной биопсии двенадцати пациентов с сохраненной фракцией выброса ($71 \pm 11\%$) и диастолической дисфункцией были выделены одиночные кардиомиоциты. Кардиомиоциты, обработанные тритоном X-100 для удаления мембран, растягивали до длины саркомера 2.2 мкм и активировали растворами, содержащими различные концентрации ионов Ca^{2+} . По сравнению с кардиомиоцитами контрольной группы кардиомиоциты пациентов с диастолической дисфункцией развивали аналогичную общую изометрическую силу при максимальной концентрации Ca^{2+} , но их пассивное напряжение в отсутствие Ca^{2+} (пассивное напряжение покоя) было почти в два раза выше. Введение протеинкиназы А в кардиомиоциты пациентов снижало уровень пассивного напряжения/жесткости до контрольных значений. Таким образом, были впервые получены данные о возможности коррекции жесткости миокардиальной ткани путем воздействия на нее протеинкиназы А [52]. Vorbely и соавт. [53, 54] окончательно установили, что жесткость кардиомиоцитов зависит не только от соотношения более эластичной N2BA- и более жесткой N2B-изоформ титина, но и от изменений уровня фосфорилирования этого белка. Так, у пациентов с сердечной недостаточностью впервые было обнаружено уменьшение уровня фосфорилирования N2B-изоформы титина на фоне повышенной жесткости кардиомиоцитов [53, 54].

Итак, приведенные исследования показали, что существуют два отдельных фенотипа сердечной недостаточности с разным ремоделированием левого желудочка: концентрическим – с нормальным размером полости левого желудочка, увеличенной толщиной стенки и повышенным соотношением массы и объема левого желудочка; и эксцентрическим – с дилатацией левого желудочка, нормальной или уменьшенной толщиной стенки и низкой фракцией выброса [52–55]. Эти работы позволили сделать предположение, что механизмы, ответственные за повышенную диастолическую жесткость сердца при диастолической дисфункции, могут различаться. В частности, важно было изучить, что является причиной болезни: ишемия, сопровождающаяся увеличением растяжимости миокарда, либо аортальный стеноз, гипертония и метаболические нарушения, требующие увеличения силы сокращений.

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при сердечной патологии, вызванной ишемией

Понимание механизмов, поддерживающих сердечную функцию на ранней стадии после ишемии и инфаркта миокарда, и выявление процессов, инициирующих переход к дезадаптивному ремоделированию левого желудочка, представляют большой клинический интерес. Инфаркт миокарда увеличивает напряжение стенки жизнеспособного миокарда и инициирует раннее адаптивное ремоделирование в левом желудочке для поддержания сердечного выброса. Более поздние процессы ремоделирования включают фиброзную реорганизацию, которая в конечном итоге приводит к сердечной недостаточности. В пионерской работе Neagoe и соавт., опубликованной в 2002 г. [30], было показано, что в левом желудочке пациентов с обширной ишемической болезнью сердца наблюдается увеличение доли более эластичной N2BA-изоформы титина и уменьшение доли более жесткой N2B-изоформы этого белка, что сопровождалось снижением обусловленной титином пассивной жесткости одиночных миофибрилл при их растяжении.

Исследования фосфорилирования титина при ишемии проводили, как правило, в условиях 20-минутной глобальной ишемии с последующей реперфузией, которая, как известно, активирует киназу СаМКПδ [45]. В исследовании Hidalgo и соавт. [45] на изолированном сердце мышей, подвергшихся протоколу ишемии-реперфузии, было обнаружено, что киназа СаМКПδ достигает пика своей активности в течение трех минут после начала реперфузии. При этом не было обнаружено каких-либо изменений уровня фосфорилирования сайтов S26 и S170 в PEVK-последовательности титина. Авторы предположили, что обнаруженное ими гиперфосфорилирование титина *in vivo* при ишемии может быть связано с увеличением уровня фосфорилирования N2B-последовательности этого белка. Позднее на модели инфаркта миокарда у мышей, вызванного ишемией с последующей реперфузией, были получены данные, указывающие на увеличение уровня фосфорилирования СаМКПδ-зависимого и РКСа-зависимого сайта S12022, расположенного в PEVK-последовательности титина [56]. Обнаруженную при этом повышенную жесткость кардиомиоцитов мышей авторы объяснили как следствием гиперфосфорилирования PEVK-последовательности титина, так и следствием гипофосфорилирования N2B-последовательности этого белка. Работы последующих лет показали, что ишемия и кардиомиопатии имеют общие патомеханизмы, такие как повышение эластичности титина, однако при ишемии не было обнаружено изменений уровня фосфорилирования сайта S4010 в N2B-последовательности титина [57, 58].

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при неишемической дилатационной кардиомиопатии

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является основной причиной неишемической сердечной недостаточности. Это заболевание характеризуется увеличением конечно-диастолического размера левого желудочка, снижением фракции выброса левого желудочка и наличием систолической дисфункции. ДКМП также может возникать вследствие сопутствующих заболеваний, таких как диабет, инфекции, токсины (алкоголь и химиотерапевтические препараты) и высокое кровяное давление. Примерно в половине случаев развитие ДКМП обусловлено мутациями в более чем 50 генах, в основном кодирующих саркомерные и цитоскелетные белки [59]. В работе Makagenko и соавт. был проанализирован изоформный состав титина в левом желудочке сердца здоровых доноров-людей и в сердце 9 тяжело больных пациентов с ДКМП неишемической природы [33]. Обнаружено увеличение доли N2BA-изоформы и уменьшение доли N2B-изоформы титина, а также уменьшение общего содержания этого белка в миокарде пациентов с ДКМП. Эти изменения сопровождалось снижением уровня пассивной жесткости пучков волокон сердечной мышцы у пациентов. Авторы заключили, что обнаруженные изменения в титине и, в частности, увеличение доли более эластичной N2BA-изоформы этого белка могут вносить вклад в улучшение диастолической функции миокарда пациентов с ДКМП, однако эти изменения, в свою очередь, могут способствовать ухудшению сократительной способности сердца во время систолы.

Исследования пациентов с терминальной стадией дилатационной кардиомиопатии выявили дефицит базального уровня фосфорилирования титина в сайтах, которые фосфорилируются протеинкиназами A и G [54, 60], по сравнению с донорскими сердцами, что может способствовать диастолической дисфункции при сердечной недостаточности. Важно отметить, что ни РКА-зависимое, ни РКG-зависимое фосфорилирование не помогало снизить до контрольных значений повышенный уровень пассивной жесткости кардиомиоцитов у пациентов [54]. Возможно, изменение РКС-зависимого уровня фосфорилирования сайтов в PEVK-последовательности титина способствовало поддержанию повышенного уровня пассивной жесткости кардиомиоцитов у пациентов с сердечной патологией.

Kötter и соавт. [38] в 2013 г. проанализировали влияние фосфорилирования сайтов в N2B- и PEVK-последовательностях титина на жесткость миокарда пациентов с дила-

тационной кардиомиопатией. В этой работе ценно то, что в исследуемых образцах не были выявлены изменения в N2BA/N2B соотношении изоформ титина, тогда как были обнаружены изменения уровня фосфорилирования N2B- и PEVK-последовательностей титина. В частности, на фоне повышенной жесткости препаратов миокарда у пациентов было выявлено гипофосфорилирование S4185, S4010 и S4099 сайтов в N2B-последовательности и гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности титина. Авторы сделали следующие выводы: во-первых, гипофосфорилирование N2B-последовательности и гиперфосфорилирование PEVK-последовательности титина увеличивают жесткость сердечной мышцы при развитии патологии; во-вторых, изменения уровня фосфорилирования доменов титина могут быть важны для точной настройки пассивной жесткости миокарда и диастолической функции сердца. Сходные результаты были получены в работе Vollen и соавт., которые продемонстрировали гипофосфорилирование PKA/ERK2-зависимого сайта S4010 у пациентов с ДКМП [57].

Исследования фосфорилирования титина в миокарде пациентов с ДКМП в целом согласуются с данными, полученными на животных моделях, в том смысле, что в сравнении с сердцами здоровых людей у пациентов наблюдается уменьшение уровня фосфорилирования как титина в целом, так и N2B-последовательности этого белка, тогда как по сайту S11878 в PEVK-последовательности титина наблюдается гиперфосфорилирование. В частности, сердечный титин был гипофосфорилирован по сайту S4010 в N2B-последовательности титина в образцах левого желудочка сердца пациентов с тяжелой формой дилатационной кардиомиопатии [57] и идиопатической кардиомиопатии [58]. Сайт S4185 в N2B-последовательности титина был гипофосфорилирован у тяжело больных пациентов с ДКМП и диастолической дисфункцией [61, 62]. В большинстве описанных случаев эти изменения связаны с повышением жесткости кардиомиоцитов. Lakomkin и соавт. в 2020 г. [63] на доксорубициновой модели кардиомиопатии показали, что при диастолической дисфункции происходит замедление расслабления, сочетающееся с повышением диастолического давления и мобилизацией анаэробного гликолиза. При этом выявлено увеличение общего уровня фосфорилирования титина, что коррелировало с почти двукратным увеличением доли более длинной N2BA-изоформы титина [63]. Сайт-специфическое гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности титина наблюдалось в образцах миокарда пациентов с тяжелой ДКМП и диастолической дисфункцией [40, 61, 64]. Эти изменения сопровождалось увеличением жесткости сердечной мышцы. Напротив, уровень фосфорилирования сайта S12022, также расположенного в PEVK-последовательности титина, не менялся при диастолической функции правого желудочка сердца у пациентов с легочной артериальной гипертензией [65].

Вышеуказанные относительно постоянные изменения уровня фосфорилирования титина на разных стадиях различных сердечно-сосудистых заболеваний могут казаться несколько неожиданными, однако можно предположить, что эти изменения являются показателем адаптации сердца к новым условиям при развитии патологии. При этом факторов, модулирующих пассивную жесткость миофибрилл, помимо изменения изоформного состава титина или уровня его фосфорилирования, может быть больше. В частности, недавно показано, что развитие дилатационной кардиомиопатии, детерминированной мутациями в гене титина, приводящими к экспрессии укороченных молекул этого белка, сопровождается уменьшением жесткости миофибрилл сердечной мышцы человека [66]. В целом титин у пациентов с ДКМП участвует в механизме Франка – Старлинга не столько как пассивный эластичный компонент, сколько как активный регулятор актин-миозинового взаимодействия. Возможно, что механизм Франка – Старлинга может быть одним из наиболее важных факторов патогенеза ДКМП, поскольку уменьшение жесткости сердечной мышцы (т. е. увеличение ее эластичности, способности к большему растяжению) приводит к нарушению активации сокращения в зависимости от длины растяжения саркомеров и мышцы в целом, т. е. приводит к нарушению вышеуказанного механизма.

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при гипертрофической кардиомиопатии

Гипертрофическая кардиомиопатия характеризуется сохранением фракции выброса левого желудочка, наличием диастолической дисфункции и обструкцией выходных путей. При этой патологии формируется жесткая неподатливая камера левого желудочка, которая препятствует диастолическому наполнению и повышает конечное диастолическое давление [67]. В конечном счете это заболевание может приводить к хронической ишемии миоцитов и их гибели и постепенному развитию систолической дисфункции. Вследствие гипертрофии миокарда, как известно, экспрессия протеинкиназ А и G снижена, тогда как экспрессия РКCa, ERK2- и CaMKII-киназ, как правило, повышена. Raskin и соавт. [39] в 2012 г. в экспериментах *in vitro*, используя рекомбинантную N2B-последовательность титина человека (с 3750 по 4019 аминокислотных остатков), обнаружили, что она является мишенью для ERK2-киназы. Авторы также заявили, что у человека мутация в *TTN*, кодирующем вышеуказанную область молекулы титина, сопровождается развитием гипертрофической кардиомиопатии, при которой наблюдается увеличение уровня фосфорилирования N2B-последовательности *in vitro* [39]. Известны данные [46] об увеличении жесткости сердечной мышцы пациентов с развитием гипертрофической кардиомиопатии. Повышенную жесткость сердечной мышцы пациентов авторы объясняют увеличением уровня фосфорилирования сайта S4062 N2B-последовательности и сайта S12022 PEVK-последовательности титина, что выявлено на фоне увеличения содержания и активности протеинкиназы CaMKII [46]. Авторы впервые продемонстрировали, что ключевой киназой, фосфорилирующей титин при гипертрофической кардиомиопатии, является протеинкиназа D (PKD) – серин-треониновая киназа, которая относится к семейству CaMKII-киназ [46]. В частности, авторы обнаружили гиперфосфорилирование PKD-зависимого сайта S916 титина в миокарде пациентов с гипертрофической кардиомиопатией. Авторы также получили веские доказательства того, что введение протеинкиназы D в кардиомиоциты мышей с нокаутом этой протеинкиназы приводило к снижению пассивной жесткости кардиомиоцитов, которая была выше у нокаутных животных [46]. Таким образом, авторы впервые выявили ранее неизвестную роль протеинкиназы D в регулировании вязкоупругих свойств титина и вследствие этого жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом.

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при диастолической дисфункции неишемической этиологии

В исследовании van Heerebeek и соавт. [55] на кардиомиоцитах пациентов с сахарным диабетом было показано, что механизмы, ответственные за повышенную диастолическую жесткость диабетического сердца, различаются при систолической и диастолической дисфункции: фиброз и возрастные изменения вносят вклад в развитие систолической дисфункции, тогда как повышенное пассивное напряжение кардиомиоцитов в покое вносит вклад в сохранение фракции выброса [55]. Эта работа впоследствии дала развитие исследованиям диастолической дисфункции неишемического происхождения. За последние 20 лет нарастает объем свидетельств, что этому заболеванию сопутствует высокая распространенность других заболеваний, таких как избыточный вес/ожирение, сахарный диабет, хроническая обструктивная болезнь легких и солечувствительная гипертензия. Были созданы многочисленные модели на животных (мышь, крыса, собака, свинья), которые имитируют заболевания сердца человека. Такие модели, как миокардит [68], легочная артериальная гипертензия, сужение аорты и сахарный диабет 2-го типа [69] позволили понять, в каком направлении происходят изменения изоформного состава титина и уровня фосфорилирования этого белка при патологических состояниях.

При моделировании стеноза аорты у мышей наблюдалось как уменьшение общего уровня фосфорилирования титина в сердце по сравнению со здоровыми контрольными группами [70], так и увеличение уровня фосфорилирования этого белка [71, 72]. Очевидно, противоречивые результаты относительно общего уровня фосфорилирования титина, наблюдаемые на животных моделях, могут быть связаны со стадией сердечной недостаточности, индуцированной в соответствующей модели. Например, тяжесть сердечной недостаточности может быть разной у мышей [71] и крыс [73], подвергшихся сужению аорты, в зависимости от уровня ее сужения. Сужение корня аорты или перевязывание аорты как модели для исследования диастолической дисфункции обычно приводит к эксцентрической гипертрофии левого желудочка из-за внутрисердечной объемной перегрузки с чрезмерным отеком легких [74]. При стенозе аорты значительно повышается конечно-диастолическая жесткость левого желудочка и давление в нем, однако фракция выброса левого желудочка не снижается. Показано, что продолжительный стеноз аорты у мышей усугублял систолическую дисфункцию, что в конечном итоге приводило к сердечной недостаточности с низкой фракцией выброса [74]. Важно отметить, что подобные изменения редко наблюдаются у людей, а результаты моделирования длительного стеноза аорты на мышах не соответствуют клиническим результатам. Следовательно, нужно быть осторожнее, интерпретируя результаты моделирования диастолической функции на примере стеноза аорты [75]. Несмотря на это, моделирование стеноза аорты выявило некоторые общие тенденции. Так, Borbely и соавт. [54] в 2009 г., используя биопсии левого желудочка сердца пациентов со стенозом аорты (без ишемической болезни сердца), обнаружили гипофосфорилирование N2B-последовательности титина, которое сопровождалось увеличением жесткости кардиомиоцитов при их растяжении в покое. При этом инкубация кардиомиоцитов в растворе, содержащем протеинкиназу А, восстанавливала уровень их пассивного напряжения. Последующие работы показали гипофосфорилирование PKG-зависимых сайтов N2B-последовательности титина: S4099 у собак с диастолической дисфункцией [76] и S4080 у крыс, подвергшихся стенозу аорты [73], а также PKA/ERK2-зависимых сайтов S4010 у собак с диастолической дисфункцией [76] и S991 у крыс со стенозом аорты [73]. В области PEVK-последовательности наблюдалось гиперфосфорилирование сайта S12884 у крыс со стенозом аорты [73]. Гипофосфорилирование сайтов S4099, S4185 и S4010 в N2B-последовательности титина и гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности этого белка было обнаружено также и в сердечной ткани пациентов с ДКМП и гипертрофической кардиомиопатией [38]. При этом пассивное напряжение, развиваемое скинированными волокнами миокарда пациентов, было выше, чем в контроле. Авторы пришли к заключению, что гипофосфорилирование сайтов N2B-последовательности и гиперфосфорилирование PEVK-последовательности титина могут действовать однонаправленно, повышая пассивное напряжение/жесткость сердечной мышцы человека при развитии патологических изменений [38]. Таким образом, ряд исследований указывают на то, что изменения уровня фосфорилирования в сайтах N2B- и PEVK-последовательностях титина сопровождаются увеличением жесткости кардиомиоцитов [38, 40, 73, 76, 77]. При этом инкубация *in vitro* выделенных кардиомиоцитов в растворе, содержащем протеинкиназу А, сопровождалась уменьшением вышеуказанной жесткости [77].

При моделировании стеноза аорты у мышей было показано, что сайты титина, фосфорилируемые протеинкиназой С, также могут играть важную роль в изменении вязкоупругих свойств сердечной мышцы [71]. Так, при измерении пассивного напряжения миокарда было показано, что увеличение жесткости сердечной мышцы у мышей с сердечной недостаточностью связано как с фиброзом, так и с изменением вязкоупругих свойств молекул титина. При этом авторы обнаружили противоречащее вышеуказанным данным увеличение содержания более растяжимой N2BA-изоформы титина и уменьшение содержания более жесткой N2B-изоформы этого белка [71]. Что-

бы выяснить вклад фосфорилирования титина в изменение вязкоупругих свойств его молекул, авторы провели вестерн-блоттинг с использованием антител, специфичных к некоторым фосфосайтам титина. В миокарде мышей с сердечной недостаточностью обнаружено гиперфосфорилирование сайтов титина, фосфорилируемых протеинкиназой A, а также сайта S11878 (S26) в PEVK-последовательности титина, фосфорилируемого протеинкиназой C. При этом сайт S12022 (S170) в PEVK-последовательности титина, также фосфорилируемый протеинкиназой C, был гипофосфорилирован [71]. Авторы сделали вывод, что диастолическая дисфункция, индуцированная стенозом аорты, приводит к увеличению пассивной жесткости миокарда мышей как вследствие фиброза, так и вследствие изменения вязкоупругих свойств молекул титина из-за гиперфосфорилирования сайта S11878 в PEVK-последовательности этого белка. При этом увеличение N2BA/N2B-соотношения изоформ титина не нормализовало пассивную жесткость кардиомиоцитов мышей. По мнению авторов, изменения вязкоупругих свойств молекул титина вследствие фосфорилирования являются основным фактором повышения пассивной жесткости миокарда у мышей с сердечной недостаточностью.

Диастолическая дисфункция у пациентов часто выявляется на фоне других заболеваний, таких как избыточный вес/ожирение, сахарный диабет, хроническая обструктивная болезнь легких и солечувствительная гипертензия. В частности, известно, что при стенозе аорты диастолическая дисфункция левого желудочка является чувствительным маркером дисфункции миокарда, вызванной сахарным диабетом II типа. Так, у пациентов с диастолической дисфункцией и повышенной жесткостью кардиомиоцитов на фоне сахарного диабета II типа обнаружено гипофосфорилирование сайта S4099 N2B-последовательности титина из-за снижения активности протеинкиназы G и гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности этого белка из-за повышенной активности протеинкиназы PKC α [64]. Однако важно подчеркнуть, что пациенты с диабетом принимали лекарства (инсулин, метформин, β -блокаторы), которые могли повлиять на изменения уровня фосфорилирования титина.

Гипертензия также сопутствует диастолической дисфункции. В работе [65] обнаружено, что у пациентов с легочной артериальной гипертензией нарушение диастолической функции правого желудочка вследствие повышенной жесткости кардиомиоцитов сопровождалось гипофосфорилированием следующих сайтов титина: PKA-зависимого сайта S469 в N2B-последовательности и PKC α -зависимого сайта S12022 (S170) в PEVK-последовательности. При этом не было выявлено изменений уровня фосфорилирования в PKC α -зависимом сайте S11878 (S26), расположенном в PEVK-последовательности титина [65]. В работе [78] показано, что у пациентов с легочной артериальной гипертензией развитие диастолической дисфункции правого желудочка развивалось на фоне уменьшения общего уровня фосфорилирования титина, но при отсутствии изменений в N2BA/N2B-соотношении изоформ этого белка.

В связи с тем, что диастолическая дисфункция у пациентов часто выявляется на фоне других заболеваний, указанных выше, адекватной моделью диастолической дисфункции можно считать модель гипертонической кардиомиопатии и гиперлипидемии у свиней [79]. С помощью этой модели авторы выявили развитие гипертрофии левого желудочка и дилатацию левого предсердия у свиней. Эти изменения сопровождалась уменьшением общего уровня фосфорилирования титина и увеличением доли более жесткой N2B-изоформы этого белка, что может вносить вклад в увеличение жесткости миокарда.

Итак, жесткость миокарда, основанная на вязкоупругих свойствах молекул титина, определяется соотношением его изоформ, а также уровнем фосфорилирования сайтов в эластичной I-части молекулы этого белка. Проведенные исследования показывают, что в ситуациях, когда требуется мобилизация растяжения миокарда, соотношение жесткость/эластичность сдвигается в сторону увеличения эластичности, а когда требуется усиление сокращений сердечной мышцы, то увеличивается жесткость молекул титина. При этом изменения уровня фосфорилирования титина все чаще признаются важным

молекулярным инструментом, вносящим вклад в патофизиологию заболеваний сердца. Эти данные о титине открывают новые терапевтические возможности для нормализации сократительной функции миокарда у пациентов с сердечными заболеваниями.

Фосфорилирование титина как мишень для терапии

Титин благодаря изменению экспрессии его изоформ и/или уровня его фосфорилирования все чаще признается в качестве ключевого молекулярного инструмента в патофизиологии некоторых заболеваний сердца. В связи с этим титин является потенциальной мишенью для фармакологических манипуляций, составляя, таким образом, новую терапевтическую мишень. Терапевтические воздействия в этом направлении могут быть направлены как на изменение соотношения N2BA- и N2B-изоформ титина, так и на изменение уровня фосфорилирования этого белка.

Интересным и многообещающим подходом, предложенным недавно, является использование полимеров ламинина в изменении жесткости сердечной мышцы путем изменения экспрессии N2BA- и N2B-изоформ титина [80]. Ламинины – это белки внеклеточного матрикса базальной мембраны кардиомиоцитов. Авторы [80] показали, что внутримиекардиальная *ex vivo* инъекция полиламинина в сердце крысы вызывала увеличение в 1.9 раза экспрессии более эластичной N2BA-изоформы титина и уменьшение в 3.9 раза экспрессии более жесткой N2B-изоформы этого белка по прошествии 4 ч.

Что касается парадигмы лечения сердечных заболеваний путем изменения уровня фосфорилирования титина, то следует поговорить о диастолической дисфункции неишемического происхождения и ее сопутствующих заболеваниях, указанных выше, способных вызывать системное воспалительное состояние. Хроническое воспаление развивается при хронической обструктивной болезни легких, что является одновременно преморбидным признаком диастолической дисфункции [81] и фактором смертности от сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [82]. При висцеральном ожирении жировая ткань инфильтрируется макрофагами, которые вызывают системное воспалительное состояние из-за секреции провоспалительных цитокинов [83]. Недавно было показано, что сопутствующие заболевания сопровождаются более значительным ухудшением функции и структуры миокарда при диастолической дисфункции, чем при артериальной гипертензии [84]. Это подтверждает дополнительное ухудшение диастолической дисфункции за счет таких механизмов, как нейроэндокринная активация [85] и недостаток высокоэнергетических фосфатов [86]. Было также показано, что системное воспалительное состояние, вызванное этими сопутствующими заболеваниями, очевидно, проявляется в связи с высокими циркулирующими уровнями интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли α (TNF- α). Уровни этих же цитокинов были повышены и у пациентов с диастолической дисфункцией [87]. Такое обилие новых данных о структуре, функциях и передаче сигналов в миокарде позволяет создать новую парадигму лечения диастолической дисфункции с помощью фосфорилирования титина. В частности, есть работы, показавшие, что ингибирование рецептора интерлейкина-6 модулирует иммунную реакцию и восстанавливает уровень фосфорилирования титина при экспериментальном миокардите. Так, Nigota и соавт. [88] продемонстрировали, что одновременная сверхэкспрессия IL-6 и рецептора IL-6 у мышей вызывает концентрическую гипертрофию, типичную для гипертонической сердечной недостаточности. В другом исследовании [68] авторы применили антитела к рецептору IL-6 у мышей с целью улучшения сердечной дисфункции, развившейся на фоне миокардита, индуцированного вирусом Коксаки типа В. В миокарде пораженных мышей было выявлено уменьшение общего уровня фосфорилирования N2BA-изоформы титина, тогда как уровень фосфорилирования N2B-изоформы не изменялся [68]. Однократная инъекция антитела MR16-1/tocilizumab к рецептору IL-6 нормализовало функцию сердечной мышцы и общий уровень фосфорилирования титина.

В связи с накопившимся объемом данных о том, что диастолической дисфункции сопутствуют гипертония, гиперлипидемия, и, как следствие, системное провоспалительное состояние и снижение биодоступности оксида азота, становится очевидным, что падает содержание циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и снижается активность протеинкиназы G в кардиомиоцитах. В свою очередь, как известно, низкая активность протеинкиназы G способствует развитию гипертрофии и повышению жесткости кардиомиоцитов вследствие гипофосфорилирования титина. Нарушение регуляции пути цГМФ – протеинкиназа G тесно связано с ремоделированием сердца и развитием сердечной патологии. В настоящее время доступно множество веществ, которые стимулируют этот путь (см. недавний обзор о роли цГМФ в сердце [89]). Ингибиторы фосфодиэстеразы-5А (такие как силденафил) и натрийуретический пептид В-типа, которые повышают уровень цГМФ, показали себя многообещающими в качестве потенциальных средств лечения диастолической дисфункции в доклинических испытаниях. В частности, на модели диастолической дисфункции у собак было показано, что силденафил и натрийуретический пептид В-типа увеличивали уровень фосфорилирования титина, уменьшали жесткость кардиомиоцитов и повышали растяжимость левого желудочка [90].

Однако следует отметить, что несмотря на то, что вышеописанные методы лечения были многообещающими в лабораторных условиях, расхождения в дозировках и метаболические различия между животными и людьми часто являются причиной неудач клинических испытаний [89]. Подобная ситуация – только одно из многих препятствий на пути поиска новых эффективных методов лечения сердечной недостаточности. Кроме того, сложность путей, таких как цГМФ-протеинкиназа G, означает, что регуляция промежуточных этапов пути также может быть непреднамеренно изменена и противодействовать желаемому эффекту лечения. Вероятно, поэтому использование ингибиторов фосфодиэстеразы-5А в исследовании RELAX не выявило значительного улучшения диастолической функции у пациентов, получавших лечение [90, 91]. Аналогичные испытания проводились с ингибиторами фосфодиэстеразы-9А, целью которых также было повышение концентрации цГМФ в сердце и улучшение сердечной функции [92]. При моделировании диастолической дисфункции у мышей показано, что ингибирование фосфодиэстеразы-9А уменьшало диастолическую жесткость левого желудочка сердца [93].

Активаторы/стимуляторы растворимой гуанилатциклазы считаются также многообещающим средством лечения сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса, поскольку было обнаружено, что они повышают уровни цГМФ, что приводит к увеличению активности протеинкиназ A, G и ERK2, и одновременно снижают активность киназ PKC α и CaMKII δ [94, 95]. Однако эти результаты не были воспроизведены ни в клинических исследованиях VITALITY, ни в SOCRATES, так как не наблюдалось улучшения диастолической функции у пациентов с сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса, получавших vericiguat – новый пероральный стимулятор растворимой гуанилатциклазы [96, 97]. Тем не менее считается, что вышеуказанные методы лечения могут быть успешными для подгруппы пациентов с нарушением передачи сигналов пути цГМФ – протеинкиназа G.

В заключительной части этой главы следует остановиться на одном недавнем исследовании, посвященном изучению роли метформина в улучшении диастолической функции сердца мыши при моделировании сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [98]. В частности, авторы использовали операцию по поперечному сужению аорты с введением дезоксикортикостерона ацетата для увеличения диастолической жесткости сердечной мышцы у мышей, а также с целью достижения непереносимости этими животными физических нагрузок. У мышей, получавших метформин с питьевой водой, обнаружено уменьшение пассивной жесткости миокарда левого желудочка, а также увеличение устойчивости к физическим нагрузкам. Эти изменения

наблюдались на фоне гиперфосфорилирования РКА-зависимых сайтов в N2B-последовательности титина, что, как известно, сопровождается уменьшением жесткости молекул титина. Уровень фосфорилирования PEVK-последовательности титина в миокарде мышей, получавших метформин, не изменялся [98]. Принимая во внимание известные данные, что метформин улучшал диастолическую функцию у пациентов с диабетом, авторы сделали осторожное предположение о возможном терапевтическом использовании этого вещества в лечении диастолической дисфункции и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [98]. Другими перспективными терапевтическими средствами, способствующими уменьшению пассивной жесткости миокарда при развитии диабетической кардиомиопатии, считаются инсулин [64] и нейрегулин-1 (NRG-1) [99].

Таким образом, фосфорилирование титина, изменяющее вязкоупругие свойства миокарда, представляет собой потенциальную мишень для терапевтического вмешательства у пациентов с сердечными патологиями. Данные, приведенные в нашем обзоре, демонстрируют положительное влияние на жесткость кардиомиоцитов, в основе которой лежат изменения уровня фосфорилирования титина, таких препаратов, как силденафил, ингибитор фосфодиэстеразы 5A, натрийуретический пептид головного мозга (активатор гуанилатциклазы), метформин, инсулин и нейрегулин-1.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

В. И. М. и Л. В. Л. – идея, анализ литературы, вклад в написание обзора и редакторские правки. М. Г. З. – сбор литературы, написание текста, подготовка рисунка и редакторские правки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет гранта РФФ № 23-15-00275. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Münch J, Abdelilah-Seyfried S (2021) Sensing and Responding of Cardiomyocytes to Changes of Tissue Stiffness in the Diseased Heart. *Front Cell Dev Biol* 9: 642840. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642840>
2. Linke WA (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res* 77(4): 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.029>. PMID: 17475230
3. Chauveau C, Rowell J, Ferreira A (2014) A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat* 35(9): 1046–1059. <https://doi.org/10.1002/humu.22611>
4. Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, Conner L, DePalma SR, McDonough B, Sparks E, Teodorescu DL, Cirino AL, Banner NR, Pennell DJ, Graw S, Merlo M, Di Lenarda A, Sinagra G, Bos JM, Ackerman MJ, Mitchell RN, Murry CE, Lakdawala NK, Ho CY, Barton PJ, Cook SA, Mestroni L, Seidman JG, Seidman CE (2012) Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 366(7): 619–628. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>
5. Fomin A, Gärtner A, Cyganek L, Tiburcy M, Tuleta I, Wellers L, Folsche L, Hobbach AJ, von Frieling-Salewsky M, Unger A, Hucke A, Koser F, Kassner A, Sielemann K, Streckfuß-Bömeke K, Hasenfuss G, Goedel A, Laugwitz KL, Moretti A, Gummert JF, Dos Remedios CG, Reinecke H,

- Knöll R, van Heesch S, Hubner N, Zimmermann WH, Milting H, Linke WA (2021) Truncated titin proteins and titin haploinsufficiency are targets for functional recovery in human cardiomyopathy due to TTN mutations. *Sci Transl Med* 13(618): eabd3079.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3079>
6. Somerville LL, Wang K (1987) In vivo phosphorylation of titin and nebulin in frog skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 147(3): 986–992.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(87\)80167-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(87)80167-5)
 7. Somerville LL, Wang K (1988) Sarcomere matrix of striated muscle: in vivo phosphorylation of titin and nebulin in mouse diaphragm muscle. *Arch Biochem Biophys* 262(1): 118–129.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90174-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90174-9)
 8. Takano-Ohmuro H, Nakauchi Y, Kimura S, Maruyama K (1992) Autophosphorylation of beta-connectin (titin 2) *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 183(1): 31–35.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91604-o](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91604-o)
 9. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H (2002) Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 90(11): 1181–1188.
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000021115.24712.99>
 10. Labeit S, Gautel M, Lakey A, Trinick J (1992) Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J* 11(5): 1711–1716.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05222.x>
 11. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, Wilmanns M, Gautel M (1999) Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395(6705): 863–869.
<https://doi.org/10.1038/27603>. Erratum in: *Nature* 1999 Feb 25;397(6712):719
 12. Gautel M, Leonard K, Labeit S (1993) Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J* 12(10): 3827–3834.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06061.x>
 13. Musa H, Meek S, Gautel M, Peddie D, Smith AJ, Peckham M (2006) Targeted homozygous deletion of M-band titin in cardiomyocytes prevents sarcomere formation. *J Cell Sci* 119(Pt 20): 4322–4331.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03198>
 14. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edström L, Ehler E, Udd B, Gautel M (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308(5728): 1599–1603.
<https://doi.org/10.1126/science.1110463>
 15. Bogomolovas J, Fleming JR, Franke B, Manso B, Simon B, Gasch A, Markovic M, Brunner T, Knöll R, Chen J, Labeit S, Scheffner M, Peter C, Mayans O (2021) Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep* 22(10): e48018.
<https://doi.org/10.15252/embr.201948018>
 16. Peng J, Raddatz K, Molkenin JD, Wu Y, Labeit S, Granzier H, Gotthardt M (2007) Cardiac hypertrophy and reduced contractility in hearts deficient in the titin kinase region. *Circulation* 115(6): 743–751.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.645499>
 17. Sebestyén MG, Wolff JA, Greaser ML (1995) Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J Cell Sci* 108(Pt 9): 3029–3037.
<https://doi.org/10.1242/jcs.108.9.3029>. PMID: 8537442
 18. Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K, Fürst DO (1996) The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci* 109 (Pt 11): 2747–2754.
<https://doi.org/10.1242/jcs.109.11.2747>
 19. Ottenhejm CA, Granzier H (2010) Role of titin in skeletal muscle function and disease. *Adv Exp Med Biol* 682: 105–122.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6366-6_6
 20. Labeit S, Kolmerer B (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270(5234): 293–296.
<https://doi.org/10.1126/science.270.5234.293>
 21. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2000) Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 86(11): 1114–1121.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.11.1114>

22. *Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S* (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 89(11): 1065–1072.
<https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>
23. *Helmes M, Trombitás K, Centner T, Kellermayer M, Labeit S, Linke WA, Granzier H* (1999) Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res* 84(11): 1339–1352.
<https://doi.org/10.1161/01.res.84.11.1339>
24. *Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitás K, Labeit S, Granzier H* (2000) Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 86(1): 59–67.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>
25. *Granzier HL, Irving TC* (1995) Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J* 68(3): 1027–1044.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80278-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80278-X)
26. *Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Rüegg JC, Labeit S* (1996) Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol* 261(1): 62–71.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0441>
27. *Granzier H, Kellermayer M, Helmes M, Trombitás K* (1997) Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction. *Biophys J* 73(4): 2043–2053.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78234-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78234-1)
28. *Trombitás K, Redkar A, Centner T, Wu Y, Labeit S, Granzier H* (2000) Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. *Biophys J* 79(6): 3226–3234.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76555-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76555-6)
29. *Helmes M, Trombitás K, Granzier H* (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79(3): 619–626.
<https://doi.org/10.1161/01.res.79.3.619>
30. *Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA* (2002) Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106(11): 1333–1341.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029803.93022.93>
31. *Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML* (2003) Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res* 59(1): 86–94.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00328-6)
32. *Warren CM, Krzesinski PR, Greaser ML* (2003) Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 24(11): 1695–1702.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305392>
33. *Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA* (2004) Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 95(7): 708–716.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000143901.37063.2f>
34. *Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA* (2012) New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc)* 77(13): 1515–1535.
<https://doi.org/10.1134/S0006297912130093>
35. *Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL* (2005) Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol* 125(3): 257–271.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200409177>
36. *Krüger M, Linke WA* (2006) Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 27(5-7): 435–444.
<https://doi.org/10.1007/s10974-006-9090-5>
37. *Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA* (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 104(1): 87–94.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184408>
38. *Köttter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M* (2013) Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofibrillar stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 99(4): 648–656.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt144>
39. *Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, Yamazaki KG, Granzier HL, Gregorio CC, McCulloch AD, Omens JH, Sheikh F* (2012) A novel mechanism involving four-and-a-

- half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem* 287(35): 29273–29284.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.372839>
40. *Hamdani N, Krysiak J, Kreuzer MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA* (2013) Crucial role for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 112(4): 664–674.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300105>
 41. *Perkin J, Slater R, Del Favero G, Lanzicher T, Hidalgo C, Anderson B, Smith JE 3rd, Sbaizero O, Labeit S, Granzier H* (2015) Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII δ Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force. *Biophys J* 109(12): 2592–2601.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.002>
 42. *Murphy S, Frishman WH* (2005) Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev* 13(1): 3–12.
<https://doi.org/10.1097/01.crd.0000124914.59755.8d>
 43. *Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H* (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105(7): 631–638.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465>
 44. *Anderson BR, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H* (2010) The effects of PKC α phosphorylation on the extensibility of titin's PEVK element. *J Struct Biol* 170(2): 270–277.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.02.00>
 45. *Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasin M, Hutchinson KR, Tsaprailis G, Labeit S, Mattiuzzi A, Granzier HL* (2013) The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol* 54: 90–97.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.012>
 46. *Herwig M, Kolijn D, Lódi M, Hölper S, Kovács Á, Papp Z, Jaquet K, Haldenwang P, Dos Remedios C, Reusch PH, Mügge A, Krüger M, Fielitz J, Linke WA, Hamdani N* (2020) Modulation of Titin-Based Stiffness in Hypertrophic Cardiomyopathy via Protein Kinase D. *Front Physiol* 11: 240.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00240>
 47. *Loescher CM, Breitzkreuz M, Li Y, Nickel A, Unger A, Diel A, Schmidt A, Mohamed BA, Kötter S, Schmitt JP, Krüger M, Krüger M, Toischer K, Maack C, Leichert LI, Hamdani N, Linke WA* (2020) Regulation of titin-based cardiac stiffness by unfolded domain oxidation (UnDOx). *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(39): 24545–24556.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2004900117>
 48. *Fukuda N, Wu Y, Farman G, Irving TC, Granzier H* (2005) Titin-based modulation of active tension and interfilament lattice spacing in skinned rat cardiac muscle. *Pflügers Arch* 449(5): 449–457.
<https://doi.org/10.1007/s00424-004-1354-6>
 49. *Preetha N, Yiming W, Helmes M, Norio F, Siegfried L, Granzier H* (2005) Restoring force development by titin/connectin and assessment of Ig domain unfolding. *J Muscle Res Cell Motil* 26(6-8): 307–317.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-9037-2>. PMID: 16470334
 50. *Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL* (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110(2): 155–162.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF>
 51. *Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, Granzier H* (2002) Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation* 106(11): 1384–1389.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029804.61510.02>
 52. *Van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ* (2006) Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113(16): 1966–1973.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.587519>
 53. *Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ* (2005) Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111(6): 774–781.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155257.33485.6D>
 54. *Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ* (2009) Hypophosphorylation

- of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 104(6): 780–786.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193326>
55. Van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ (2008) Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117(1): 43–51.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728550>
56. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M (2016) Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res* 119(9): 1017–1029.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309685>
57. Bollen IAE, Ehler E, Fleischanderl K, Bouwman F, Kempers L, Ricke-Hoch M, Hilfiker-Kleiner D, Dos Remedios CG, Krüger M, Vink A, Asselbergs FW, van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto YM, Kuster DWD, van der Velden J (2017) Myofilament Remodeling and Function Is More Impaired in Peripartum Cardiomyopathy Compared with Dilated Cardiomyopathy and Ischemic Heart Disease. *Am J Pathol* 187(12): 2645–2658.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.022>
58. Bollen IAE, Schuldt M, Harakalova M, Vink A, Asselbergs FW, Pinto JR, Krüger M, Kuster DWD, van der Velden J (2017) Genotype-specific pathogenic effects in human dilated cardiomyopathy. *J Physiol* 595(14): 4677–4693.
<https://doi.org/10.1113/JP274145>
59. Burke MA, Cook SA, Seidman JG, Seidman CE (2016) Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 68(25): 2871–2886.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>
60. Krüger M, Linke WA (2009) Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 46(4): 490–498.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.01.004>
61. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, Van Buren P, Meyer M, Redfield MM, Bull DA, Granzier HL, LeWinter MM (2015) Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation* 131(14): 1247–1259.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215>
62. Gotsman I, Keren A, Zwas DR, Lotan C, Admon D (2018) Clinical Impact of ABO and Rhesus D Blood Type Groups in Patients With Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol* 122(3): 413–419.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.04.018>
63. Lakomkin VL, Abramov AA, Studneva IM, Ulanova AD, Vikhlyantsev IM, Prosvirnin AV, Lukoshkova EV, Kapelko VI (2020) Early changes of energy metabolism, isoformic content and level of titin phosphorylation at diastolic dysfunction. *Kardiologiya* 60(2): 4–9.
<https://doi.org/10.18087/cardio.2020.3.n531>. PMID: 32345192
64. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M (2018) Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res* 123(3): 342–355.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312166>
65. Rain S, Bos Dda S, Handoko ML, Westerhof N, Stienen G, Ottenheijm C, Goebel M, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, Bogaard HJ, Remedios CD, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS (2014) Protein changes contributing to right ventricular cardiomyocyte diastolic dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *J Am Heart Assoc* 3(3): e000716.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000716>
66. Vikhorev PG, Vikhoreva NN, Yeung W, Li A, Lal S, Dos Remedios CG, Blair CA, Guglin M, Campbell KS, Yacoub MH, de Tombe P, Marston SB (2022) Titin-truncating mutations associated with dilated cardiomyopathy alter length-dependent activation and its modulation via phosphorylation. *Cardiovasc Res* 118(1): 241–253.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa316>
67. Burke MA, Cook SA, Seidman JG, Seidman CE (2016) Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 68(25): 2871–2886.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>
68. Savvatis K, Müller I, Fröhlich M, Pappritz K, Zietsch C, Hamdani N, Grote K, Schieffer B, Klingel K, Van Linthout S, Linke WA, Schultheiss HP, Tschöpe C (2014) Interleukin-6 receptor inhibi-

- tion modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis. *Basic Res Cardiol* 109(6): 449.
<https://doi.org/10.1007/s00395-014-0449-2>
69. *Hamdani N, Hervent AS, Vandekerckhove L, Matheeußen V, Demolder M, Baerts L, De Meester I, Linke WA, Paulus WJ, De Keulenaer GW* (2014) Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Cardiovasc Res* 104(3): 423–431.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvu223>
 70. *Mohamed BA, Schnelle M, Khadjeh S, Lbik D, Herwig M, Linke WA, Hasenfuss G, Toischer K* (2016) Molecular and structural transition mechanisms in long-term volume overload. *Eur J Heart Fail* 18(4): 362–371.
<https://doi.org/10.1002/ehjhf.465>
 71. *Hudson B, Hidalgo C, Saripalli C, Granzier H* (2011) Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res* 109(8): 858–866.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246819>
 72. *Hidalgo C, Granzier H* (2013) Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med* 23(5): 165–171.
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.10.005>
 73. *Røe ÅT, Aronsen JM, Skårdal K, Hamdani N, Linke WA, Danielsen HE, Sejersted OM, Sjaastad I, Louch WE* (2017) Increased passive stiffness promotes diastolic dysfunction despite improved Ca^{2+} handling during left ventricular concentric hypertrophy. *Cardiovasc Res* 113(10): 1161–1172.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx087>
 74. *Mohammed SF, Storlie JR, Oehler EA, Bowen LA, Korinek J, Lam CS, Simari RD, Burnett JC Jr, Redfield MM* (2012) Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. *Cardiovasc Pathol* 21(3): 188–198.
<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.05.002>
 75. *Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatay JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P* (2016) Authors/Task Force Members; Document Reviewers. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18(8): 891–975.
<https://doi.org/10.1002/ehjhf.592>. Epub 2016 May 20. PMID: 27207191
 76. *Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA* (2013) Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97(3): 464–471.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs353>
 77. *Falcão-Pires I, Hamdani N, Borbély A, Gavina C, Schalkwijk CG, van der Velden J, van Heerebeek L, Stienen GJ, Niessen HW, Leite-Moreira AF, Paulus WJ* (2011) Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation* 124(10): 1151–1159.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025270>
 78. *Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, Paulus WJ, Ottenheijm CA, Marcus JT, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, Macdonald P, Dos Remedios C, Postmus PE, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS* (2013) Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 128(18): 2016–2025.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001873>
 79. *Schwarzl M, Hamdani N, Seiler S, Alogna A, Manninger M, Reilly S, Zirngast B, Kirsch A, Steendijk P, Verderber J, Zweiker D, Eller P, Höfler G, Schauer S, Eller K, Maechler H, Pieske BM, Linke WA, Casadei B, Post H* (2015) A porcine model of hypertensive cardiomyopathy: implications for heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(9): H1407–H1418.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00542.2015>
 80. *Hochman-Mendez C, Curty E, Taylor DA* (2020) Change the Laminin, Change the Cardiomyocyte: Improve Untreatable Heart Failure. *Int J Mol Sci* 21(17): 6013.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176013>
 81. *Lam CS, Lyass A, Kraigher-Krainer E, Massaro JM, Lee DS, Ho JE, Levy D, Redfield MM, Pieske BM, Benjamin EJ, Vasan RS* (2011) Cardiac dysfunction and noncardiac dysfunction as

- precursors of heart failure with reduced and preserved ejection fraction in the community. *Circulation* 124(1): 24–30.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.979203>. Erratum in: *Circulation*. 2011 Oct 25;124(17):e458
82. *Ather S, Chan W, Bozkurt B, Aguilar D, Ramasubbu K, Zachariah AA, Wehrens XH, Deswal A* (2012) Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 59(11): 998–1005.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.11.040>
83. *Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J* (2012) Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(11): H2148–H2165.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00907.2011>
84. *Mohammed SF, Borlaug BA, Roger VL, Mirzoyev SA, Rodeheffer RJ, Chirinos JA, Redfield MM* (2012) Comorbidity and ventricular and vascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *Circ Heart Fail* 5(6): 710–719.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.968594>
85. *Bishu K, Deswal A, Chen HH, LeWinter MM, Lewis GD, Semigran MJ, Borlaug BA, McNulty S, Hernandez AF, Braunwald E, Redfield MM* (2012) Biomarkers in acutely decompensated heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Am Heart J* 164(5): 763–770.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.08.014>
86. *Phan TT, Abozguia K, Nallur Shivu G, Mahadevan G, Ahmed I, Williams L, Dwivedi G, Patel K, Steendijk P, Ashrafian H, Henning A, Frenneaux M* (2009) Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. *J Am Coll Cardiol* 54(5): 402–409.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.012>
87. *Collier P, Watson CJ, Voon V, Phelan D, Jan A, Mak G, Martos R, Baugh JA, Ledwidge MT, McDonald KM* (2011) Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? *Eur J Heart Fail* 13(10): 1087–1095.
<https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr079>
88. *Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T* (1995) Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 4862–4866.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4862>
89. *Blanton RM* (2020) cGMP Signaling and Modulation in Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 75(5): 385–398.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000749>
90. *Bishu K, Hamdani N, Mohammed SF, Kruger M, Ohtani T, Ogut O, Brozovich FV, Burnett JC Jr, Linke WA, Redfield MM* (2011) Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility *in vivo*. *Circulation* 124(25): 2882–2891.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.048520>
91. *Redfield MM* (2012) Strategies to screen for stage B as a heart failure prevention intervention. *Heart Fail Clin* 8(2): 285–296.
<https://doi.org/10.1016/j.hfc.2011.12.001>
92. *Lee DI, Zhu G, Sasaki T, Cho GS, Hamdani N, Holewinski R, Jo SH, Danner T, Zhang M, Rainer PP, Bedja D, Kirk JA, Ranek MJ, Dostmann WR, Kwon C, Margulies KB, Van Eyk JE, Paulus WJ, Takimoto E, Kass DA* (2015) Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* 519(7544): 472–476.
<https://doi.org/10.1038/nature14332>
93. *Methawasin M, Strom J, Borkowski T, Hourani Z, Runyan R, Smith JE 3rd, Granzier H* (2020) Phosphodiesterase 9a Inhibition in Mouse Models of Diastolic Dysfunction. *Circ Heart Fail* 13(5): e006609.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006609>
94. *Alogna A, Schwarzl M, Manninger M, Hamdani N, Zirngast B, Kloth B, Steendijk P, Verderber J, Zweiker D, Westermann D, Blankenberg S, Maechler H, Tschöpe C, Linke WA, Marsche G, Pieske BM, Post H* (2018) Acute stimulation of the soluble guanylate cyclase does not impact on left ventricular capacitance in normal and hypertrophied porcine hearts *in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315(3): H669–H680.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00510.2017>
95. *Kolijn D, Kovács Á, Herwig M, Lódi M, Sieme M, Alhaj A, Sandner P, Papp Z, Reusch PH, Haldenwang P, Falcão-Pires I, Linke WA, Jaquet K, Van Linthout S, Mügge A, Tschöpe C, Hamdani N* (2020) Enhanced Cardiomyocyte Function in Hypertensive Rats With Diastolic Dysfunction

and Human Heart Failure Patients After Acute Treatment With Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Activator. *Front Physiol* 11: 345.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00345>

96. *Armstrong PW, Roessig L, Patel MJ, Anstrom KJ, Butler J, Voors AA, Lam CSP, Ponikowski P, Temple T, Pieske B, Ezekowitz J, Hernandez AF, Koglin J, O'Connor CM* (2018) A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Efficacy and Safety of the Oral Soluble Guanylate Cyclase Stimulator: The VICTORIA Trial. *JACC Heart Fail* 6(2): 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.08.013>
97. *Armstrong PW, Lam CSP, Anstrom KJ, Ezekowitz J, Hernandez AF, O'Connor CM, Pieske B, Ponikowski P, Shah SJ, Solomon SD, Voors AA, She L, Vlainic V, Carvalho F, Bamber L, Blaustein RO, Roessig L, Butler J: VITALITY-HFpEF Study Group* (2020) Effect of Vericiguat vs Placebo on Quality of Life in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: The VITALITY-HFpEF Randomized Clinical Trial. *JAMA* 324(15): 1512–1521. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15922>. Erratum in: *JAMA*. 2021 Feb 2;325(5):494
98. *Slater RE, Strom JG, Methawasin M, Liss M, Gotthardt M, Sweitzer N, Granzier HL* (2019) Metformin improves diastolic function in an HFpEF-like mouse model by increasing titin compliance. *J Gen Physiol* 151(1): 42–52. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812259>
99. *Li B, Zheng Z, Wei Y, Wang M, Peng J, Kang T, Huang X, Xiao J, Li Y, Li Z* (2011) Therapeutic effects of neuregulin-1 in diabetic cardiomyopathy rats. *Cardiovasc Diabetol* 10: 69. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-69>

The Role of Titin Phosphorylation in Changes in Myocardial Stiffness in Cardiomyopathies

G. Z. Mikhailova^a, I. M. Vikhlyantsev^{a*}, and V. L. Lakomkin^b

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, Russia*

^b*National Cardiology Research Center, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

The review provides a brief analysis of current knowledge about such post-translational modification of titin as phosphorylation, with an emphasis on the changes that occur during the development of heart diseases. Studies conducted using animal models of heart disease, as well as using biomaterial from cardiac tissue from patients with various pathologies, show changes in the level of titin phosphorylation in comparison with healthy controls. As a rule, hyperphosphorylation of the S11878 site and hypophosphorylation of the S12022 site in the PEVK sequence of titin are observed, as well as changes in the level of phosphorylation of sites in the N2B sequence of this protein during the development of pathological changes. The functional effect of these changes is an increase in the stiffness of cardiomyocytes and cardiac muscle as a whole, which is based on the viscoelastic properties of titin, changes in which, in turn, are observed due to hypo- or hyperphosphorylation of certain sites of this protein. The review also provides a description of a number of therapeutic interventions aimed at changing the level of titin phosphorylation, which are considered as a way to change the viscoelastic properties of pathological myocardium in order to normalize its contractility.

Keywords: cardiac muscle, titin, phosphorylation, heart diseases

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОФИЛЯ КОГНИТИВНОГО ДЕФИЦИТА
У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДА ОПТИМАЛЬНОЙ КЛАСТЕРИЗАЦИИ

© 2024 г. О. М. Разумникова¹, И. В. Тарасова^{2,*}, Ю. А. Мезенцев¹, П. С. Павлов¹,
О. А. Трубникова²

¹Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

²НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

*E-mail: iriz78@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Оригинальный метод кластеризации на основе дискретной оптимизации многомерных объектов по множеству разнородных параметров: возрасту, выраженности стеноза сонных артерий (СА), личностных и когнитивных характеристик применялся для выявления пред- и послеоперационных особенностей профиля когнитивных функций. В исследовании принимали участие 163 кардиохирургических пациента. Определение стенозов СА проводили в дооперационный период с применением цветного дуплексного сканирования и дальнейшей классификацией поражения. Психометрическую оценку личностной и ситуативной тревожности, а также психомоторных и исполнительных функций, внимания, кратковременной памяти выполняли за 3–5 дней до и на 7–10-е сутки после операции коронарного шунтирования (КШ). В результате кластеризации массивов 17 нормализованных показателей и последующего анализа сформированных таким способом трех групп обнаружена разная динамика восстановления профиля когнитивных функций после КШ. Одна из групп была обозначена как группа когнитивных резервов согласно лучшим в ней показателям селекции информации и памяти как в предоперационный, так и в послеоперационный период. Другая выделенная группа характеризовалась послеоперационным повышением скорости селекции информации, но низкими показателями памяти. Третья выделенная группа продемонстрировала тесные взаимосвязи показателей внимания, памяти и эффективности сложной зрительно-моторной реакции с возрастом и степенью стеноза СА вне зависимости от до- или послеоперационного периода тестирования, что может свидетельствовать об устойчивой дезорганизации когнитивных функций у таких пациентов, требующей особого внимания при выборе для них программ нейро- и кардиореабилитации. Следовательно, разработанный метод кластеризации позволяет группировать пациентов по множеству разнородных параметров для выявления динамики их изменений в ходе лечебного воздействия.

Ключевые слова: кластеризация на основе дискретной оптимизации параметров, когнитивный статус, операция коронарного шунтирования, стенозы сонных артерий, возраст

ВВЕДЕНИЕ

Атрофия нейронов, атеросклероз кровеносных сосудов и повышенный риск когнитивных нарушений и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) сопровождают процесс старения [1–3]. Возрастное снижение наблюдается для скорости селекции информации и эффективности выполнения сложных задач с множественным выбором решения [4], а ССЗ сопровождаются дефицитом во многих областях когнитивной деятельности, в том числе нарушениями психомоторных реакций, памяти и исполнительных функций [3, 5, 6]. Тесная взаимосвязь этих процессов и их большое разнообразие в динамике развития вследствие использования индивидуальных когнитивных резервов определяет актуальность продолжения исследования закономерностей формирования когнитивного дефицита у лиц с ССЗ, несмотря на ранее полученные результаты [7–13].

В результате выполненных ранее нами исследований с применением иерархического метода кластеризации для массива показателей когнитивного и эмоционального статуса пациентов с ССЗ была выделена группа риска развития послеоперационной когнитивной дисфункции (ПОКД) после операции коронарного шунтирования [15, 16]. Наиболее информативными для выявления ПОКД оказались показатели скорости реакции на зрительные стимулы, предъявленные в режиме обратной связи с экспозицией этих стимулов, и количество кратковременно запоминаемых слов. Показана эффективность тестирования кратковременной памяти и устойчивости внимания для дифференциации пациентов с разной выраженностью стеноза сонной артерии (СА): постоперационное улучшение этих показателей обнаружено в группе без стеноза, а снижение – при стенозах СА более 50%, причем пациенты последней группы отличались также старшим возрастом и большей личностной тревожностью [16]. Однако группы со стенозом менее 50% и без его диагноза в анамнезе характеризовались смешанным соотношением возраста, тревожности и показателей когнитивного статуса. Вследствие этого с целью выяснения комплекса этих разнородных переменных, наиболее информативного для прогноза риска развития ПОКД, и выделения групп пациентов с ИБС, различающихся профилем восстановления когнитивных функций, как следствия разной индивидуальной динамики восстановления активности мозга после КШ, нами был использован оригинальный метод кластеризации на основе дискретной оптимизации многомерных объектов по множеству разнородных параметров [17–19].

Применение этого метода для анализа показателей мощности ЭЭГ позволило ранее выделить группу пациентов с ССЗ, отличающуюся высокочастотной активностью мозга [20], которая рассматривается как один из нейрофизиологических показателей послеоперационного когнитивного дефицита [21].

В продолжение этого направления исследований для выяснения соотношения преоперационного профиля когнитивных функций и его послеоперационной реорганизации у кардиохирургических пациентов было разработано программное обеспечение и выполнены вычисления с применением оптимальной кластеризации многомерных объектов по множеству разнородных параметров: возрасту, наличию стеноза СА и когнитивных характеристик. Основной особенностью этого метода является ориентация на минимизацию суммарных расстояний между всеми парами объектов, включаемыми в кластер. В отличие от большинства других подходов, включая метод к-центров, полученные результаты не зависят от выбора начальных приближений к оптимумам и гарантируют максимальную к ним близость.

Вычисления были выполнены с использованием гибридного алгоритма, сочетающего преимущества точных методов на базе кластеризации в парных расстояниях на начальном этапе (была применена одна из модификаций алгоритма муравьиной колонии) и быстрейшего метода решения упрощенных задач с кластеризацией по

Таблица 1. Клинико-anamnestические характеристики пациентов, перенесших коронарное шунтирование

Показатели		Пациенты <i>n</i> = 163
Возраст, лет, Ме [Q25; Q75]		58 [53; 63]
Образование, <i>n</i> (%)	Среднее	132 (81)
	Высшее	31 (19)
Курение, <i>n</i> (%)		86 (53)
Длительность анамнеза ИБС, лет, Ме [Q25; Q75]		5.5 [3.5; 11]
Наличие артериальной гипертензии, <i>n</i> (%)		143 (88)
Фракция выброса левого желудочка, %, Ме [Q25; Q75]		58 [51; 63]
Функциональный класс стенокардии, <i>n</i> (%)	I-II	103 (63)
	III	60 (37)
ХСН, функциональный класс, <i>n</i> (%)	I-II	108 (66)
	III	55 (34)
Стенозы СА, <i>n</i> (%)	менее 30 %	86 (53)
	30–49%	49 (30)
	> 50 %	28 (17)
Наличие сахарного диабета 2-го типа, <i>n</i> (%)		37 (23)
Инсульт в анамнезе, <i>n</i> (%)		12 (7)
Тип операции, <i>n</i> (%)	Изолированное КШ	135 (83)
	Сочетанное вмешательство	28 (17)

ИБС – ишемическая болезнь сердца; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; СА – сонные артерии; Ме [Q25; Q75] – обозначение медианы и нижнего и верхнего квартилей для соответствующей переменной.

центрам кластеров на завершающем этапе [19, 22]. Для анализа были взяты переменные, информативные для прогноза ПОКД [15, 16, 24], и заданы три кластера, учитывая данные клинической классификации стенозов и ранее полученные нами результаты, указывающие на разные формы организации показателей когнитивных функций в группах пациентов в до- и послеоперационный период [15, 16].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены данные 163 пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС), перенесших изолированное коронарное шунтирование или сочетанную операцию коронарного шунтирования с каротидной эндартерэктомией. Более подробно критерии включения пациентов в исследование были описаны ранее [14–16]. Определение стенозов СА проводили в дооперационный период с применением цветного дуплексного сканирования с дальнейшей его классификацией по

Таблица 2. Краткие обозначения когнитивных характеристик, использованных при кластеризации

Переменная	Обозначение
<i>Тест Зрительно-моторная реакция выбора</i>	
Время реакции	СЗМР-СР
Количество ошибок	СЗМР-КО
<i>Тест Уровень функциональной подвижности нервных процессов (с обратной связью экспозиции стимулов согласно скорости ответов)</i>	
Время реакции	УФП-СР
Количество ошибок	УФП-КО
Количество пропущенных сигналов	УФП-ППС
<i>Тест Работоспособность головного мозга (с обратной связью экспозиции стимулов согласно скорости ответов, фиксированная продолжительность выполнения – 5 мин)</i>	
Время реакции	РГМ-СР
Количество ошибок	РГМ-КО
Количество пропущенных сигналов	РГМ-ППС
<i>Тест Корректирующая проба Бурдона</i>	
Количество символов, обработанных за 1-ю минуту	КПБ_1
Количество символов, обработанных за 4-ю минуту	КПБ_4
<i>Тесты Кратковременное запоминание</i>	
Чисел	З_ч
Слогов	З_слг
Слов	З_слв

NASCET (диаметр просвета сосуда, оставшийся в наиболее узкой части стенозированного участка соотносится с диаметром просвета интактного участка внутренней сонной артерии дистальнее стеноза) и ECST (диаметр просвета в наиболее узкой части стенозированного участка соотносится с расчетной величиной диаметра просвета сосуда) и выделением трех групп: 1) с отсутствием стенозов или их малой выраженностью (менее 30%), 2) умеренного (30–49%) и 3) выраженного (более 50%).

Клинико-anamнестические характеристики участников исследования представлены в табл. 1.

Когнитивные функции были оценены на программном психофизиологическом комплексе «Status PF» в два этапа: за 3–5 дней до кардиохирургического вмешательства и на 7–10-е сутки после него. Подробнее процесс психометрического тестирования описан ранее [15]. В табл. 2 представлен перечень полученных когнитивных показателей. Для оценки личностной и ситуативной тревожности использовали опросник Спилбергера–Ханина.

Таблица 3. Различия переменных в трех кластерах, сформированных по дооперационным данным кардиохирургических пациентов

Переменная	Кластер			Н/р	p-значение	
	1 стеноз	2 дефицит	3 резервы		p 1_3	p 2_3
Выраженность стеноза СА	1	0	0	111.94/0.000	0.0001	н/з
Личностная тревожность	40	41	37	12.21/0.002	0.018	0.003
Ситуативная тревожность	21	23	19	11.29/0.004	н/з	0.003
УФП-КО	25	25	22	12.97/0.0015	0.012	0.003
УФП-ППС	15	15	19	9.91/0.007	н/з	0.006
РГМ-СР	450	432	416	7.30/0.026	0.020	н/з
РГМ-КО	123	123	104	9.96/0.007	0.014	0.025
РГМ-ППС	57	58	86	17.12/0.002	0.0005	0.002
КПБ_1	66	65	89	30.04/0.000	0.0001	0.0001
КПБ_4	85	91	117	26.54/0.000	0.0001	0.0001
З_ч	4	4	6	27.16/0.000	0.0001	0.0001
З_слг	3	2	4	22.51/0.000	0.032	0.0001

Обозначения, как в табл. 2; приведены медианы каждого показателя; p – значимость результата множественных сравнений между обозначенными кластерами согласно Н-критерию Краскелла – Уоллиса; p_{1_3} при сравнении 1-го и 3-го кластеров, p_{2_3} при сравнении 2-го и 3-го кластеров; н/з – нет значимых различий между соответствующими переменными.

Для классификации массива разнородных переменных: показателей возраста, выраженности стеноза СА, тревожности и когнитивных функций применяли разработанный нами гибридный алгоритм, сочетающий преимущества точных методов кластеризации в парных расстояниях на начальном этапе с быстроедействием методов решения упрощенных задач с кластеризацией по центрам кластеров [22, 23]. С применением этого алгоритма гибридной оптимальной кластеризации на основе анализа массивов 17 нормализованных показателей были сформированы 3 кластера из предоперационных данных и 3 – из послеоперационных.

Последующий статистический анализ специфики кластерной организации показателей когнитивно-эмоционального статуса пациентов, зарегистрированных до и после операции коронарного шунтирования, выполняли с применением пакета программ Statistica 13.3 (SN: JPZ912J057923 CNET2ACD-K).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 3 и 4 приведены значения медиан исследованных показателей и уровень p для их межгрупповых различий в 3 кластерах, сформированных на основе анализа показателей возраста, выраженности стеноза СА, личностной и ситуативной тревожности и когнитивных функций, оцененных в до- и послеоперационный периоды. Сравнительный анализ всех переменных в 3 кластерах выполняли с применением непараметрического Н-критерия Краскелла–Уоллиса.

Таблица 4. Различия переменных в трех кластерах, сформированных по послеоперационным показателям когнитивных функций кардиохирургических пациентов

Переменная	Кластер			Н/р	<i>p</i> -значение		
	1 стеноз	2 дефицит	3 резервы		<i>p</i> 1_2	<i>p</i> 1_3	<i>p</i> 2_3
Возраст	61	57	57	9.06/0.011	0.04	0.02	н/з
Выраженность стеноза СА	1	1	0	49.09/0.000	н/з	0.0001	0.0001
Личностная тревожность	43	38	37	13.51/0001	0.03	0.0001	н/з
СЗМР-СР	554.5	507.0	515.5	11.67/0.003	0.002	н/з	н/з
УФП-КО	25.5	27.0	23.0	19.11/0.0001	н/з	н/з	0.0001
УФП-ППС	15.0	9.0	14.0	15.31/0.0005	0.001	н/з	0.01
РГМ-СР	435.5	442.0	420.5	10.01/0.007	н/з	0.04	0.01
РГМ-КО	129.5	140.0	115.5	10.13/0.0001	н/з	0.02	0.0001
РГМ-ППС	51.5	31.0	79.0	34.14/0.000	0.02	0.003	0.0001
КПБ_4	87.0	105.0	101.5	6.26/0.044	0.05	н/з	н/з
З_ч	5.0	4.0	5.0	15.28/0.0005	0.01	н/з	0.001
З_слг	3.0	2.0	3.5	26.57/0.000	0.004	н/з	0.0001
З_слв	4.0	4.0	5.0	10.14/0.006	н/з	н/з	0.007

Обозначения, как в табл. 2 и 3.

Количество пациентов в выделенных кластерах при вычислениях с дооперационными показателями составило 57, 53 и 53 человека. Дооперационный Кластер 1 (обозначим его как группа Стеноз) включал всех пациентов со стенозом СА более 50% и дополнительно тех, кто принадлежал к группе по стенозу менее 50%, но более 30%. Эта группа не отличалась по когнитивным характеристикам в сравнении с Кластером 2 (группа Дефицит), различия наблюдались только в показателе выраженности стеноза ($N = 111.94$ при $p < 0.0001$), а при сравнении с Кластером 3 (группа Резервы) различия были представлены широким комплексом показателей селекции информации и памяти, указывавшим на дефицит памяти, внимания и скорости реакции при селекции стимулов ($0.00001 < p < 0.03$ по критерию Краскелла–Уоллиса) (см. табл. 3).

Кластер 3 (группа Резервы) отличался от Кластеров 1 и 2 меньшими значениями личностной и ситуативной тревожности, а также лучшими показателями внимания и памяти при меньшем количестве ошибок в сравнении с Кластером 2. Кластеры, сформированные на основе группировки данных, зарегистрированных в дооперационный период, не имели значимых различий ни по возрасту, ни по показателям сложной зрительно-моторной реакции, времени реакции при тестировании функциональной подвижности нервных процессов с обратной связью экспозиции стимулов согласно скорости ответов и кратковременной вербальной памяти.

При кластеризации переменных с включением послеоперационных значений когнитивных показателей были выделены также три кластера, однако с перераспреде-

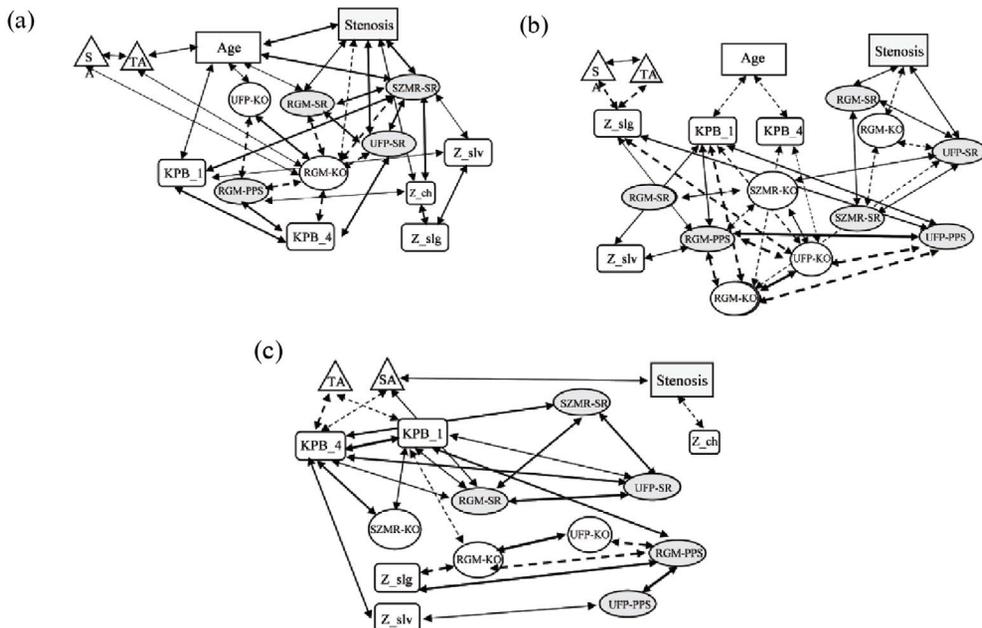


Рис. 1. Взаимосвязь исследованных параметров в трех кластерах, сформированных на основе дооперационных показателей пациентов с ИБС. Обозначения, как в табл. 2. Положительные корреляции обозначены сплошными линиями, негативные – пунктиром ($0.00001 < p < 0.05$ по критерию Спирмена). (а) Кластер 1 – группа Стеноз; (б) Кластер 2 – группа Дефицит; (с) Кластер 3 – группа Резервы.

лением пациентов, составивших около 30% в сравнении с количественным составом групп, сформированных на основе дооперационных показателей. Подобный эффект нестабильности при группировке пациентов с применением иерархического кластерного анализа был отмечен ранее при выяснении наиболее информативных показателей когнитивного статуса пациентов как предикторов риска ПОКД [15]. Медианы всех исследованных переменных и результаты их межгрупповых различий согласно критерию Краскелла – Уоллиса в сформированных послеоперационных кластерах (соответственно 58, 55 и 50 человек), обозначенных аналогично дооперационным, представлены в табл. 4.

Полученные данные указывают на перемещение в группу Стеноз пациентов старшего возраста с повышенной личностной тревожностью, а в группу Дефицит – тех, кто характеризуется стенозом выше 50%. Это обуславливает появление значимых межгрупповых различий по этим параметрам (см. табл. 4). Различия в когнитивных показателях, зарегистрированных в послеоперационный период и дифференцирующих все три группы, связаны с количеством пропущенных сигналов (РГМ-ППС). Их число было наименьшим в группе Дефицит (Кластер 2), однако сопровождалось наибольшим числом ошибок и временем реакции при тестировании работоспособности мозга (РГМ-КО и РГМ-СР).

Кластеры, сформированные на основе группировки данных, зарегистрированных в послеоперационный период, не имели значимых различий в ситуативной тревожности, показателях ошибок при выполнении сложной зрительно-моторной реакции (СЗМР-КО), начальной скорости селекции букв в пробе Бурдона (КПБ_1) и кратковременной вербальной памяти (З_слв), см. табл. 4. Таким образом, только один показа-

тель СЗМР-КО из 17 переменных не участвует явно в конечной дифференциации трех групп переменных с применением метода дискретной оптимизации.

Особенности взаимосвязи возрастных, клинико-anamnestических, личностных и когнитивных характеристик в каждом из выделенных кластеров были исследованы с применением непараметрического корреляционного анализа Спирмена. На рис. 1 схематично изображены корреляционные плеяды в трех выделенных кластерах с применением дооперационных данных, а на рис. 2 – послеоперационных. Учитывая множественность переменных, полученные корреляции были скорректированы с поправкой Бонферрони и представлены для сравнения на рис. 3 (при $p < 0.003$) для параметров когнитивных функций, зафиксированных до операции (а) и в послеоперационный период (б). Повышение статистической значимости при корреляционном анализе переменных в кластерах привело к выделению наиболее устойчивых взаимосвязей, преимущественно в рамках сходных по своей природе заданий. Наиболее универсальным по своей взаимосвязи с другими показателями когнитивных функций оказалось количество ошибок при оценке работоспособности головного мозга (РГМ-КО), устойчиво связанное с количеством ошибок при оценке функциональной подвижности нервных процессов (УФП-КО) и негативно коррелирующее с разными скоростными показателями селекции информации (см. рис. 3), указывая таким образом на ослабление эффективности тормозных функций префронтальной коры у пациентов с ССЗ [6, 10, 13].

Коррекция на множественные сравнения переменных, однако, приводит к частичной потере отмеченного ранее функционального значения возраста или стеноза в изменениях когнитивных функций у пациентов с ИБС [7, 13, 16], поэтому рассмотрим особенности корреляционных плеяд, представленных на рис. 1 и 2.

Как можно видеть на рис. 1, Кластер 1 (группа Стеноз) представляет в первую очередь эффективность скоростных процессов селекции информации в нервной системе (максимальное число связей для параметров СЗМР-СР и РГМ-КО), которые тесно связаны с возрастом и выраженностью стеноза СА у пациентов с ИБС. Неудивительно, что и возраст, и наличие стеноза СА, и повышенная тревожность являются факторами, усиливающими когнитивный дефицит: т. е. большее количество ошибок при большем времени выполнения зрительно-моторных реакций в разных условиях их тестирования.

Следует, однако, отметить, что группа Стеноз характеризуется опосредованной возрастом положительной связью с показателями выполнения корректурной пробы Бурдона (КПБ) при негативной связи с количеством сделанных ошибок КО, что может отражать усиление исполнительного контроля при выполнении поставленных задач, обеспечивающих, вероятно, компенсаторный эффект при сравнении когнитивных показателей в Кластерах 1 и 2.

Кластер 2 (группа Дефицит) в большей мере отражает эффективность функций внимания, в том числе ее снижение с возрастом, о чем свидетельствуют негативные связи с показателями КПБ_1 и КПБ_4. Повышению этой эффективности сопутствуют более точные зрительно-моторные реакции. Его обозначение как группы с когнитивным дефицитом, отмеченным при сравнении с Кластером 3 (см. табл. 3), можно связать с суммацией негативных эффектов: снижением скорости реакции при усилении стеноза СА, замедлением селекции информации при повышении возраста и ухудшением памяти с ростом тревожности (см. рис. 1).

Кластер 3 (группа Резервы) также представляет функции внимания: снижение скорости селекции при росте тревожности, но увеличение – вместе с улучшением исполнительного контроля, на что указывают положительные связи КПБ_1 и КПБ_4 с показателями СЗМР-СР, РГМ-СР и УФП-СР. Особенностью этого кластера является отсутствие влияния возраста и сравнительно слабое значение стеноза СА. При этом Кластер 3 характеризуется сравнительно лучшими показателями внимания,

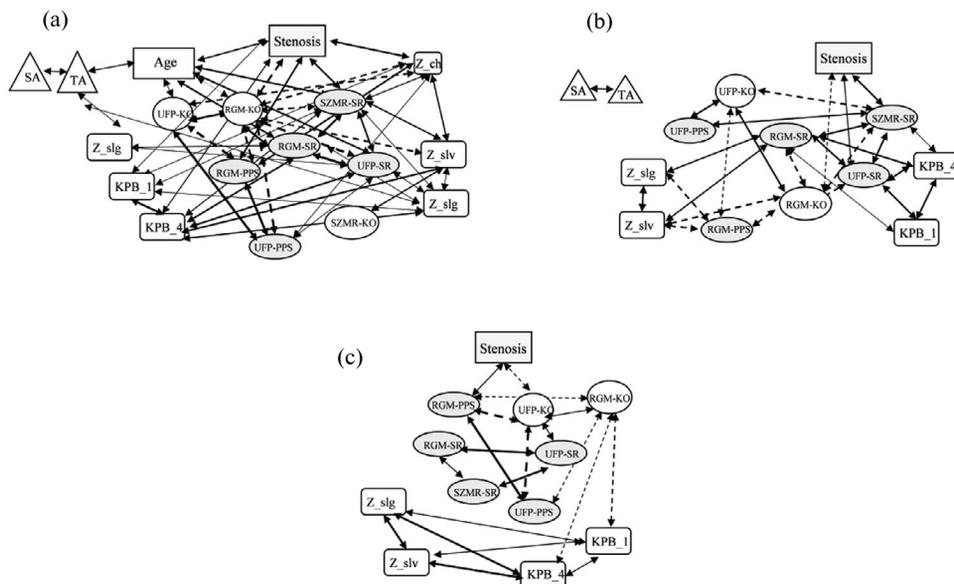


Рис. 2. Взаимосвязь исследованных параметров в трех кластерах, сформированных на основе послеоперационных данных пациентов со стабильной ИБС. Обозначения, как на рис. 1.

памяти и скорости ответа как при их до-, так и послеоперационной оценке, хотя с большим числом ошибок при тестировании сложной зрительно-моторной реакции (табл. 3 и 4).

Введение поправки на множественные сравнения приводит к потере значимых связей между показателями когнитивных функций с возрастом или стенозом в 2-х кластерах (в группах Дефицит и Резервы) как в дооперационный, так и послеоперационный периоды при общем ослаблении связи когнитивных показателей с тревожностью (см. рис. 3), что указывает на их широкое индивидуальное разнообразие. Изображенные на рис. 3 корреляции переменных свидетельствуют, что только в одной группе пациентов (Кластер 1) стеноз и возраст являются теми устойчивыми характеристиками, которые способствуют замедлению селекции информации и принятия решения при разных формах тестирования этих когнитивных функций, причем в предоперационный период этот эффект замедления преимущественно связан с выраженностью стеноза, а при послеоперационном тестировании – с возрастом (рис. 3б).

Корреляционные плеяды для кластеров, сформированных на основе послеоперационных данных, имеют ряд специфических особенностей, свидетельствующих о реорганизации когнитивных функций: сравнительно в меньшей степени для группы Стеноз, с усилением связей в группе Дефицит и их ослаблением в группе Резервы.

Следовательно, только в этой группе (Кластер 3) наблюдается большая по сравнению с дооперационным периодом дифференциация процессов селекции информации в разных режимах, поддержания скорости и бдительности внимания в корректурной пробе и кратковременного запоминания информации. В пользу такой гипотезы свидетельствуют данные о послеоперационной реорганизации активности мозга и улучшении показателей когнитивных функций, однако, с риском возникновения ПОКД [9, 14, 18, 24].

Сформированные кластеры отражают, по-видимому, разную динамику этих процессов, обусловленную индивидуальными особенностями когнитивных резервов пациен-

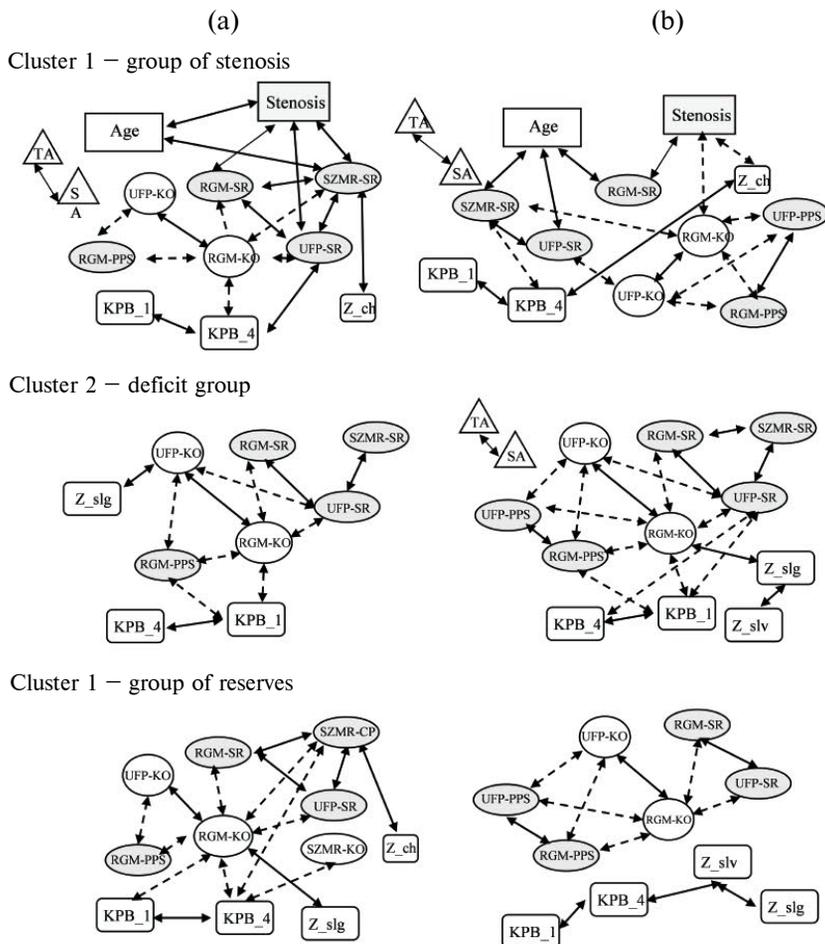


Рис. 3. Взаимосвязь исследованных параметров в трех кластерах, сформированных на основе дооперационных (а) и послеоперационных (б) данных пациентов со стабильной ИБС. Обозначения, как в табл. 2. Положительные корреляции обозначены сплошными линиями, негативные – пунктиром ($0.00001 < p < 0.003$ по критерию Спирмена).

тов [8, 10], но при сохранении негативного влияния стеноза на скорость ментальных процессов. Это неудивительно, так как вряд ли стоит ожидать полного восстановления мозгового кровообращения в течение одной недели после КШ. В этом отношении Кластер 1 (группа Стеноз) представляет наиболее ригидную группу с сохранившейся в послеоперационный период тесной взаимосвязью показателей внимания, памяти и скорости реакции, т. е. максимально представляющей дедифференциацию этих когнитивных функций, а также их связи с возрастом и наличием стеноза СА.

Кластер 2 (группа Дефицит) характеризуется когнитивным дефицитом по многим зафиксированным показателям в сравнении с Кластером 3 (группа Резервы) (см. табл. 4). Однако наблюдаемая в этом кластере реорганизация взаимосвязи когнитивных показателей, представленная восстановлением скоростных характеристик селекции информации (СЗМР-СР, УФП-СР) и снижением числа пропущенных стимулов (УФП-ППС, РГМ-ППС), сопровождающаяся повышением количества ошибок (РГМ-КО

и УФП-КО) и отсутствием улучшения показателей памяти (З_ч и З_{слг}), позволяет только прогнозировать возможность компенсации когнитивного дефицита в дальнейшем. О сравнительно низком потенциале восстановления когнитивных функций в этой группе свидетельствует наблюдаемое послеоперационное усиление их дедифференциации (см. рис. 3b).

Кластер 3 был обозначен как группа Резервы в результате анализа предоперационного профиля когнитивных функций (табл. 3), что подтвердилось при послеоперационной оценке этих показателей (табл. 4). В этом кластере влияние стеноза СА представлено слабее, чем в других группах пациентов (табл. 4, рис. 1–3). Связь со стенозом присутствует только при отсутствии коррекции корреляций на множественные сравнения: в этом случае большая выраженность стеноза СА в группе Резервы способствует большому количеству пропущенных сигналов при тестировании работоспособности мозга, но меньшему количеству ошибок при оценке функциональной подвижности нервных процессов (соответственно РГМ-ППС и УФП-КО на рис. 2).

Таким образом, применение разработанного программного обеспечения кластеризации на основе метода дискретной оптимизации позволяет выделять группы пациентов с ССЗ, наиболее или наименее проблемных (соответственно группа Стеноз и группа Резервы) в отношении восстановления разных когнитивных функций после КШ, и специализированного на этой основе выбора программ нейро- и кардиореабилитации. Вследствие обнаруженной нестабильности состава кластеров разработку рекомендаций для улучшения качества жизни пациентов желательно проводить со сравнением результатов до- и послеоперационного тестирования их когнитивного статуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод кластеризации на основе дискретной оптимизации многомерных объектов по множеству разнородных параметров позволяет группировать пациентов с ССЗ, различающихся возрастными, клиничко-анамнестическими, личностными и когнитивными характеристиками, зарегистрированными в периоды до- и послеоперационного тестирования. В результате анализа сформированных таким способом кластеров с учетом степени выраженности стеноза сонной артерии выделены три группы с разной динамикой восстановления профиля когнитивных функций после операции коронарного шунтирования.

Одна из групп, согласно показателям возраста, степени стеноза, тревожности и эффективности селекции информации и кратковременной памяти, характеризовалась наличием когнитивных резервов в предоперационный период и их реализацией при послеоперационном тестировании. Другая выделенная группа была обозначена как дефицитарная из-за сравнительно низких показателей когнитивных функций на этапе дооперационного тестирования и только частичного их восстановления после операции, однако с возможностью отсроченного этого эффекта в будущем. Такой прогноз обусловлен обнаруженной реорганизацией показателей когнитивных процессов и литературными данными об улучшении мозгового кровообращения после операции коронарного шунтирования. Третья выделенная группа продемонстрировала тесные взаимосвязи показателей внимания, памяти и эффективности сложной зрительно-моторной реакции с возрастом и степенью стеноза СА вне зависимости от до- или послеоперационного периода тестирования, что может свидетельствовать об устойчивой дезорганизации когнитивных функций у таких пациентов, требующей особого внимания при выборе для них программ нейро- и кардиореабилитации.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

О. М. Р. – вклад в концепцию и дизайн исследования, статистический анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание. И. В. Т. – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание. Ю. А. М. – разработка алгоритма гибридной оптимальной кластеризации данных исследования, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание. П. С. П. – разработка программного обеспечения алгоритма гибридной оптимальной кластеризации данных исследования, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание. О. А. Т. – вклад в концепцию и дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета РФФИ (проект № 19-29-01017) и программы исследований ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (фундаментальная тема № 122012000364-5 от 20.01.2022 г.). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по этике Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия), протокол № 10 от 10.12.2020 г.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wählin A, Nyberg L* (2019) At the heart of cognitive functioning in aging. *Trends Cogn Sci* 23(9): 717–720.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.06.004>
2. *De Montgolfier O, Thorin-Trescases N, Thorin E* (2020) Pathological continuum from the rise in pulse pressure to impaired neurovascular coupling and cognitive decline. *Am J Hypertens* 33(5): 375–390.
<https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa001>
3. *Farnsworth von Cederwald B, Josefsson M, Wählin A, Nyberg L, Karalija N* (2022) Association of cardiovascular risk trajectory with cognitive decline and incident dementia. *Neurology* 98(20): e2013–e2022.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200255>
4. *Finkenzeller T, Würth S, Müller E, Amesberger G* (2019) Aging-related changes of cognitive performance and stress regulation in high functioning elderly individuals. *Scand J Med Sci Sports* 29 Suppl 1: 17–25.
<https://doi.org/10.1111/sms.13374>
5. *Goh FQ, Kong WKF, Wong RCC, Chong YF, Chew NWS, Yeo TC, Sharma VK, Poh KK, Sia CH* (2022) Cognitive impairment in heart failure – a review. *Biology (Basel)* 11(2): 179.
<https://doi.org/10.3390/biology11020179>
6. *Frey A, Sell R, Homola GA, Malsch C, Kraft P, Gunreben I, Morbach C, Alkonyi B, Schmid E, Colonna I, Hofer E, Müllges W, Ertl G, Heuschmann P, Solymosi L, Schmidt R, Störk S, Stoll G* (2018) Cognitive deficits and related brain lesions in patients with chronic heart failure. *JACC Heart Fail* 6(7): 583–592.
<https://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.03.010>

7. Трубникова ОА, Тарасова ИВ, Сырова ИД, Малева ОВ, Мамонтова АС, Барбараш ОЛ (2014) Роль стенозов сонных артерий в структуре ранней послеоперационной когнитивной дисфункции у пациентов, перенесших коронарное шунтирование. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 114(11): 36–42. [Trubnikova OA, Tarasova IV, Syrova ID, Maleva OV, Mamontova AS, Barbarash OL (2014) A role of carotid stenoses in the structure of early postoperative cognitive dysfunction in patients underwent coronary artery bypass grafting. Zhurn Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova 114(11): 36–42. (In Russ)].
8. Разумникова ОМ (2015) Закономерности старения мозга и способы активации его компенсаторных ресурсов. Успехи физиол наук 46(2): 3–16. [Razumnikova OM (2015) Effects of aging brain and activation methods of its compensatory resources. Uspehi fiziol nauk 46(2): 3–16. (In Russ)].
9. Anazodo UC, Shoemaker JK, Suskin N, Ssali T, Wang DJ, St Lawrence KS (2016) Impaired cerebrovascular function in coronary artery disease patients and recovery following cardiac rehabilitation. Front Aging Neurosci 7: 224.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00224>
10. Schwartz CE, Rapkin BD, Healy BC (2016) Reserve and Reserve-building activities research: key challenges and future directions. BMC Neurosci 17(1): 62.
<https://doi.org/10.1186/s12868-016-0297-0>
11. De la Torre JC (2017) Are major dementias triggered by poor blood flow to the brain? theoretical considerations J Alzheimers Dis 57(2): 353–371.
<https://doi.org/10.3233/JAD-161266>
12. Samieri C, Perier MC, Gaye B, Proust-Lima C, Helmer C, Dartigues JF, Berr C, Tzourio C, Empana JP (2018) Association of cardiovascular health level in older age with cognitive decline and incident dementia. JAMA 320 (7): 657–664.
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.11499>
13. Тарасова ИВ, Трубникова ОА, Разумникова ОМ (2020) Пластичность функциональных систем мозга как компенсаторный ресурс при нормальном и патологическом старении, ассоциированном с атеросклерозом. Атеросклероз 16(1): 59–67. [Tarasova IV, Trubnikova OA, Razumnikova OM (2020) Plasticity of the functional systems of the brain as a compensatory resource in normal and pathological aging associated with atherosclerosis. Atherosclerosis 16(1): 59–67. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15372/ATER20200108>
14. Тарасова ИВ, Акбиров РМ, Тарасов РС, Трубникова ОА, Барбараш ОЛ (2019) Изменения показателей электрической активности головного мозга у пациентов, перенесших одномоментное коронарное шунтирование и каротидную эндартерэктомию. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 119(7): 41–47. [Tarasova IV, Akbirov RM, Tarasov RS, Trubnikova OA, Barbarash OL (2019) Electric brain activity in patients with simultaneous coronary artery bypass grafting and carotid endarterectomy. Zhurn Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova 119(7): 41–47. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro201911907141>
15. Разумникова ОМ, Тарасова ИВ, Трубникова ОА, Барбараш ОЛ (2022) Кластеризация показателей когнитивного статуса кардиохирургических пациентов для оценки риска его послеоперационных изменений. Acta Biomed Sci 7(1): 129–138. [Razumnikova OM, Tarasova IV, Trubnikova OA, Barbarash OL (2022) Clustering of indicators of the cognitive status in cardiac surgery patients to assess the risk of postoperative decline. Acta Biomed Sci 7(1): 129–138. (In Russ)].
<https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.1.15>
16. Разумникова ОМ, Тарасова ИВ, Трубникова ОА, Барбараш ОЛ (2022) Изменения в структуре когнитивных функций и тревожности у кардиохирургических пациентов в зависимости от выраженности стенозов сонных артерий. Комплексн пробл серд-сосуд заболев 11(1): 36–48. [Razumnikova OM, Tarasova IV, Trubnikova OA, Barbarash OL (2022) The changes in the structure of cognitive functions and anxiety in cardiac surgery patients depending on the severity of carotid arteries. Complex Issues Cardiovasc Diseas 11(1): 36–48. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-1-36-48>
17. Mezentsev YA, Chubko NY (2021) On one bicriterion discrete optimization problem and a hybrid ant colony algorithm for its approximate solution. Lecture Notes Comput Sci 12689: 289–300.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-78743-1_26
18. Mezentsev YA, Korotkova YL (2021) Application problem and effective algorithm of the parallel-sequential system schedule optimization. Actual problems of electronic instrument engineering (APEIE–2021): Proc 15 intern sci and techn conf. Novosibirsk. Publ NSTU. 648–653.
<https://doi.org/10.1109/APEIE52976.2021.9647516>
19. Мезенцев ЮА, Баранова НВ, Павлов ПС (2022) Об одной прикладной задаче смешанного программирования и эффективном алгоритме оптимального выбора альтернатив. Информ

- технол 28 (6): 319–325. [Mezentsev YuA, Baranova NV, Pavlov PS (2022) On an applied problem of mixed programming and an efficient algorithm for the optimal choice of alternatives and resource management. Inform Technol 28 (6): 319–325. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17587/it.28.319-325>
20. Razumnikova OM, Mezentsev YuA, Pavlov PS, Tarasova IV, Trubnikova OA (2021) Differentiation of cognitive status in patients with coronary artery disease using EEG clusterization by discrete optimization with a minimax criterion. *Opera Med Physiol* 8(3): 42–51.
<https://doi.org/10.24412/2500-2295-2021-3-42-51>
 21. Тарасова ИВ, Разумникова ОА, Трубникова ОА, Мезенцев ЮА, Куприянова ДС, Барбараш ОЛ (2021) Нейрофизиологические корреляты послеоперационных когнитивных расстройств. *Журн неврол психиатр им СС Корсакова* 121(2): 18–23. [Tarasova IV, Razumnikova OA, Trubnikova OA, Mezentsev YuA, Kupriyanova DS, Barbarash OL (2021) Neurophysiological correlates of postoperative cognitive disorders. *Zhurn Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova* 121(2): 18–23. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro202112102118>
 22. Мезенцев ЮА, Разумникова ОМ, Тарасова ИВ, Трубникова ОА (2019) О некоторых задачах кластеризации больших данных по минимаксным и аддитивным критериям, применение в медицине и нейрофизиологии. *Информ технол* 25(10): 602–608. [Mezentsev YuA, Razumnikova OM, Tarasova IV, Trubnikova OA (2019) On some problems of big data clustering by minimax and additive criteria, application in medicine and neurophysiology. *Inform Technol* 25(10): 602–608. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17587/it.25.602-608>
 23. Разумникова ОМ, Мезенцев ЮА, Павлов ПС, Тарасова ИВ, Трубникова ОА (2021) Применение инструментов дискретной оптимизации для классификации когнитивного дефицита: особенности использования минимаксного и аддитивного критериев. Программн продукты и системы 34 (4): 579–588. [Razumnikova OM, Mezentsev YuA, Pavlov PS, Tarasova IV, Trubnikova OA (2021) Using discrete optimization tools to classify cognitive deficits: special aspects of using the minimax and additive criterion. *Software & Systems* 34 (4): 579–588. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15827/0236-235X.136.579-588>
 24. Relander K, Hietanen M, Rämö J, Vento A, Tikka I, Roine RO, Lindsberg PJ, Soine L (2022) Differential cognitive functioning and benefit from surgery in patients undergoing coronary artery bypass grafting and carotid endarterectomy. *Front Neurol* 13: 824486.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.824486>

Definition of the Profile of Cognitive Deficit in Cardiac Surgery Patients Using the Optimal Clustering Method

O. M. Razumnikova^a, I. V. Tarasova^{b,*}, Yu. A. Mezentsev^a, P. S. Pavlov^a,
 and O. A. Trubnikova^b

^a*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia*

^b*Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*

*e-mail: iriz78@mail.ru

An original clustering method based on discrete optimization of multidimensional objects according to many heterogeneous parameters: age, severity of carotid artery stenosis (CA), personal and cognitive characteristics was used to identify pre- and postoperative specificity of the profile of cognitive functions. The study involved 163 cardiac surgery patients. Determination of CA stenoses was carried out in the preoperative period using color duplex scanning and further classification of the lesion. Psychometric assessment of personal and situational anxiety, as well as psychomotor and executive functions, attention, short-term memory was performed 3–5 days before and 7–10 days after coronary artery bypass surgery (CABG). As a result of clustering arrays of 17 normalized indicators and subsequent analysis of three groups formed in this way, different dynamics of restoration of the profile of cognitive functions after coronary bypass surgery were discovered. One of the groups was designated as a group of cognitive reserves according to its best indicators of information selection and memory both in the preoperative and postoperative periods.

Another selected group was characterized by a postoperative increase in the speed of information selection, but low memory scores. The third selected group demonstrated close relationships between indicators of attention, memory and the efficiency of a complex visual-motor reaction with age and the degree of stenosis of the CA, regardless of the pre- or postoperative testing period, which may indicate persistent disorganization of cognitive functions in such patients, requiring special attention when choosing neuro- and cardiac rehabilitation programs for them. The developed clustering method makes it possible to group patients according to a variety of heterogeneous parameters to identify the dynamics of their changes during the course of treatment.

Keywords: clustering based on discrete parameter optimization, cognitive status, coronary bypass surgery, carotid artery stenosis, age

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КПБ – корректурная проба Бурдона

КШ – коронарное шунтирование

ПОКД – послеоперационная когнитивная дисфункция

СА – сонные артерии

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ECST – European Carotid Surgery Trial

NASCET – North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

СИНДЕКАН-1 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕССЕНДЖЕР ЭФФЕКТОВ
ДИСТАНТНОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ
С ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2024 г. М. Э. Колпакова^{1,2,*}, А. А. Яковлева², Л. С. Полякова², Н. El Amghari²,
S. Soliman², Д. Р. Файзуллина², В. В. Шаройко²

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: patho@yandex.ru

kolpakoavame@infran.ru

Поступила в редакцию 11.10.2023 г.

После доработки 21.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Изучение механизмов ограничения реперфузионного повреждения методом дистантного ишемического посткондиционирования (RC) представляет интерес в связи с эффектами на функциональное восстановление после перенесенной церебральной ишемии. Цель исследования – оценка роли изменения концентрации белков плазмы крови синдекана-1 (SDC-1) и аннексина-5 (ANXA5) в ограничении ишемически-реперфузионного повреждения в условиях применения RC на модели окклюзии средней мозговой артерии (MCAo) у крыс. Проводили рандомизированные контролируемые исследования. Ишемию моделировали на крысах-самцах Вистар массой 250 г по методу [6] под общей анестезией (Zoletil 100 и Xylazine 2%). Разница концентраций SDC-1 в образцах плазмы ложнооперированных животных и животных с ишемией составила 30% (30 min MCAo: 41.4 ± 1.3 нг/мл, $p < 0.05$). В образцах плазмы крови животных с ишемией на фоне применения протокола RC содержание SDC-1 по сравнению с ложнооперированными животными составила 112% ((30 min MCAo + RC): 67.8 ± 5.8 нг/мл, $p < 0.01$). Расчет объема инфаркта в группе с ишемией выявил $31.97 \pm 2.5\%$ повреждения мозга; в группе 30 min MCAo + RC объем инфаркта составил $13.6 \pm 1.3\%$. Объем отека нервной ткани головного мозга составлял $16 \pm 2.1\%$ в группе 30 min MCAo + RC; а в группе 30 min MCAo $47 \pm 3.3\%$ по сравнению со всем объемом нервной ткани головного мозга. В группе 30 min MCAo + RC корреляционный анализ показал высокую прямую корреляционную зависимость между площадью инфаркта и мышечной силой в правой передней конечности ($KK = 0.72$; $p < 0.05$). Корреляционный анализ показал в группе 30 min MCAo + RC очень высокую обратную корреляционную зависимость между площадью инфаркта и капиллярным кровотоком ($r = -0.98$, $p < 0.01$). Обсуждается связь повышения SDC-1 в плазме крови с механизмами ограничения ишемически-реперфузионного повреждения, а также роль SDC-1 как потенциального мессенджера в процессе функционального восстановления.

Ключевые слова: MCAo, церебральная ишемия, дистантное ишемическое посткондиционирование, синдекан-1, аннексин-5

DOI: 10.31857/S0869813924030068, EDN: CPTAJX

ВВЕДЕНИЕ

Дистантное ишемическое посткондиционирование (RC) в постинсультном периоде может рассматриваться как эффективный способ функционального восстановления после ишемии головного мозга. Изучение сосудистых эффектов RC важно для научного обоснования его применения в комплексе с реабилитационными мероприятиями у постинсультных пациентов для раннего функционального восстановления. Функциональное восстановление после перенесенного инсульта зависит от вариабельности повреждения и от чувствительности различных популяций нейронов к гипоксии. Экспериментальные данные о схемах сигнальных путей при использовании фармакологических и нефармакологических методов нейропротекции в эксперименте многочисленны и разнообразны. Несмотря на экспертные данные, которые продвинули наше понимание в патофизиологии инсульта, механизмы нейропротекции после инсульта остаются недостаточно изученными, в связи с чем ни одно клиническое испытание веществ с нейропротекторным эффектом не продемонстрировало улучшение результатов при использовании у пациентов с инсультом в клинике [2]. Известно, что нарушение молекулярной структуры эндотелиального гликокаликса в связи с ишемией нарушает физиологические гемодинамические процессы и приводит к гиперпроницаемости микрососудов гематоэнцефалического барьера [3]. Следовательно, необходимо продолжать поиск молекулярных механизмов в этом направлении для самоограничения повреждения и ускорения функционального восстановления в постинсультный период.

Цель настоящего экспериментального исследования – оценка роли изменения концентрации белков синдекана-1 и аннексина-5 в ограничении ишемически-реперфузионного повреждения в условиях применения RC на модели окклюзии средней мозговой артерии (МСаО) у крыс.

Необходимо уточнить возможности для усиления эндогенных механизмов нейропластичности в случае возникновения ишемии в бассейне средней мозговой артерии. Мы предполагаем, что дистантное посткондиционирование, проведенное в ранние сроки после краткосрочной ишемии, может повлиять на выраженность ишемически-реперфузионного повреждения. В результате дистантное посткондиционирование сопровождается повышением толерантности нервной ткани к ишемическому повреждению.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на крысах-самцах Вистар ($n = 87$) массой 250 ± 50 г из Биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Модель ишемического инсульта выполняли по стандартной методике [4]. МСаО проводили с помощью внутрисосудистой монофиламентной нити под общей анестезией (золетил 100 VIRBAC, Франция) и ксилазин (Xyla, Xylazine 2%, Interchemiewerken «De Adelaar V. V.», Нидерланды). Смесь вводили внутримышечно в дозе 0.88 мл/кг. Ишемия в течение 30 мин вызывала нарушение кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии. Величина инфаркта мозга являлась достаточной для оценки повреждения [5]. Всем животным выполняли ультразвуковую доплеровскую флоуметрию для оценки линейной скорости кровотока (V_{as} (mm/sec) в капиллярах кожи левой задней конечности (Минимакс, Россия)). В нашем эксперименте использовали протокол дистантного кондиционирования (RC). Схема эксперимента приведена на рис. 1.

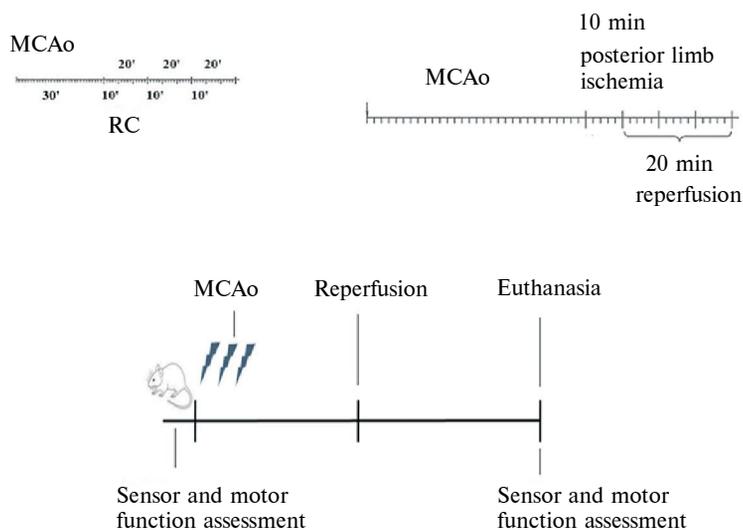


Рис. 1. Схема эксперимента.

Животные были разделены на 3 группы: ложнооперированные животные (FO); животные с 30-минутной ишемией (30 min MCAo); животные с 30-минутной ишемией и дистантным посткондиционированием (30 min MCAo + RC). Распределение выборки животных по группам осуществлялось случайным образом.

В схему эксперимента (рис. 1) входила оценка неврологического дефицита, которую осуществляли с помощью шкалы Гарсия. Оценку проводили с определением спонтанной активности в течение 5 мин, симметричности движений конечностей, реакции на прикосновения к каждой стороне туловища и вибриссам, способности забираться по проволочной стенке клетки. Тест по шкале Гарсия использовали для оценки неврологического дефицита у животных через 12, 24 и 48 ч после перенесенной ишемии. Тест на определение мышечной силы с помощью прибора (Grip Strength Meter, Индия) использовали для оценки степени неврологического дефицита (пареза конечности). Изучение координации движений животного производили на аппарате Ротарод (Rotarod Apparatus, Индия) с измерением времени нахождения животного на крутящемся цилиндре прибора.

Для оценки объема ишемически-реперфузионного повреждения использовали хлорид 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС). Крыс эвтаназировали через 48 ч путем экспозиции CO_2 под общей анестезией. Мозг осторожно удаляли и погружали в холодный фосфатно-солевой раствор в чашку Петри, затем замораживали (при -20°C) в течение 30 мин, далее разрезали с помощью бритвенных лезвий и готовили срезы толщиной 2 мм. Затем срезы мозга инкубировали в 2%-ном растворе ТТС (Sigma Aldrich, США) при температуре 37°C . Изменение цвета являлось показателем окрашивания ТТС жизнеспособных митохондрий в нервной ткани. Инфарктные области, в которых отсутствуют жизнеспособные митохондрии, не меняли цвет и оставались белыми. Участки ишемии мозга оценивали с помощью компьютеризированной аналитической системы (Karl Storz, Австрия) Image-Pro program (MediaCybernetics, США). Общий объем инфаркта оценивали по всем срезам согласно формуле:

$$\text{Объем инфаркта (\%)} = [V \text{ левое полушарие} / (2 \times V \text{ правого полушария})] \times 100.$$

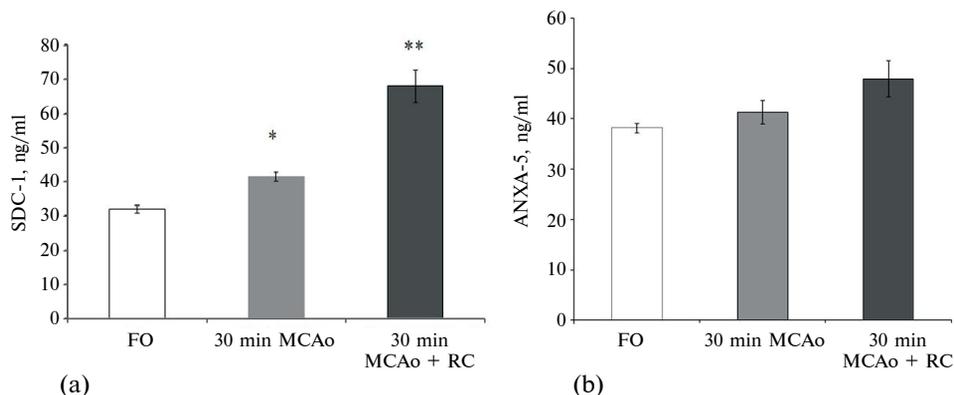


Рис. 2. (a) – Результаты измерения концентрации SDC-1 в плазме крови животных на 5-е сутки эксперимента ($n = 10$). (b) – Результаты измерения концентрации ANXA5 в плазме крови животных на 5-е сутки эксперимента ($n = 10$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка, (p – значимость различий между группами; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$).

Отек ткани головного мозга рассчитывали по формуле на 2-й день после ишемии-реперфузии:

$$\text{Отек ткани (\%)} = \frac{[V \text{ левого полушария} - V \text{ правого полушария}]}{V \text{ правого полушария}} \times 100.$$

V – это объем ткани, выраженный в мм^3 .

Иммуноферментный анализ (ELISA, RayBiotech, США) использовали для количественного определения белков плазмы синдекан-1 (SDC-1) и аннексин-5 (ANXA5). Для регистрации результатов ELISA (поглощение при 450 нм) использовали планшетный мультимодальный спектрофотометр (Clariostar Plus, Германия). Статистический анализ результатов ELISA был основан на биномиальной модели регрессии.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica v.12. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка, p – значимость различий между группами. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ. Сравнение двух независимых групп проводили при помощи U -критерия Манна–Уитни. Различия оценивались как статистически значимые при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментный анализ

При определении концентрации SDC-1 в образцах плазмы крови животных группы 30 min MCAo разница с FO составила 30% (FO: 31.9 ± 1.1 ng/ml; 30 min MCAo: 41.4 ± 1.3 ng/ml, $p < 0.05$, рис. 2a). В образцах плазмы животных 30 min MCAo + RC концентрация SDC-1 превысила более чем в два раза (FO: 31.9 ± 1.1 ng/ml; 30 min MCAo: 67.8 ± 5.8 ng/ml, $p < 0.01$). В исследуемых группах не было выявлено разницы по содержанию в крови ANXA5 (рис. 2b).

Ультразвуковая доплеровская флоуметрия

На вторые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo капиллярный кровоток в задней конечности повысился на 121% (FO: 0.14 ± 0.01 mm/sec; 30 min MCAo: 0.31 ± 0.05 mm/sec, $p < 0.01$). На вторые сутки после ишемии в группе животных 30

min MCAo + RC капиллярный кровоток в задней конечности повысился на 142% (FO: 0.14 ± 0.01 mm/sec; 30 min MCAo + RC: 0.34 ± 0.01 mm/sec, $p < 0.01$).

На пятые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo капиллярный кровоток в задней конечности снизился на 17% по сравнению с группой FO (FO: 0.30 ± 0.01 mm/sec; 30 min MCAo: 0.25 ± 0.02 mm/sec, $p < 0.05$). На пятые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC капиллярный кровоток в задней конечности, напротив, повысился на 7% по сравнению с группой FO (FO: 0.30 ± 0.01 mm/sec; 30 min MCAo + RC: 0.33 ± 0.01 mm/sec, $p < 0.05$).

Перед выведением животных из эксперимента через 48 ч после оперативного вмешательства линейная скорость кровотока в группе 30 min MCAo не восстанавливалась (0.239 ± 0.019 mm/sec, $p < 0.05$) и была ниже таковой по сравнению с FO на 28% (0.336 ± 0.018 mm/sec). В то же время линейная скорость кровотока перед выведением из эксперимента в группах FO и 30 min MCAo + RC составила 0.302 ± 0.017 mm/sec, $p < 0.05$.

Тест Гарсия

Исходно у крыс всех экспериментальных групп не наблюдали неврологических нарушений, и они имели максимальное количество баллов (18) по шкале Гарсия. Через 12 ч после ишемии у крыс в группах с ишемией возник неврологический дефицит, причем разница с FO составила 37% (FO: 8 баллов; 30 min MCAo: 10.7 баллов). Через 24 ч после MCAo во всех группах с ишемией неврологический дефицит сохранялся. Однако разница с ложнооперированным контролем составляла 36% (FO: 18 баллов; 30 min MCAo: 11.5 баллов). Через 48 ч разница с ложнооперированным контролем уже составляла 14% (FO: 18 баллов; 30 min MCAo: 15.5 баллов).

Тест мышечной силы (grip-test)

По результатам проведенного анализа на вторые сутки после ишемии в группе 30 min MCAo мышечная сила в левой (ипсилатеральной) передней конечности снизилась на 37% (FO: 4.1 ± 1.4 Н; 30 min MCAo: 2.6 ± 0.5 Н, $p < 0.05$). На вторые сутки после ишемии в группе 30 min MCAo мышечная сила в левой передней конечности снизилась на 32% (FO: 4.1 ± 1.4 Н; 30 min MCAo + RC: 2.8 ± 0.5 Н, $p < 0.05$).

На пятые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo мышечная сила в левой (ипсилатеральной) передней конечности восстановилась, однако разница с контролем составила 15% (FO: 4.6 ± 1.5 Н; 30 min MCAo: 3.9 ± 1.1 Н ($p > 0.5$)). На пятые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC мышечная сила в левой передней конечности восстановилась, разница с контролем составила всего 2% (FO: 4.6 ± 1.5 Н; 30 min MCAo + RC: 4.5 ± 0.7 Н ($p > 0.5$, рис. 3а).

На вторые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo мышечная сила в правой (контралатеральной) передней конечности снизилась на 26% (FO: 3.9 ± 0.5 Н; 30 min MCAo: 2.9 ± 0.3 Н, $p < 0.05$). На вторые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC мышечная сила в правой передней конечности снизилась на 25.7% (FO составила 3.9 ± 0.5 Н; 30 min MCAo + RC: 2.9 ± 0.7 Н, $p < 0.05$).

На пятые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo мышечная сила в правой (контралатеральной) передней конечности уменьшилась на 17% (FO: 5.2 ± 0.9 Н; 30 min MCAo: 4.3 ± 0.2 Н, $p > 0.5$). На пятые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC мышечная сила в правой передней конечности составила 75% по сравнению с ложнооперированными животными (FO: 5.2 ± 0.9 Н; 30 min MCAo + RC: 3.9 ± 0.8 Н, $p > 0.5$, рис. 3б).

Оценка объема инфаркта

Расчет объема инфаркта в группе с ишемией выявил $32.0 \pm 2.5\%$ повреждения мозга; в группе 30 min MCAo + RC объем инфаркта составил $13.6 \pm 1.3\%$, $p < 0.05$). Расчет

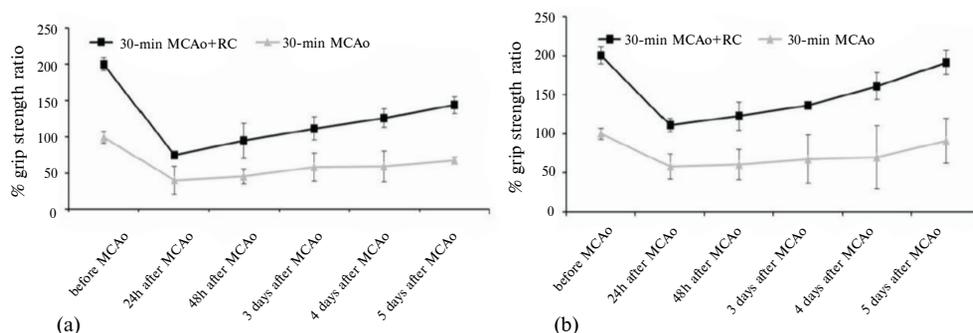


Рис. 3. (а) – Амплитуда мышечной силы (Н, %) в процентном соотношении в левой (ипсилатеральной) передней конечности животных в разные сроки после ишемии (1–5 суток), ($n = 10$). (б) – Влияние 30 min MCAo на величину мышечной силы (Н, %) в правой (контралатеральной) передней конечности животных в разные сроки после 30 min MCAo (1–5 суток), ($n = 10$).

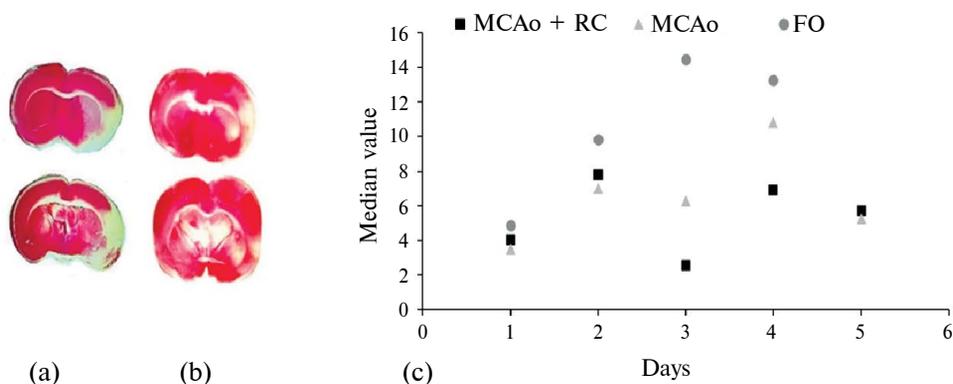


Рис. 4. (а, б) – Инфаркт мозга в группе 30 min MCAo (а) и в группе 30 min MCAo + RC (б) (2-е сутки), ($n = 5$). (с) – Средние значения времени Ротарод-теста в группах FO, 30 min MCAo, 30 min MCAo + RC в каждый день недели эксперимента.

объема отека ткани головного мозга в группе 30 min MCAo + RC составлял $16 \pm 2.1\%$; в группе 30 min MCAo отек достигал $47 \pm 3.3\%$, $* p < 0.05$ (рис. 4а, б).

В группе 30 min MCAo + RC корреляционный анализ показал высокую прямую корреляционную зависимость между площадью инфаркта и мышечной силой в правой передней конечности ($KK = 0.72$; $p < 0.05$). Корреляционный анализ показал в группе 30 min MCAo + RC очень высокую обратную корреляционную зависимость между площадью инфаркта и капиллярным кровотоком ($r = -0.98$, $p < 0.01$, рис. 4с).

Ротарод-тест

На вторые сутки после ишемии время удержания равновесия на крутящемся цилиндре в аппарате Rota Rod в группе животных 30 min MCAo сократилось на 29% (FO: 9.82 ± 0.1 sec; 30 min MCAo: 7.02 ± 0.2 sec, $p < 0.05$). На вторые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC время удержания равновесия на крутящемся цилиндре в аппарате Rota Rod снизилось на 21% (FO: 9.8 ± 0.1 sec; 30 min MCAo + RC: 7.8 ± 0.1 sec, $p < 0.05$).

На 5-е сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo время удержания равновесия на крутящемся цилиндре в аппарате Rota Rod сократилось на 60% (FO: $13.24 \pm$

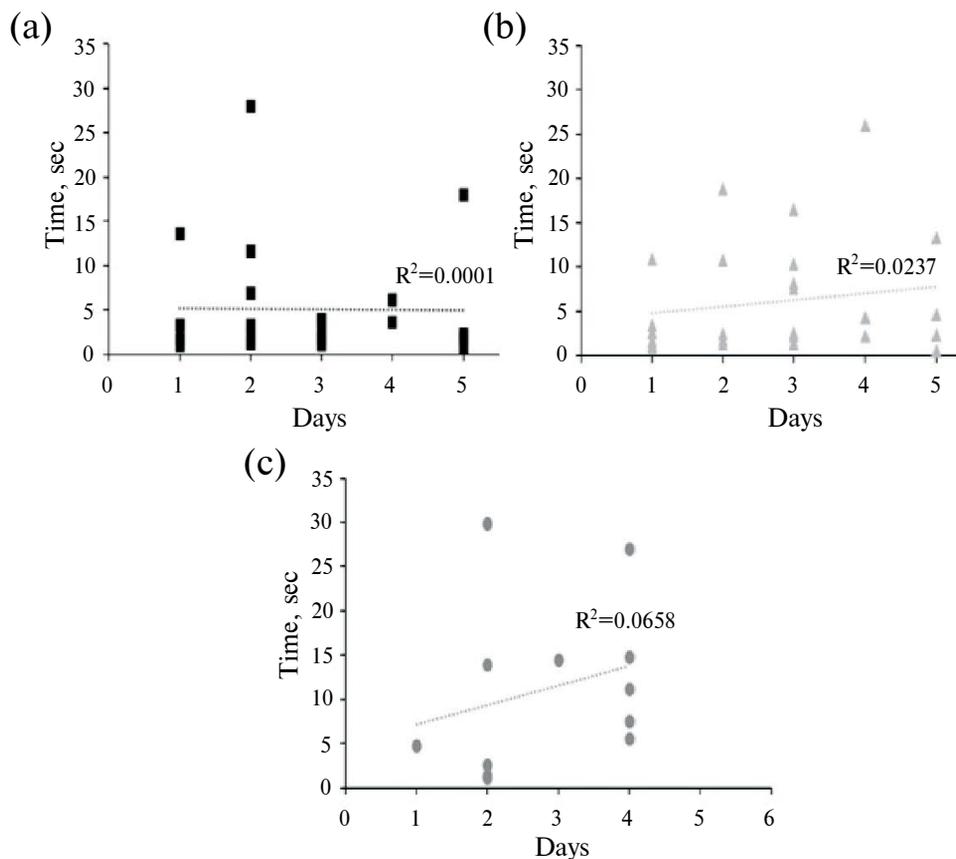


Рис. 5. Ротарод-тест: (а) – в группе 30 min MCAo + RC, (б) – в группе 30 min MCAo, (с) – в группе FO в каждый день недели.

± 0.9 sec; 30 min MCAo: 5.25 ± 0.1 sec. На 2-е сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC время удержания равновесия на крутящемся цилиндре в аппарате Rota Rod снизилось на 43% (FO: 13.24 ± 0.9 Н; 30 min MCAo + RC: 5.7 ± 0.3 sec (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования на животных с применением протокола RC показали увеличение содержания SDC-1 в плазме крови. В образцах плазмы животных из группы 30 min MCAo разница с FO составила 30%. В образцах плазмы животных 30 min MCAo + RC разница с FO составила 112%. Известно, что ишемия конечности при проведении протокола RC оказывает системное влияние на гемодинамику, а само RC, возможно, ограничивает выраженность ишемически-реперфузионного повреждения в мозге, в том числе за счет молекулы SDC-1.

На вторые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo капиллярный кровоток в задней конечности повысился до 121%. На вторые сутки после ишемии в группе животных 30 min MCAo + RC капиллярный кровоток в задней конечности повысился до 142%. Изменение вазодилататорной активности эндотелия на фоне церебральной ишемии может быть связано с механизмами эндотелий-опосредованной

продукции оксида азота ферментными системами. Вероятным механизмом увеличения микроциркуляции в коже в контрлатеральной конечности является стимуляция эндотелий-зависимых вазомоторных реакций [6, 7].

При сопоставлении площади ишемического повреждения головного мозга и капиллярного кровотока в конечности с помощью корреляционного анализа была выявлена очень сильная обратная корреляционная связь между двумя показателями в самый начальный период реперфузии и в течение последующих 7 дней. В результате, чем больше капиллярный кровоток в конечности, тем меньше площадь повреждения головного мозга. Морфологические изменения в нервной ткани определяются продолжительностью гипоперфузии. По данным настоящего исследования в группе 30 min MCAo + RC площадь инфаркта была на 18% меньше, чем в группе 30 min MCAo. Выживаемость нейронов после фокальной ишемии и толерантность к ишемии определяется не только объемом повреждения, но и функциональной активностью нейронов зоны «ишемической полутени». Изменения в мозге обусловлены ограничением реперфузионного повреждения. Повышение толерантности нервной ткани к ишемии обусловлена включением механизмов ограничения реперфузионного повреждения за счет ограничения поступления кальция в клетки нейроваскулярной единицы, как например, в случае синтеза цитоплазматического белка Iba-1 (кальций-связывающий белок) [8].

К сожалению, длительность нашего наблюдения за функциональным восстановлением была ограничена 5 днями, что не позволяет в полной мере избежать искажения результатов тестирования стрессовым влиянием в раннем постинсультном периоде. Однако на вторые сутки после ишемии разница с контролем в мышечной силе в правой (контрлатеральной) передней конечности между группами животных 30 min MCAo и 30 min MCAo + RC составила 0.3%; на 5-е сутки различия по тем же показателям составили 3%. На 2-е сутки после ишемии различия с контролем в мышечной силе в левой (ипсилатеральной) передней конечности между группами животных 30 min MCAo и 30 min MCAo + RC составили около 5%; на 5-е сутки различия по этим показателям составила 13%. Таким образом, прослеживается тенденция восстановления мышечной силы в передней конечности животного под влиянием дистантного посткондиционирования. Ограничение ишемически-реперфузионного повреждения способствует более раннему функциональному восстановлению [9, 10]. Обсуждается, что RC оказывает нейропротективный эффект за счет увеличения содержания белка плазмы крови SDC-1, который может участвовать в роли мессенджера в механизмах ограничения реперфузионного повреждения и нейропластичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование на животных с применением протокола RC показало, что нейропротективные эффекты RC могут быть связаны с повышением в плазме крови белка SDC-1, а сам белок может быть в качестве потенциального мессенджера, который участвует в ограничении ишемически-реперфузионного повреждения. Это способствует более эффективному функциональному восстановлению в первую неделю после перенесенной ишемии в бассейне средней мозговой артерии у крыс.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов – К. М. Э., Ш. В. В., Ф. Д. Р.; проведение экспериментов, получение данных – Я. А. А., П. Л. С., Ф. Д. Р., S. S., Н. Е. А.; обработка результатов экспериментов – К. М. Э., Я. А. А., П. Л. С., Ш. В. В., Ф. Д. Р.; написание и редактирование статьи – К. М. Э., Ш. В. В.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Программы «Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства» (47_110_ДриОК, раздел 64.1).

Тема государственного задания Рег. № НИОКТР 121032200171-6. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Биоэтической комиссией Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, протокол № 02/10 от 14.02.2022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Qi W, Zhou F, Li S, Zong Y, Zhang M, Lin Y, Zhang X, Yang H, Zou Y, Qi C, Wang T, Hu X* (2016) Remote ischemic postconditioning protects ischemic brain from injury in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion associated with suppression of TLR4 and NF- κ B expression. *Neuroreport* 27(7): 469–475.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000553>
2. *Jain KK* (2019) Introduction. *The Handbook of Neuroprotection*. 1–44.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9465-6_1
3. *Torres Filho I, Torres LN, Sondeen JL, Polykratis IA, Dubick MA* (2013). In vivo evaluation of venular glycocalyx during hemorrhagic shock in rats using intravital microscopy. *Microvascul Res* 85: 128–133.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.11.005>
4. *Belayev L, Alonso R, Zhao OF, Busto W, Ginsberg MD* (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 27: 1616–1622, discussion: 1623.
5. *Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C* (2015) Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* 9: 3445–3454.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S56071>
6. *Горшкова ОП, Шуваева ВН, Ленцман МВ, Артемьева АИ* (2016) Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. *Совр пробл науки и образов* 5: 90. [*Gorshkova OP, Shuvaeva VN, Lentsman MV, Artemyeva AI* (2016) Post-ischemic endothelial vasomotor function changes. *Modern Probl Sci and Educat* 5: 90. (In Russ)].
7. *Chen G, Yang J, Lu G, Guo J, Dou Y* (2014) Limb remote ischemic post-conditioning reduces brain reperfusion injury by reversing eNOS uncoupling. *Indian J Exp Biol* 52(6): 597–605.
<https://doi.org/10.3390/ijms17121971>
8. *Kirik OV, Tsyba DL, Alekseeva OS, Kolpakova ME, Jakovleva AA, Korzhhevskii DE* (2021) Changes in Kolmer Cells in SHR Rats after Cerebral Ischemia. *Neurosci Behav Physiol* 51: 1148–1152.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01174-3>
9. *Zhang Y, Ma L, Ren C, Liu K, Tian X, Wu D, Ding Y, Li J, Borlongan CV, Ji X* (2019) Immediate Remote Ischemic Postconditioning Reduces Cerebral Damage in Ischemic Stroke Mice by Enhancing Leptomeningeal Collateral Circulation. *J Cell Physiol* 234: 12637–12645.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27858>
10. *Chen G, Thakkar M, Robinson C, Doré S* (2018) Limb Remote Ischemic Conditioning: Mechanisms, Anesthetics, and the Potential for Expanding Therapeutic Options. *Front Neurol* 9: 40.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00040>

**Syndecan-1 as Potential Messenger of Effects of Remote Postconditioning
in Experiments with Brain Ischemia****M. E. Kolpakova^{a, b, *}, A. A. Jakovleva^b, L. S. Poliakova^b, H. El Amghari^b, S. Soliman^b,
D. R. Faizullina^b, and V. V. Sharoyko^b**^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia*^b*First Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia***e-mail: E-mail: patho@yandex.ru**kolpakoavame@infran.ru*

The mechanisms of cerebral reperfusion injury restriction by remote conditioning (RC) is interesting due to its possible effects on functional recovery after brain ischemia. The assessment of the role of syndecan-1 (SDC-1) and annexin-5 (ANXA5) content in blood plasma was performed by ischemic-reperfusion injury on middle cerebral artery model in rats. We used RC protocol. Randomized controlled trials were conducted. Ischemia had been done by MCAo (middle cerebral artery occlusion) by Belayev [6]. Animals used were the Wistar rat-males weighting 250 g. under general anesthesia (Zoletil 100 и Xylazine 2%). MCAo animals had been detected 41.4 ± 1.3 ng/ml SDC-1 plasma's level (30%). MCAo animals with RC protocol had been detected 67.8 ± 5.8 ng/ml SDC-1 plasma's level (112%). Infarction volume in MCAo animals' brain reviled $31.97 \pm 2.5\%$ injury; the volume of infarction was $13.6 \pm 1.3\%$. Swelling of tissue in MCAo animals with RC was $16 \pm 2.1\%$; in contrary, in MCAo animals' swelling of tissue was bigger up to $47 \pm 3.3\%$. Correlation analysis in MCAo animals with RC reviled high direct correlation relationship between infarction area and muscle strength in the right forelimb ($KK=0.72$). Correlation analysis reviled very high inverse correlation between infarct area and capillary blood flow in MCAo animals with RC ($p < 0.01$; $r = -0.98$). It is being discussed the SDC-1 protein in blood plasma may play role of potential regulator of infarct-limiting effects of remote ischemic postconditioning which cause functional recovery.

Keywords: MCAo, brain ischemia, remote ischemic postconditioning, Syndecan-1, Annexin-5

АНАКИНРА СПОСОБСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ МИКРОГЛИИ В ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД ЛИТИЙ- ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2024 г. М. В. Захарова^{1, &}, А. В. Дёмина^{1, &}, А. А. Коваленко¹, О. Е. Зубарева¹,
А. М. Ищенко², А. В. Зайцев^{1, *}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

[&] – равный вклад авторов

*E-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Предполагается, что астроциты и микроглия и их поляризация могут влиять на развитие эпилепсии. Одним из процессов, влияющих на поляризацию, является нейровоспаление, играющее важную роль в эпилептогенезе. Однако конкретные механизмы его участия в сдвиге про- и противовоспалительных состояний астро- и микроглии не выяснены. В данном исследовании изучили влияние 7-дневного введения антагониста рецептора интерлейкина-1 (анакинры) на поляризацию глиальных клеток в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели у 7-недельных самцов крыс Вистар. Проанализировали уровень экспрессии мРНК генов: (i) маркеров активации астроглии (*S100b*) и микроглии (*Aif1*), (ii) белков, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата (*Slc1a3*, *Glu1*, *Gja1*), (iii) провоспалительного пути интерлейкина-1 β (*Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn*) и трансформирующего фактора роста β 1 (*Tgfb1*), (iv) маркеров поляризации астроглии (*Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*) и (v) поляризации микроглии (*Nos2* и *Arg1*) в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии мРНК *S100b* и *Aif1* значимо возрос, и введение анакинры не снизило их гиперэкспрессию. Это свидетельствует об активации астроглии и микроглии независимо от проводимого лечения. В гиппокампе возросла экспрессия генов *Slc1a3*, *Glu1*, *Gja1*, применение анакинры не повлияло на их гиперэкспрессию, но способствовало повышению экспрессии *Gja1* в височной коре. Во всех структурах увеличилась продукция мРНК *Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*, *Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn* и *Tgfb1*. Применение анакинры понизило экспрессию гена *Il1b*. Среди маркеров поляризации микроглии выявлено понижение экспрессии *Arg1* в дорзальном гиппокампе и *Nos2* в височной коре. Введение анакинры усилило снижение экспрессии *Nos2* и восстановило уровень экспрессии *Arg1* до контрольных значений. Таким образом, введение анакинры не повлияло на интенсивность активации астроглии и микроглии, но способствовало восстановлению противовоспалительного состояния активированной микроглии.

Ключевые слова: IL-1Ra, поляризация астроцитов, поляризация микроглии, нейровоспаление, эпилептогенез

ВВЕДЕНИЕ

Эпилептогенез – это процесс, приводящий к повышению возбудимости нейронной сети и возникновению спонтанных эпилептических припадков в результате каскада молекулярных и структурных изменений в головном мозге [1]. Точные механизмы эпилептогенеза до конца не определены, однако в последние годы активно изучается участие глиальных клеток в этом процессе [1, 2]. Реактивация астроцитов и микроглии, заключающаяся в морфологическом, молекулярном или функциональном ремоделировании клеток, часто описывается при эпилептогенезе [3, 4]. Глиальные клетки вовлечены как в процессы воспаления, так и в контроль возбудимости нейронов. Однако, несмотря на появление все большего количества данных об их роли в патофизиологии эпилептических припадков, конкретные механизмы участия астро- и микроглии неясны [5].

По аналогии с периферическими макрофагами, для астро- и микроглии условно выделяют два полярных состояния активации при реализации воспалительной реакции, а процесс перехода между этими состояниями называют поляризацией. A1/M1 – нейротоксический, или провоспалительный, сопровождается повышением экспрессии провоспалительных генов (*Il1b*, *Tnfa*, *Il6*) и понижением экспрессии генов белков, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата (*Slc1a2*, *Slc1a3*, *Glut*), что может усугублять течение эпилепсии и возможных постсудорожных нервно-психических расстройств. A2/M2 – нейрозащитный, или противовоспалительный – активирует нейротрофические (*Tgfb1*) или противовоспалительные (*Il1rn*) гены, которые способствуют выживанию и росту нейронов и поддерживают репаративные процессы в мозге [6, 7]. Для каждого из полярных состояний существуют специфические маркерные гены, по высокой продукции которых можно говорить о функциональном состоянии клеток. Так, повышенная продукция мРНК *Lcn2* и *Gbp2* считается маркером провоспалительной активации астроцитов, а увеличенная экспрессия генов *S100a10*, *Ptx3* – маркер состояний A2 [7]. Для микроглии гиперэкспрессия гена *Nos2* является маркером провоспалительной активации, а маркером противовоспалительного состояния M2 считается повышенная экспрессия гена *Arg1* [8–10].

Дисфункциональное и патологическое ремоделирование астроцитов может способствовать повышению возбудимости нейронов и развитию эпилепсии после эпилептического статуса [11, 12]. В частности, астроциты участвуют в регуляции активности глутаматергической медиаторной системы, гиперактивность которой лежит в основе многих неврологических заболеваний, в том числе эпилепсии [13, 14]. Астроциты экспрессируют переносчики возбуждающих аминокислот с высокой аффинностью к глутамату EAAT1 и EAAT2, которые осуществляют обратный захват глутамата, высвобождаемого пресинапсом [15, 16]. Поглощаемый астроцитами глутамат может быть перераспределен между соседними астроцитами с помощью щелевых контактов, образованных коннексинами Cx43 и Cx30, соединяясь через которые, астроциты образуют в мозге подобие синцития, что обеспечивает быстрое перераспределение ионов, малых молекул и распространение кальциевых волн [17]. В астроците с помощью глутаминсинтетазы (GS) происходит синтез глутамина из глутамата. Глутамат-глутаминовый цикл необходим для нормального функционирования глутаматергического синапса [18]. Нарушение работы каждого из перечисленных звеньев может приводить к патологическим изменениям и развитию эпилепсии. Так, инактивация GS приводит к развитию судорог или нейродегенерации вследствие эксайтотоксичности [18]. Во время судорог разобщение каналов, образованных Cx43, приводит к появлению полуканалов, в связи с чем повышается выделение астроцитами глутамата, АТФ и других соединений, способствующих повышению возбудимости нейронов. В экспериментальных моделях эпилепсии и у пациентов с эпилепсией было обнаружено повышение экспрессии астроцитарных коннексинов, а введение их блокаторов облегчало судорож-

ную активность [19]. В моделях эпилепсии также обнаружено снижение экспрессии EAAT1 и EAAT2 [20]. Ранее в наших исследованиях было показано, что продукция белка EAAT2 снижается через 7 дней после эпилептического статуса, вызванного введением пилокарпина [21]. Все указанные изменения рассматриваются как возможные механизмы эпилептогенеза [22].

Одним из неотъемлемых механизмов эпилептогенеза считается развитие нейровоспаления, способствующего повышению возбудимости нейронов [23]. Центральным механизмом регуляции нейровоспаления является путь IL-1 β , опосредующий мощный воспалительный ответ. В моделях постстатусной эпилепсии этот путь активируется в числе первых в областях мозга, участвующих в генерации и распространении судорог [24]. Показано, что эпилептический статус способствует транскрипционной активации элементов пути NLRP3 – одного из основных регуляторов высвобождения активной формы IL-1 β [25]. В свою очередь, высокий уровень экспрессии IL-1 β характерен для людей с резистентными формами эпилепсии и коррелирует с генерацией судорожных приступов у больных эпилепсией [26]. В работах Vezzani и соавт. показано на экспериментальных моделях, что введение IL-1 β имеет проконвульсантный эффект [27, 28]. IL-1 β запускает каскад провоспалительных реакций, связываясь с рецептором IL-1R1 – следующим после системы NLRP3 регулятором провоспалительного действия IL-1 β . Естественным противовоспалительным фактором на данном этапе является антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), связывающийся с рецептором IL-1R1 и блокирующий дальнейшую передачу сигнала [29]. При развитии воспалительной реакции продукция IL-1 β сопровождается экспрессией многократно большего количества IL-1Ra, однако во время судорог продукция антагониста в мозге значительно запаздывает относительно выброса IL-1 β , что может являться причиной более серьезных последствий [28, 30]. Применяемый для терапии в виде рекомбинантного белка IL-1Ra (препарат анакинра) демонстрирует высокую селективность и противовоспалительную эффективность [31, 32]. В экспериментальных моделях также показано, что введение IL-1Ra ослабляет острые судороги и меняет течение эпилептогенеза, в частности, оказывая нейропротекторный эффект и ослабляя поведенческие нарушения [33, 34].

В данном исследовании для анализа изменений поляризации глиальных клеток в ходе эпилептогенеза была использована литий-пилокарпиновая модель, считающаяся одной из лучших моделей височной эпилепсии, в которой эпилептогенез индуцируется эпилептическим статусом [35]. В этой модели эпилептический статус развивается после введения хемоконвульсанта пилокарпина, затем следует латентный период, длящийся от 1 до 5 недель, когда спонтанные судороги не наблюдаются. Латентный период заканчивается с появлением первого спонтанного эпилептического припадка. Основной структурой мозга, участвующей в эпилептогенезе и претерпевающей существенные изменения в латентный период, является гиппокамп, однако молекулярные изменения затрагивают также и височную кору [36, 37]. Для модификации эпилептогенеза в латентный период был использован IL-1Ra (препарат анакинра) с целью уточнить роль провоспалительного пути IL-1 β в поляризации глиальных клеток при эпилептогенезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В эксперименте были использованы самцы крыс Вистар в возрасте 7 недель. Разведение животных осуществлялось виварием Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Крыс размещали по 4–6 особей в стандартные клетки для содержания лабораторных грызунов. На всех этапах эксперимента жи-

вотным предоставлялся неограниченный доступ к воде и гранулированному сухому корму, осуществлялся автоматический контроль освещения с циклом 12-часового светового дня.

Литий-пилокарпиновая модель

За сутки до введения пилокарпина крысам вводили раствор хлорида лития (внутрибрюшинно – в/б, 127 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) [38]. За 30–40 мин до введения пилокарпина крысам вводили скополамин метил бромид (в/б, 1 мг/кг, Sigma-Aldrich) для снижения активации периферических мускариновых рецепторов [35]. Введение пилокарпина (Sigma-Aldrich) производили дозами по 10 мг/кг (в/б) каждые полчаса, максимальная суммарная доза достигала 40 мг/кг. Введение пилокарпина прекращали на той дозе, после которой у крыс развивались судороги 4-й стадии тяжести (rearing) по модифицированной шкале Racine [39]. Если после введения пилокарпина в суммарной дозе 40 мг/кг у крыс не развивался эпилептический статус, их исключали из эксперимента. Эпилептический статус останавливали через 75 мин введением диазепама (в/б, 10 мг/кг, Sigma-Aldrich). Контрольным животным вводили только раствор хлорида лития. В течение первой недели после эпилептического статуса крыс кормили преимущественно влажным и сладким кормом (огурцы, хурма, распаренный геркулес с сахаром и растительным маслом) для облегчения восстановления и улучшения выживаемости.

Схема введения анакинры

После прекращения эпилептического статуса крысы случайным образом были поделены на две группы. Одной группе животных вводили антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra, препарат анакинра, Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Россия), вторая группа получала физиологический раствор. Препарат анакинра представляет собой модифицированный белок IL-1Ra (чистота 99%), к N-концу которого добавлена аминокислота метионин, разведенный в концентрации 100 мг/мл. Первая инъекция (100 мг/кг) осуществлялась через час после введения диазепама. Затем препарат вводили один раз в день по 100 мг/кг первые 5 дней, 50 мг/кг на шестой день и не вводили на седьмой день перед забором образцов мозга для биохимического анализа. Таким образом, было сформировано 3 группы животных: (1) контрольные (Ctrl, $n = 14$); (2) постстатусные без терапии (SE, $n = 9$), (3) постстатусные с терапией анакинрой (SE+A, $n = 10$).

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией

Через 7 дней после эпилептического статуса крыс декапитировали, мозг быстро извлекали и замораживали при температуре -80°C . Дорзальную и вентральную области гиппокампа, а также височную кору выделяли с помощью замораживающего микротомы OTF5000 (Bright Instruments, Великобритания) в соответствии с атласом мозга крыс [40]. Тотальную РНК экстрагировали при помощи реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Затем образцы обрабатывали 1 ед. RQ1 ДНКазы (Promega, США) для удаления возможных остатков геномной ДНК. Концентрацию и чистоту РНК оценивали спектрофотометрически на основе поглощения при 260 нм и коэффициента поглощения 260/280 с использованием спектрофотометра NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, США).

Для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК, 0,5 мкг олиго-dT праймеров, 0,25 мкг 9-мерных случайных праймеров (ООО «ДНК-Синтез», Москва, Россия) и 100 ед. обратной транскриптазы М-MLV (Евроген, Россия) в общем объеме 20 мкл согласно инструкции производителя. Все образцы были разбавлены в 10 раз перед стадией ПЦР.

ПЦР проводили в общем объеме 6 мкл с использованием 0,8 мкл кДНК, 0,5 ед. TaqM-полимеразы (Алкор Био, Санкт-Петербург, Россия), 3,5 мМ MgCl_2 , специфичес-

ких прямого и обратного праймеров и зондов (TaqMan) (см. табл. 1, все нуклеотиды синтезированы ООО «ДНК-Синтез», Россия). В ходе работы праймеры подбирались с помощью программы Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) к последовательностям кДНК генов *Tgfb1*, *Lcn2*, *S100a10*, *Nlrp3*, *Gbp2*, *Ptx3*, *S100b*, *Gjal*, *Glul*, полученных из базы данных RefSeq Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Для конструирования зондов использовали программу Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Основными параметрами при конструировании праймеров были размер продукта (в пределах 50–140 нуклеотидов), температура отжига (58–63°C) и разница температур отжига (не более 3°C). Зонд конструировался с учетом следующих параметров: длина (18–7 нуклеотидов), содержание GC (20–80%), отсутствие нуклеотида G на 5' конце. Температура плавления зонда превышала температуру плавления праймеров на 5–10°C.

ПЦР проводили в термоциклере C1000 Touch в сочетании с системой обнаружения ПЦР в реальном времени CFX384 Touch™ (BioRad, США) в тетраплексах. Были использованы следующие мультиплексы: *Nlrp3* + *Aif1*, *Lcn2* + *Arg1* + *S100a10*, *S100b* + *Cx43*. Отдельно для данной работы были проведены ПЦР для генов: *S100b* + *Gjal* + *Glul*, *Tgfb1* + *Slc1a3*. Эффективность реакций для генов интереса проверяли методом серийных разведений [54]. Оптимизированные нами ПЦР показали оптимальную эффективность в диапазоне 90–100%. Для генов домашнего хозяйства были использованы ранее описанные мультиплексы: *Actb* + *Gapdh* + *B2m*, *Rpl13a* + *Ppia* + *Sdha*, *Hprt1* + *Pgk1* + *Ywhaz* [42].

Относительная экспрессия генов была рассчитана с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [55]. Данные нормировали по отношению к среднему геометрическому для трех наиболее стабильных референсных генов: *Gapdh*, *Ywhaz*, *Pgk1* для дорзального и вентрального гиппокампа, *Hprt1*, *Gapdh*, *Pgk1* для височной коры. Референсные гены для нормализации были выбраны на основе ранжирования, полученного с помощью онлайн-инструмента RefFinder (<https://bloome.cn/RefFinder/>).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ был выполнен с помощью SPSS Statistics 23 (IBM, США) и GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Идентификация выбросов в данных производилась с помощью квартильного метода. Критерий Шапиро–Уилка использовался для проверки нормальности распределения. Однородность дисперсии проверялась методом Левина. Для нормально распределенных данных использовали ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Дисперсионный анализ Уэлча и апостериорный тест Геймса–Хоуэлла использовали при неоднородности дисперсий.

Для всех тестов групповые различия считались статистически значимыми на уровне $p < 0.05$. На графиках данные представлены в логарифмической шкале в виде индивидуальных значений с минимальным и максимальным значениями (усы ошибок), медианой выборки (горизонтальная линия), первым и третьим квартилями.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Литий-пилокарпиновый эпилептический статус приводит к увеличению экспрессии генов маркеров активации астроцитов и микроглиальных клеток

Вначале для анализа активации глиальных клеток после длительных судорог мы провели оценку относительного уровня продукции мРНК наиболее широко используемых маркеров глиальных клеток: *Aif1* для микроглии и *S100b* для астроглии [56, 57]. Во всех исследованных структурах было выявлено достоверное увеличение экспрессии двух генов вне зависимости от применения анакинры (рис. 1). Это указывает на реактивацию астроцитов и микроглиальных клеток. Для ответа на вопрос

Таблица 1. Использованные последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Actb</i> NM_031144	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGAAGGTCTCAAA FAM-CGTGTGGCCCTGAGGAGCAS-BHQ1	200 200	[41] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Gapdh</i> NM_017008	TGCACCAACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTCC R6G-ATCACGCCACAGCTTCCAGAGGG-BHQ2	200 100	[43]
<i>B2m</i> NM_012512	TGCCATTCAGAAAACTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCCAAT ROX-ATTCAAAGTACTCTCGCCATCCACCCG-BHQ1	200 100	[44]
<i>Rpl13a</i> NM_173340	GGATCCCTCCACCCCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC FAM-CTGCCCTCAAAGGTGTGCGGGCT-BHQ1	200 100	[45] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Sdha</i> NM_130428	AGACGTTTGACAGGGGAATG TCAATCAATCCGCACCTTGTA R6G-ACCTGGTGGAGACCGTGGAGCT-BHQ2	200 100	[46] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Ppia</i> NM_017101	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-BHQ1	200 100	[47]
<i>Hprt1</i> NM_012583	TCCTCAGACCGCTTTTCCCGC TCATCATCACTAATCACGACCGTGG FAM-CCGACCCGGTCTGTCAATGTCGACCCCT-BHQ1	200 100	[48] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Pgkl</i> NM_053291	ATGCAAAAGACTGGCCAAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTTCC R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGGA-BHQ2	200 100	[49] (праймеры) [42] (зонд)

Продолжение табл. 1

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Ywhaz</i> NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACCTG GTCCTCTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAAGAGTCGTACAAAGACAGCAGCAGC-BHQ1	200 100	[49] (праймеры) [42] (зонд)
<i>Illb</i> NM_031512	CACCTCTCAAAGCAGAGCACAG GGGTCCATGTTGAAAGTCAAC FAM-TGTCCCGACCAATTGCTGTTCCCTAG-BHQ1	400 200	[50]
<i>Atf1</i> NM_017196.3	CAACACACTGCAGCCTCATC AAGCTTTTCTCCCTGCAAA Cy5-CCCCAACCTAAAGCCACCCAGCGTCTGA-BHQ3	200 100	[51]
<i>Ilrn</i> NM_022194.2	GGGGACCTTACAGTCACTAAT GGTTAGTATCCCAAGATTCTGAAAG ROX-AGTCAACTGGCCACCCCTGTGGGA-BHQ2	400 100	[51]
<i>Nlrp3</i> NM_001191642	CAGACCCCTCATGTTGCCCTGT AGACCTCGGCAGAAAGTAGA FAM-CCAGACTGGTGAACCTGCTGCCCTCA-BHQ1	200 100	Эта статья
<i>Len2</i> NM_130741.1	AGCTACGATGTGCAAGTGGC CCCCCTGGTTCTCCGTACA FAM-CGACACTGACTACGACCCAGTTTGCCCA-BHQ1	200 150	Эта статья
<i>Arg1</i> NM_017134.3	AGCTGGGAATTGGCAAAAGTG AACTCAGGTGAATGGGCCTT HEX-TGGAAAGAGACCTTTCAGCTACCTTGC-BHQ2	300 100	[52] (праймеры) Эта статья (зонд)
<i>S100a10</i> NM_031114.1	CATTTCACAGGTTTGCAGGGG GCACCTGGTCCAGGTCTTCA Cy5-AGGACCCCTCTGGCTGTGGACA-BHQ3	200 250	Эта статья

Окончание табл. 1

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'	Финальные концентрации, нМ	Ссылка
<i>Tgfb1</i> NM_021578.2	CTGCTGACCCCSACATGATAC AGCCCTGTATCCGGTCCST FAM-TGTCCGGCAGTGGCTGAACCA-BHQ1	200 100	Эта статья
<i>Ptx3</i> NM_001109536.2	AAACTTCGCCTCTCCAGCAA CATGGTGTGGGTCCTCG HEX-TGCTCTCTGGTCTGCAGTGTGGC-BHQ2	400 200	Эта статья
<i>Gbp2</i> NM_133624.2	AGTCAAATGGGCCACGCTTAA AGTGGGTGATGGCCTTTTGT HEX-AGCAGTGGTCTCTCCCTGCA-BHQ2	200 100	Эта статья
<i>Nos2</i> NM_012611.3	CAGAAAGCAGAATGTGACCATCAT CGGAGGGACAGCCAAATC ROX-CCACCCACACAGCCTCAGAGTCCCTT-BHQ2	400 200	[53]
<i>Gjal</i> NM_012567.2	CAGCCTCCAAAGGAGTCCAC GTCCAGAAAGTTCCTCCCAAGG FAM-ACTTTGGCGCCGGCTTCAС-BHQ1	200 100	Эта статья
<i>S100b</i> NM_013191.2	AAGTCCACACCCAGTCTCT AGGCTCCTGGTCACTTTTG HEX-ACACCGAAGCCAGAGGACTCCGG-BHQ2	200 100	Эта статья
<i>Sic1a3</i> NM_019225.2	GGCTGTCAITGTGGGTACA CAGAAGCTCCCCAGGAAAAGG Cy5-CTTGGATTGCCCTCCGACCCGT-BHQ3	200 100	Эта статья
<i>Gtlul</i> NM_017073.4	CCTTTCGGCTGGCCTTCTAA GCTCCCAСACCCGCAГТАТА ROX-TGGCTTCCCTGGACCCCAAGGACC-BHQ2	200 150	Эта статья

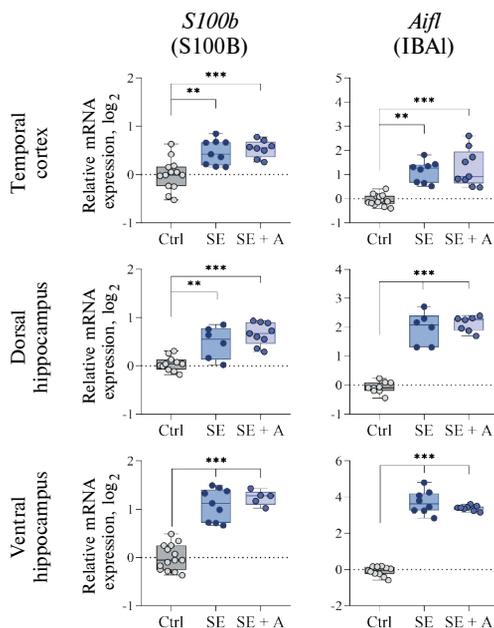


Рис. 1. Относительная экспрессия генов маркеров активации астроцитов (*S100b*) и микроглиальных клеток (*Aifl*) в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *S100b*: ТС: $F_{(2,27)} = 12.5, p = 0.002$; ДН: $F_{(2,23)} = 18.9, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,25)} = 60.3, p < 0.001$; *Aifl*: ТС: $F_{(2,11.9)} = 31.3, p < 0.001$; ДН: $F_{(2,9.6)} = 168.6, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,13.4)} = 697.7, p < 0.001$.

о функциональном состоянии реактивных глиальных клеток мы провели анализ экспрессии соответствующих генов.

На седьмые сутки после эпилептического статуса в гиппокампе крыс повышается экспрессия генов белков, вовлеченных в транспорт и метаболизм глутамата

Для оценки функционального состояния астроцитов в первую очередь мы сосредоточились на анализе звеньев, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата. Глутамат является основной возбуждающей аминокислотой, повышение внеклеточной концентрации которой показано в гиппокампе после судорог, вызванных пилокарпином [58]. Астроциты экспрессируют переносчики возбуждающих аминокислот с высокой аффинностью к глутамату (EAAT), принадлежащие семейству генов *Slc1* [15]. В данной работе мы провели анализ экспрессии гена *Slc1a3*, кодирующего EAAT1, и выявили повышение его относительной экспрессии в дорзальном и вентральном гиппокампе. Применение анакинры не оказало значимого влияния на выявленную гиперэкспрессию (рис. 2). В связи с этим увеличение экспрессии гена *Slc1a3* может свидетельствовать о развитии компенсаторных механизмов, направленных на уменьшение концентрации глутамата во внеклеточном веществе.

Далее мы проанализировали изменение экспрессии гена *Glul*, кодирующего глутаминсинтетазу (GS), являющуюся ключевым ферментом глутамат-глутаминового цикла, необходимого для нормального функционирования глутаматергического синапса [18]. Было выявлено увеличение экспрессии *Glul* в дорзальном и вентральном отделах гиппокампа. Аналогичные изменения отмечались и в группе SE+A (рис. 2). Это, в свою

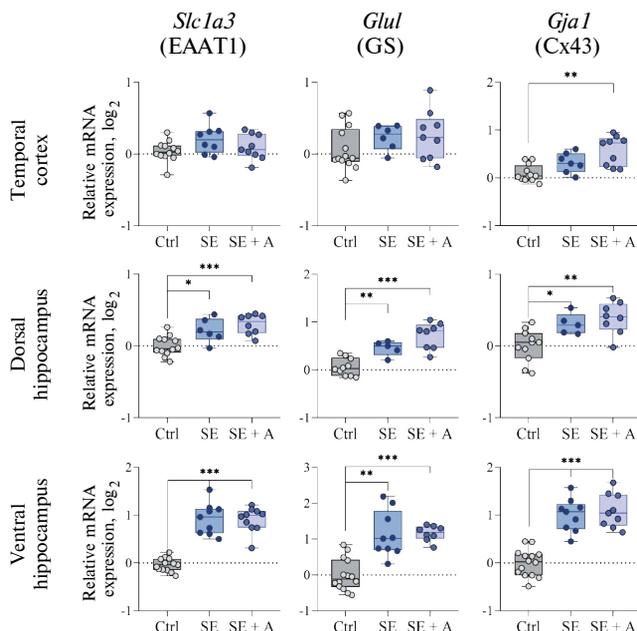


Рис. 2. Относительная экспрессия генов транспортера глутамата EAAT1 (*Slc1a3*), глутаминсинтазы (*Glul*) и белка семейства щелевых контактов коннексина 43 (*Gjal*) в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Slc1a3*: ТС: $F_{(2,26)} = 2.3, p = 0.12$; ДН: $F_{(2,23)} = 11.3, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,14,34)} = 73.06, p < 0.001$; *Glul*: ТС: $F_{(2,25)} = 1.36, p = 0.27$; ДН: $F_{(2,20)} = 20.8, p < 0.001$; ВН: $F_{(2,16,25)} = 33.56, p < 0.001$; *Gjal*: ТС: $F_{(2,12,65)} = 9.47, p < 0.01$; ДН: $F_{(2,21)} = 8.54, p < 0.01$; ВН: $F_{(2,29)} = 41.8, p < 0.001$.

очередь, также может указывать на компенсаторный механизм, направленный на преобразование глутамата в неактивную форму.

Кроме того, был проведен анализ экспрессии гена коннексина Cx43, участвующего в перераспределении глутамата между астроцитами [17]. Мы выявили повышение экспрессии гена *Gjal* в дорзальной и вентральной областях гиппокампа через 7 дней после эпилептического статуса (рис. 2). В височной коре увеличение продукции мРНК гена *Gjal* было обнаружено только в группе SE+A по сравнению с контрольными животными, но достоверной разницы между группами SE и SE+A выявлено не было. Полученные данные могут свидетельствовать о функциональной реорганизации астроцитарного синцития.

*Применение анакинры способствовало снижению гиперэкспрессии гена провоспалительного цитокина *Il1b**

Анализ интенсивности нейровоспаления был проведен с помощью оценки относительной экспрессии генов цитокинов (*Il1b*, *Il1rn* и *Tgfb1*) и *Nlrp3*. Во всех исследованных структурах мозга было обнаружено повышение относительной продукции мРНК трех генов: *Nlrp3* – гена инфламмосомного белка NLRP3, активация которого запускает каскад реакций, приводящий к высвобождению активной формы IL-1 β ; *Il1rn* – гена противовоспалительного цитокина IL-1Ra, который конкурирует за связывание с рецептором IL-1R1 и блокирует передачу воспалительного сигнала; *Tgfb1* – гена плейотропного цитокина TGF- β 1 с разнообразным действием в ЦНС,

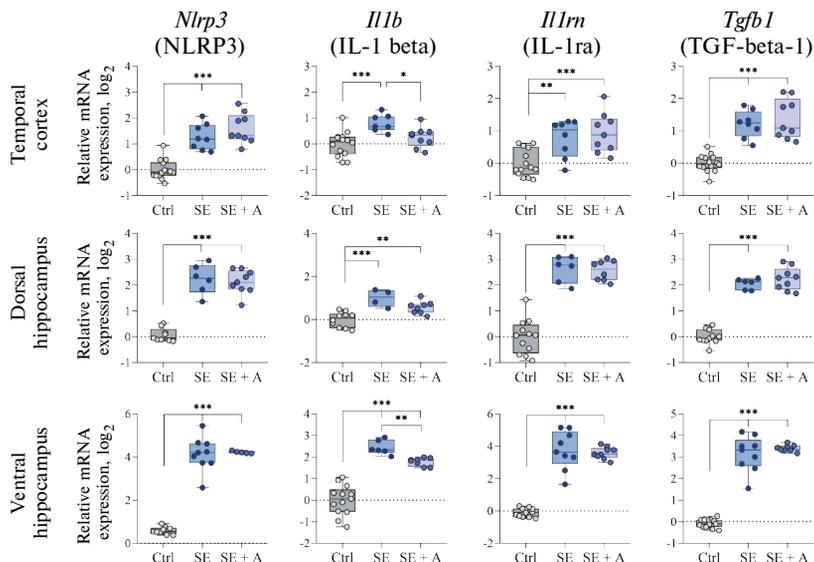


Рис. 3. Относительная экспрессия генов основного белка инфламасом *Nlrp3*, провоспалительного цитокина *Il1b*, противовоспалительного цитокина *Il1rn* и плейотропного цитокина *Tgfb1* в височной коре (ТС), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Nlrp3*: ТС: $F_{(2,28)} = 36.7, p < 0.001$; DH: $F_{(2,21)} = 66.1, p < 0.001$; VH: $F_{(2,12.2)} = 152.9, p < 0.001$; *Il1b*: ТС: $F_{(2,27)} = 8.4, p < 0.01$; DH: $F_{(2,19)} = 13.85, p < 0.001$; VH: $F_{(2,12.5)} = 51.67, p < 0.001$; *Il1rn*: ТС: $F_{(2,28)} = 10.46, p < 0.001$; DH: $F_{(2,23)} = 67.58, p < 0.001$; VH: $F_{(2,13.97)} = 326.4, p < 0.001$.

включая участие в воспалительной реакции. Применение анакинры не повлияло на экспрессию перечисленных генов (рис. 3). После эпилептического статуса в мозге крыс во всех исследованных структурах также было выявлено повышение экспрессии гена *Il1b*, кодирующего провоспалительный цитокин IL-1 β (рис. 3). Однако в случае данного цитокина применение анакинры значительно снижало выявленную гиперэкспрессию, особенно в височной коре и вентральном гиппокампе.

Применение анакинры не повлияло на экспрессию генов маркеров поляризации астроцитов

Для оценки состояния активации астроглиальных клеток в конце первой недели эпилептогенеза мы проанализировали относительную продукцию мРНК маркеров поляризации состояний A1 (*Lcn2*, *Gbp2*) и A2 (*S100a10*, *Ptx3*). Было выявлено увеличение экспрессии всех исследованных генов в трех структурах, при этом применение анакинры не повлияло на продукцию генов поляризации астроцитов (рис. 4). Таким образом, можно сделать вывод, что через 7 дней после литий-пилокарпинового SE происходит активация обоих типов состояний астроглиальных клеток, а баланс этих состояний не зависит от активации пути IL-1 β .

Применение анакинры восстановило экспрессию гена маркера противовоспалительного состояния микроглиальных клеток

Эффективными маркерами полярных состояний активации микроглии являются ферменты, использующие аргинин в качестве субстрата, в частности, индуцибельная NO-синтаза (iNOS) и аргиназа-1 [9]. Для M1 характерно повышение продукции гена

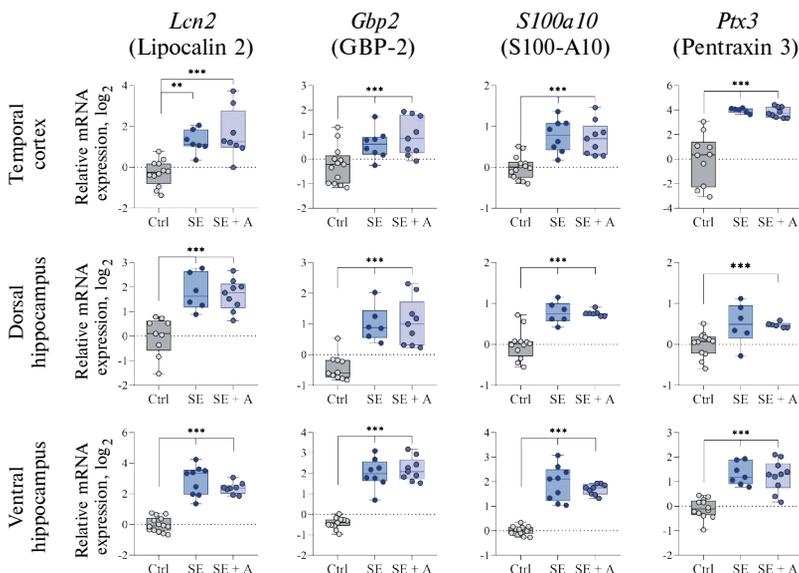


Рис. 4. Относительная экспрессия генов маркеров поляризации астроцитов: маркеры состояний A1 (*Lcn2*, *Gbp2*) и A2 (*S100a10*, *Ptx3*) в височной коре (ТС), дорзальном (ДН) и вентральном (ВН) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Lcn2*: ТС: $F_{(2, 24)} = 14.82$, $p < 0.001$; ДН: $F_{(2, 21)} = 16.0$, $p < 0.001$; ВН: $F_{(2, 15.45)} = 89.87$, $p < 0.001$; *Gbp2*: ТС: $F_{(2, 27)} = 7.58$, $p < 0.01$; ДН: $F_{(2, 22)} = 17.37$, $p < 0.001$; ВН: $F_{(2, 12.38)} = 101.2$, $p < 0.001$; *S100a10*: ТС: $F_{(2, 28)} = 16.65$, $p < 0.001$; ДН: $F_{(2, 10.25)} = 22.68$, $p < 0.001$; ВН: $F_{(2, 14.02)} = 199.9$, $p < 0.001$; *Ptx3*: ТС: $F_{(2, 13.88)} = 17.65$, $p < 0.001$; ДН: $F_{(2, 9.8)} = 12.21$, $p < 0.01$; ВН: $F_{(2, 26)} = 25.74$, $p < 0.001$.

iNOS, синтезирующей NO, участвующий в реакциях окислительного стресса и нейровоспаления, имеющих место при эпилептогенезе [8, 9]. Мы оценили относительную экспрессию гена *Nos2*, кодирующего iNOS, и обнаружили снижение его продукции в височной коре, при этом применение анакинры способствовало более выраженному уменьшению экспрессии данного гена (рис. 5). Маркером состояния M2 является аргиназа-1, которая эффективно конкурирует с iNOS и превращает аргинин в орнотиновом цикле в орнитин и мочевину, что ведет к иммуносупрессии в связи с истощением содержания аргинина [10]. При анализе относительной экспрессии гена *Arg1*, кодирующего аргиназу-1, было выявлено снижение его экспрессии в дорзальном гиппокампе. Применение анакинры восстанавливало экспрессию данного гена до контрольных значений, что может указывать на смещение состояния активации микроглиальных клеток в сторону противовоспалительного фенотипа M2 (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе был проведен анализ экспрессии генов различных астро- и микроглиальных белков в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели на седьмые сутки после эпилептического статуса. Для выяснения роли сигнального пути IL-1 β в поляризации глиальных клеток при эпилептогенезе производилось введение анакинры (IL-1Ra) в течение всего периода после эпилептического статуса и до дня анализа экспрессии генов. Для анализа были выбраны гены-маркеры активации астроглии (*S100b*) и микроглии (*Aif1*), гены белков, участвующих в транспорте и метаболизме глутамата

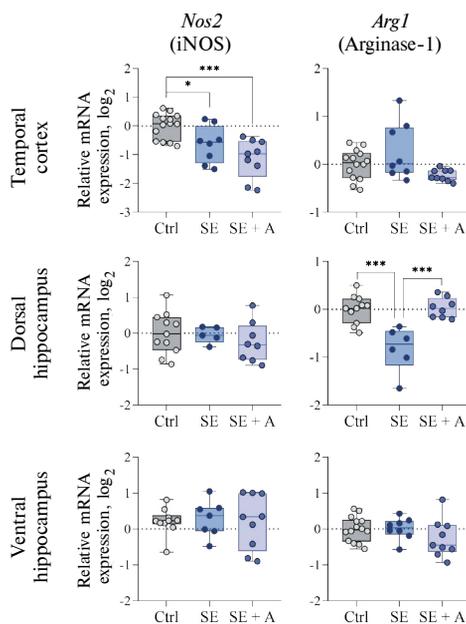


Рис. 5. Относительная экспрессия генов маркеров поляризации микроглиальных клеток: маркеры состояний M1 (*Nos2*) и M2 (*Arg1*) в височной коре (ТС), дорзальном (DH) и вентральном (VH) гиппокампе крыс через 7 дней после эпилептического статуса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса – Хоуэлла. *Nos2*: ТС: $F_{(2,28)} = 11.07, p < 0.001$; DH: $F_{(2,21)} = 0.53, p = 0.596$; VH: $F_{(2,23)} = 0.063, p = 0.94$; *Arg1*: ТС: $F_{(2,13.96)} = 5.183, p < 0.05$; DH: $F_{(2,22)} = 15.59, p < 0.001$; VH: $F_{(2,28)} = 1.322, p = 0.283$.

(*Slc1a3, Glul, Gjal*), гены пути IL-1 β (*Nlrp3, Il1b, Il1rn*) и *Tgfb1*, гены-маркеры поляризации астроглии (*Lcn2, Gbp2, S100a10, Ptx3*) и микроглии (*Arg1, Nos2*).

Уровень экспрессии мРНК *S100b* и *Aif1* значимо возрос во всех исследованных структурах, и введение анакинры не снизило их гиперэкспрессию. В наших предыдущих исследованиях также было выявлено повышение экспрессии *Gfap*, являющегося классическим маркером активации астроглии [59]. В совокупности данные об экспрессии маркеров глиальных клеток позволяют сделать вывод о том, что на седьмые сутки после индуцированного пилокарпином эпилептического статуса наблюдается активация астроглиальных и микроглиальных клеток, что согласуется с литературными данными о нейровоспалении в период эпилептогенеза [60].

Предполагается, что вызванная эпилептическим статусом реактивация и дисфункциональное ремоделирование астроцитов может являться одной из причин эпилептогенных нарушений [5]. В качестве ее основного механизма рассматривается нарушение регуляции работы глутаматергического синапса вследствие снижения поглощения синаптического глутамата астроцитами, а также нарушения глутамат-глутаминового цикла [14]. Транспортёры глутамата EAAT1 и EAAT2, характерные для астроцитов, имеют разную локализацию на мембране клетки. EAAT1 располагается на соме астроцитов и по длине их отростков, а EAAT2 закреплен каркасными белками на перисинаптической части астроцитарного отростка, непосредственно контактирующей с глутаматергическим синапсом, и осуществляет обратный захват глутамата, высвобождаемого пресинапсом [16]. Ранее в наших работах было показано снижение продукции белка EAAT2 в дорзальном гиппокампе крыс на седьмые сутки после эпилептического статуса при отсутствии значимых изменений экспрессии гена *Slc1a2* [21],

что может свидетельствовать об ухудшении синаптической функции астроцитов [61]. В настоящем исследовании мы провели анализ экспрессии гена *Slc1a3*, кодирующего белок EAAT1, который располагается в основном на отростках и соме астроцитов, и гена глутаминсинтетазы (*Glul*), осуществляющей превращение глутамата в глутамин и локализованной преимущественно в астроцитах. В дорзальном и вентральном гиппокампе была выявлена повышенная экспрессия генов *Slc1a3* и *Glul*, что может свидетельствовать о развитии общего компенсаторного механизма поглощения и превращения глутамата астроцитами. Ранее было показано, что продукция белков EAAT1 и EAAT2 снижается в гиппокампе пациентов с эпилепсией [62, 63]. И хотя в наших предыдущих работах введение анакинры приводило к изменению экспрессии *Slc1a2* в вентральном гиппокампе и височной коре, что, как мы предположили, являлось одним из механизмов нейропротекции, в настоящем исследовании введение анакинры не оказало значимого влияния на продукцию *Slc1a3* и *Glul*. Это означает, что увеличение экспрессии данных генов в латентной фазе литий-пилокарпиновой модели не определяется активацией пути IL-1 β . В то же время IL-1 β способствовал снижению экспрессии генов глутамат-глутаминового цикла в модели рассеянного склероза [64]. Это может указывать на присутствие в эпилептогенезе других механизмов, вклад которых в изменение экспрессии *Glul* оказывается более существенным.

Данные о роли щелевых соединений и коннексинов в эпилептогенезе противоречивы [19]. Функциональные щелевые контакты между астроцитами образованы полуканалами каждого из двух контактирующих астроцитов. Считается, что в случае тяжелого реактивного астроглиоза щелевые контакты распадаются, становясь полуканалами, что затрудняет быстрое перераспределение ионов и малых молекул и способствует их утечке из астроцитов, что может приводить к повышению возбудимости нейронов [65]. Ингибирование Sx43-содержащих щелевых контактов предотвращало эпилептиформную активность в срезах или снижало ее интенсивность за счет снижения астроцитарной синхронизации [66]. При эпилепсии реактивный астроглиоз сопровождается ростом экспрессии генов коннексинов Sx43 [19, 22, 67]. В нашей работе также было отмечено повышение продукции мРНК *Gjal* на седьмые сутки после литий-пилокарпинового эпилептического статуса, что может свидетельствовать о функциональной реорганизации астроцитарного синцития. При этом введение анакинры не повлияло на гиперэкспрессию *Gjal* в гиппокампе, но способствовало повышению экспрессии *Gjal* в височной коре крыс после эпилептического статуса. Можно предположить, что активация пути IL-1 β оказывает влияние на функционирование Sx43. Подобная связь была обнаружена при моделировании болезни Альцгеймера, где обработка IL-1 β культуры первичных астроцитов способствовала увеличению уровня дефосфорилированного Sx43 [68]. Однако по уровню мРНК в ткани можно сделать лишь ограниченные выводы о функциональном состоянии щелевых контактов и их вкладе в развитие эпилепсии, так как решающую роль при эпилептогенезе играет структурная организация белковых молекул. Совместно с анализом экспрессии *Gjal* и *Slc1a2/Slc1a3* уместно в будущих исследованиях оценить относительную экспрессию генов калиевых каналов Kir4.1 и аквапоринов AQP4, так как перечисленные каналы являются звеньями одной системы, участвующей в клиренсе глутамата и K⁺ и поддержании внеклеточного гомеостаза [19].

Для анализа активации провоспалительного пути IL-1 β в условиях введения анакинры мы оценили экспрессию генов основных участников данного пути и обнаружили увеличение экспрессии *Nlrp3*, *Il1b* и *Il1rn* во всех исследованных структурах на седьмые сутки после эпилептического статуса. В результате применения анакинры наблюдалось подавление гиперэкспрессии только гена *Il1b* в височной коре и вентральном гиппокампе. Экспрессия гена *Nlrp3* не изменилась в результате системного введения анакинры, следовательно, снижение экспрессии гена *Il1b* связано с последующими механизмами регуляции провоспалительного ответа, в частности,

рецептора IL-1R1. Согласно литературным данным, изменение соотношения IL-1 β (запуск провоспалительного каскада при связывании с рецептором IL-1R1) и IL-1Ra (ингибирование развития противовоспалительного каскада) в пользу второго может способствовать снижению интенсивности воспаления и развитию комплекса противовоспалительных реакций [69]. Следует заметить, что в мозге крыс после эпилептического статуса наряду с повышением экспрессии *Il1b* было выявлено и повышение экспрессии *Il1rn*, что отражает работу собственных механизмов регуляции интенсивности нейровоспаления, которые, по-видимому, оказываются недостаточными после литий-пилокарпинового эпилептического статуса для снижения интенсивности воспалительных процессов.

Мы также выявили повышение экспрессии гена *Tgfb1* в гиппокампе и височной коре крыс через 7 дней после эпилептического статуса. Функции TGF- β 1 неоднозначны [70], с одной стороны, он рассматривается как плейотропный цитокин, продуцируемый микроглией и являющийся маркером состояния M2, с другой стороны, как ростовой фактор. Гиперэкспрессия *Tgfb1* может быть звеном компенсаторного механизма для снижения интенсивности нейровоспалительных реакций, ранее было показано, что TGF- β 1 регулирует степень пролиферации астроцитов и микроглии [71]. С другой стороны, при нарушении целостности гематоэнцефалического барьера TGF- β 1 опосредует индуцируемое альбумином патологическое ремоделирование матрикса и повышение возбудимости нейронов [72]. Таким образом, выводы о функциональном значении гиперэкспрессии *Tgfb1* можно делать только на основании комплексных морфологических и молекулярных данных.

На основе анализа генов-маркеров A1/A2 поляризации астроцитов (*Lcn2*, *Gbp2* и *S100a10*, *Ptx3* соответственно) мы делаем вывод, что на седьмые сутки после SE имеет место активация обоих полярных состояний астроцитов. Более того, поскольку введение анакинры не оказало влияния на гиперэкспрессию изучаемых генов, мы предполагаем, что баланс этих состояний зависит не от активации пути IL-1 β , а определяется другими механизмами.

Активированная микроглия представлена спектром переходящих состояний, где M1/M2 являются обозначениями крайних полярных состояний активации, но редко встречаются в чистом виде *in vivo* [73, 74]. Считается, что на начальных этапах развития нейровоспаления преобладает провоспалительный или нейротоксический фенотип M1, направленный на удаление продуктов клеточной гибели, а также инфекционных агентов. На завершающих этапах воспалительных реакций, направленных на пролиферацию клеток и репарацию тканей, происходит переключение на M2 – так называемый альтернативный или противовоспалительный фенотип. Однако когда противовоспалительный ответ не дает результата, постоянное присутствие и продолжающаяся продукция провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода может привести к гибели клеток и дальнейшему повреждению тканей [6]. По данным экспрессии маркерных генов полярных фенотипов мы можем говорить о равновесии про- и противовоспалительных процессов в целом. В нашем исследовании было обнаружено снижение экспрессии гена *Nos2* в височной коре, что может свидетельствовать об уменьшении провоспалительной активации микроглии на седьмые сутки после эпилептического статуса. При этом введение анакинры способствовало более выраженному подавлению экспрессии данного гена в височной коре. Напротив, в дорзальном гиппокампе – одной из основных структур эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели – было выявлено снижение экспрессии гена *Arg1*, что может указывать на ослабление противовоспалительных процессов, реализуемых микроглией, это способствует эпилептогенезу, поскольку ингибирование активности или экспрессии аргиназы приводит к увеличению продукции NO [8, 9]. Восстановление продукции *Arg1* при применении анакинры может отражать один из механизмов противоэпилептогенного эффекта IL-1Ra, показанного ранее [59]. Можно предположить, что в совокупности сохранение повышен-

ной экспрессии противовоспалительных факторов IL-1Ra и TGF- β 1, восстановление экспрессии гена *Arg1* и снижение гиперэкспрессии *Il1b* могут значимо смещать баланс реакций активного нейровоспаления в сторону нейропротекции и репарации нервной ткани. Известно, что активация противовоспалительного фенотипа микроглии лежит в основе благоприятного исхода болезней, в патогенезе которых ключевую роль играет нейровоспаление [6].

Таким образом, системное введение анакринры не повлияло на интенсивность активации астроглии и микроглии, но позволило сдвинуть баланс между про- и противовоспалительными процессами в сторону противовоспалительных реакций в активированной микроглии. Это позволяет предположить, что поляризация микроглии зависит от активации пути IL-1 β , а влияние на этот путь может быть перспективным подходом к модификации эпилептогенеза и терапии эпилепсии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

SE – status epilepticus, эпилептический статус

EAAT1 и EAAT2 – Excitatory Amino Acid Transporter 1 и 2

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и разработка дизайна исследования (М. В. З., О. Е. З., А. В. З.), проведение экспериментальной работы (М. В. З., А. А. К., А. В. Д., А. М. И.), анализ и интерпретация данных (М. В. З., А. А. К., А. В. Д.), статистическая обработка данных (М. В. З., А. А. К.), написание и редактирование рукописи (А. В. Д., М. В. З., А. А. К., О. Е. З., А. В. З.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда, номер проекта 23-25-00242. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований и в соответствии с Руководством по обращению с лабораторными животными, действующим в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (номер этического разрешения: 13-к-а от 15 февраля 2018 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ (2015) Epileptogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med 5: a022822.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022822>
2. Singh S, Singh TG, Rehni AK (2021) An Insight into Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches in Epileptogenesis. CNS Neurol Disord – Drug Targets 19: 750–779.
<https://doi.org/10.2174/1871527319666200910153827>
3. Yu C, Deng XJ, Xu D (2023) Microglia in epilepsy. Neurobiol Dis 185: 106249.
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2023.106249>
4. Verkhratsky A, Ho MS, Vardjan N, Zorec R, Parpura V (2019) General Pathophysiology of Astroglia. Adv Exp Med Biol 1175: 1149.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_7
5. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. Trends Neurosci 36: 174–184.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>

6. *Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK* (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammat* 11: 1–15.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
7. *Ding Z-B, Song L-J, Wang Q, Kumar G, Yan Y-Q, Ma C-G* (2021) Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 16: 1702.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.360664>
8. *Sharma S, Puttachary S, Thippeswamy T* (2019) Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: A target for disease modification in epilepsy. *J Neurosci Res* 97: 1363–1377.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24205>
9. *Morris SM* (2007) Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *J Nutr* 137: 1602S–1609S.
<https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S>
10. *Munder M* (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158: 638–651.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
11. *Vezzani A, Ravizza T, Bedner P, Aronica E, Steinhäuser C, Boison D* (2022) Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy. *Nat Rev Neurol* 18: 707–722.
<https://doi.org/10.1038/s41582-022-00727-5>
12. *Gibbons MB, Smeal RM, Takahashi DK, Vargas JR, Wilcox KS* (2013) Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: Opportunities for preventive therapy? *Neurochem Int* 63: 660–669.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.008>
13. *Chen T-S, Huang T-H, Lai M-C, Huang C-W* (2023) The Role of Glutamate Receptors in Epilepsy. *Biomedicines* 11: 783.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11030783>
14. *Boison D, Steinhäuser C* (2018) Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 66: 1235–1243.
<https://doi.org/10.1002/glia.23247>
15. *Torres GE, Amara SG* (2007) Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 17: 304–312.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.05.002>
16. *Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, Panatier A, Pinson B, Baufreton J, Groc L, Oliet SHR* (2015) Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci* 18: 219–226.
<https://doi.org/10.1038/nn.3901>
17. *Verhoog QP, Holtman L, Aronica E, van Vliet EA* (2020) Astrocytes as Guardians of Neuronal Excitability: Mechanisms Underlying Epileptogenesis. *Front Neurol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2020.591690>
18. *Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E, Schousboe A, Waagepetersen HS, Rosenberg PA, Aldana BI* (2021) Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 196: 108719.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>
19. *Yang T-T, Qian F, Liu L, Peng X-C, Huang J-R, Ren B-X, Tang F-R* (2021) Astroglial connexins in epileptogenesis. *Seizure* 84: 122–128.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.11.022>
20. *Barker-Haliski M, White HS* (2015) Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a022863.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022863>
21. *Dyomina AV, Kovalenko AA, Zakharova MV, Postnikova TY, Griflyuk AV, Smolensky IV, Antonova IV, Zaitsev AV* (2022) MTEP, a selective mGluR5 antagonist, had a neuroprotective effect but did not prevent the development of spontaneous recurrent seizures and behavioral comorbidities in the rat lithium–pilocarpine model of epilepsy. *Int J Mol Sci* 23.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010497>
22. *Shen W, Pristov J, Nobili P, Nikolić L* (2023) Can glial cells save neurons in epilepsy? *Neural Regen Res* 18: 1417.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.360281>
23. *Soltani Khaboushan A, Yazdanpanah N, Rezaei N* (2022) Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. *Mol Neurobiol* 59: 1724–1743.
<https://doi.org/10.1007/s12035-022-02725-6>
24. *Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A* (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 29: 142–160.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.012>

25. *Pohlentz MS, Müller P, Cases-Cunillera S, Opitz T, Surges R, Hamed M, Vatter H, Schoch S, Becker AJ, Pitsch J* (2022) Characterisation of NLRP3 pathway-related neuroinflammation in temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 17: 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271995>
26. *Wu C, Zhang G, Chen L, Kim S, Yu J, Hu G, Chen J, Huang Y, Zheng G, Huang S* (2020) The Role of NLRP3 and IL-1 β in Refractory Epilepsy Brain Injury. *Front Neurol* 10: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01418>
27. *Dubé C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ* (2005) Interleukin-1 β contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57: 152–155.
<https://doi.org/10.1002/ana.20358>
28. *Vezzani A, Baram TZ* (2007) New Roles for Interleukin-1 Beta in the Mechanisms of Epilepsy. *Epilepsy Curr* 7: 45–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2007.00165.x>
29. *Weber A, Wasiliew P, Kracht M* (2010) Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal* 3: 1–7.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>
30. *De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A* (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 12: 2623–2633.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00140.x>
31. *Waugh J, Perry CM* (2005) Anakinra. *BioDrugs* 19: 189–202.
<https://doi.org/10.2165/00063030-200519030-00005>
32. *Cavalli G, Dinarello CA* (2018) Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front Pharmacol* 9: 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01157>
33. *Ravizza T, Lucas S, Balosso S, Bernardino L, Ku G, Noé F, Malva J, Randle JCR, Allan S, Vezzani A* (2006) Inactivation of Caspase-1 in Rodent Brain: A Novel Anticonvulsive Strategy. *Epilepsia* 47: 1160–1168.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00590.x>
34. *Noe FM, Polascheck N, Frigerio F, Bankstahl M, Ravizza T, Marchini S, Beltrame L, Banderó CR, Löscher W, Vezzani A* (2013) Pharmacological blockade of IL-1 β /IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 59: 183–193.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.015>
35. *Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M* (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172: 143–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>
36. *André V, Dubé C, François J, Leroy C, Rigoulot M, Roch C, Namer IJ, Nehlig A* (2007) Pathogenesis and Pharmacology of Epilepsy in the Lithium-pilocarpine Model. *Epilepsia* 48: 41–47.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01288.x>
37. *Коваленко АА, Калемев СВ, Шварц АП, Дёмина АВ, Зубарева ОЕ* (2019) Региональная специфика изменений продукции мРНК провоспалительных цитокинов в литий-пilocарпиновой модели височной эпилепсии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 716–723. [*Kovalenko AA, Kalemenev SV, Schwartz AP, Demina AV, Zubareva OE* (2019) Regional specificity of changes in the production of mRNA of proinflammatory cytokines in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Russ J Physiol* 105: 716–723. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919060037>
38. *De Bruin VMS, Marinho MMF, De Sousa FCF, Viana GSB* (2000) Behavioral and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in young and adult rats: A comparative study. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 547–551.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00247-6)
39. *Furtado MA, Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira JAC, Garcia-Cairasco N* (2011) Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy Behav* 20: 257–266.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.11.024>
40. *Paxinos G, Watson C* (2006) *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
41. *Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G* (2008) Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302–309.
<https://doi.org/10.1002/syn.20496>
42. *Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev AV* (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes* 53: 101611.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>

43. *Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA* (2004) Taste Receptor Cells Express pH-Sensitive Leak K⁺ Channels. *J Neurophysiol* 92: 2909–2919.
<https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>
44. *Yamaguchi M, Yamauchi A, Nishimura M, Ueda N, Naito S* (2005) Soybean Oil Fat Emulsion Prevents Cytochrome P450 mRNA Down-Regulation Induced by Fat-Free Overdose Total Parenteral Nutrition in Infant Rats. *Biol Pharm Bull* 28: 143–147.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.143>
45. *Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo J-M, Hoogland G* (2012) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 5: 685.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>
46. *Pohjanvirta R, Niittynen M, Lindén J, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB* (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem Biol Interact* 160: 134–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.001>
47. *Malkin SL, Amakhin DV, Veniaminova EA, Kim KK, Zubareva OE, Magazanik LG, Zaitsev AV* (2016) Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuroscience* 327: 146–155.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.024>
48. *Cook NL, Vink R, Donkin JJ, van den Heuvel C* (2009) Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 87: 34–41.
<https://doi.org/10.1002/jnr.21846>
49. *Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G* (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9: 53.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>
50. *Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF* (2004) Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137: 65–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02499.x>
51. *Zubareva OE, Dyomina AV, Kovalenko AA, Roginskaya AI, Melik-Kasumov TB, Korneeva MA, Chuprina AV, Zhabinskaya AA, Kolyhan SA, Zakharova MV, Gryaznova MO, Zaitsev AV* (2023) Beneficial Effects of Probiotic Bifidobacterium longum in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. *Int J Mol Sci* 24: 8451.
<https://doi.org/10.3390/ijms24098451>
52. *Su J, Zhang Y, Cheng C, Zhu Y, Ye Y, Sun Y, Xiang S, Wang Y, Liu Z, Zhang X* (2021) Hydrogen regulates the M1/M2 polarization of alveolar macrophages in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 47: 301–310.
<https://doi.org/10.1080/01902148.2021.1919788>
53. *Sang N, Yun Y, Li H, Hou L, Han M, Li G* (2010) SO₂ Inhalation Contributes to the Development and Progression of Ischemic Stroke in the Brain. *Toxicol Sci* 114: 226–236.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq010>
54. *Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M* (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3: 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
55. *Livak KJ, Schmittgen TD* (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 25: 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
56. *Langeh U, Singh S* (2020) Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. *Curr Neuropharmacol* 19: 265–277.
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729100427>
57. *Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, Steinhäuser C, Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A, Allen NJ, Araque A, Barbeito L, Barzilai A, Bergles DE, Bonvento G, Butt AM, Chen WT, Cohen-Salmon M, Cunningham C, Deneen B, De Strooper B, Díaz-Castro B, Farina C, Freeman M, Gallo V, Goldman JE, Goldman SA, Götz M, Gutiérrez A, Haydon PG, Heiland DH, Hol EM, Holt MG, Iino M, Kastanenka KV, Kettenmann H, Khakh BS, Koizumi S, Lee CJ, Liddelow SA, MacVicar BA, Magistretti P, Messing A, Mishra A, Molojfsky AV, Murai KK, Norris CM, Okada S, Oliet SHR, Oliveira JF, Panatier A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Pellerin L, Perea G, Pérez-Nievas BG, Pfrieger FW, Poskanzer KE, Quintana FJ, Ransohoff RM, Riquelme-Perez M, Robel S, Rose CR, Rothstein JD, Rouach N, Rowitch DH, Semyanov A, Sirko S, Sontheimer H, Swanson RA, Vitorica J, Wanner IB, Wood LB, Wu J, Zheng B, Zimmer ER,*

- Zorec R, Sofroniew MV, Verkhratsky A (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24: 312.
<https://doi.org/10.1038/S41593-020-00783-4>
58. Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 121: 1171–1179.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0701231>
59. Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV (2020) Anakinra reduces epileptogenesis, provides neuroprotection, and attenuates behavioral impairments in rats in the lithium–pilocarpine model of epilepsy. *Pharmaceuticals* 13: 1–25.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
60. Choi J, Koh S (2008) Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J* 49: 1–18.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.1.1>
61. Kim K, Lee S, Kegelman TP, Su Z, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellicchia M, Sarkar D, Fisher PB (2011) Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 226: 2484–2493.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22609>
62. Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MGA, Schrama LH, van Veelen CWM, van Rijen PC, van Nieuwenhuizen O, Gispen WH, de Graan PNE (2002) Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125: 32–43.
<https://doi.org/10.1093/brain/awf001>
63. Sarac S, Afzal S, Broholm H, Madsen FF, Ploug T, Laursen H (2009) Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy. *APMIS* 117: 291–301.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02443.x>
64. Zeis T, Allaman I, Gentner M, Schroder K, Tschopp J, Magistretti PJ, Schaeren-Wiemers N (2015) Metabolic gene expression changes in astrocytes in Multiple Sclerosis cerebral cortex are indicative of immune-mediated signaling. *Brain Behav Immun* 48: 313–325.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.013>
65. Bedner P, Steinhäuser C (2013) Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 63: 682–687.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.01.011>
66. Kékési O, Joja E, Szabó Z, Kardos J, Héja L (2015) Recurrent seizure-like events are associated with coupled astroglial synchronization. *Front Cell Neurosci* 9.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00215>
67. Bedner P, Dupper A, Hüttmann K, Müller J, Herde MK, Dublin P, Deshpande T, Schramm J, Häussler U, Haas CA, Henneberger C, Theis M, Steinhäuser C (2015) Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138: 1208–1222.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv067>
68. Pleiss MM, Furman JL, Abdul HM, Norris CM (2014) P3-069: A NOVEL REAGENT MODULATES CN/CX43 INTERACTIONS DURING THE PROGRESSION OF ALZHEIMER'S DISEASE. *Alzheimer's Dement* 10.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.05.1157>
69. Plata-Salaman CR (2002) Brain cytokines and disease. *Acta Neuropsychiatr* 14: 262–278.
<https://doi.org/10.1034/j.1601-5215.2002.140602.x>
70. Smith AM, Dragunow M (2014) The human side of microglia. *Trends Neurosci* 37: 125–135.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.001>
71. Lindholm D, Castrén E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H (1992) Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 117: 395–400.
<https://doi.org/10.1083/jcb.117.2.395>
72. Kim SY, Senatorov VV, Morrissey CS, Lippmann K, Vazquez O, Milikovskiy DZ, Gu F, Parada I, Prince DA, Becker AJ, Heinemann U, Friedman A, Kaufner D (2017) TGFβ signaling is associated with changes in inflammatory gene expression and perineuronal net degradation around inhibitory neurons following various neurological insults. *Sci Rep* 7: 7711.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07394-3>
73. Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 136: 10–17.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13062>
74. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay M-E, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E,

Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mracsko E, Nadjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schafer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai L-H, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu L-J, Wyss-Coray T (2022) Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110: 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>

Anakinra Promotes M2 Microglia Activation during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy

M. V. Zakharova^{a,*}, A. V. Dyomina^{a,*}, A. A. Kovalenko^a, O. E. Zubareva^a,
A. M. Ischenko^b, and A. V. Zaitsev^{a,*}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, Russia*

^b*Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia*

^{*}*equal contribution of the authors*

^{*}*e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Astrocytes and microglia and their polarization are thought to contribute to the progression of epilepsy. One of the processes affecting polarization is neuroinflammation, which plays an important role in epileptogenesis. However, the specific mechanisms of its involvement in shifting the pro- and anti-inflammatory reactivation of astro- and microglia have not been clarified. In this study, we examined the effect of 7-day interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) administration on glial cell polarization during the latent phase of the lithium-pilocarpine model in 7-week-old male Wistar rats. In temporal cortex, dorsal and ventral hippocampus the mRNA expression levels of the following genes were analyzed: (i) markers of astroglia (*S100b*) and microglia (*Aif1*) activation, (ii) astrocytic proteins involved in glutamate transport and metabolism (*Slc1a3*, *Glul*, *Gjal*), (iii) pro-inflammatory pathway interleukin-1 β (*Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn*) and transforming growth factor β 1 (*Tgfb1*), (iv) markers of astroglia polarization (*Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*), and (v) microglia polarization (*Nos2* and *Arg1*). The mRNA expression levels of *S100b* and *Aif1* were significantly increased, and anakinra administration did not reduce their overexpression. This indicates reactivation of astroglia and microglia regardless of the anakinra administered. The expression of *Slc1a3*, *Glul*, and *Gjal* genes increased in the hippocampus; anakinra administration did not affect their hyperexpression, but promoted increased expression of *Gjal* in the temporal cortex. The mRNA production of *Lcn2*, *S100a10*, *Gbp2*, *Ptx3*, *Nlrp3*, *Il1b*, *Il1rn* and *Tgfb1* increased in all structures. Administration of anakinra reduced the gene expression of *Il1b*. Among the markers of microglia polarization, downregulation of *Arg1* expression in the dorsal hippocampus and *Nos2* expression in the temporal cortex was detected. Anakinra administration enhanced the decrease in *Nos2* expression and restored the level of *Arg1* expression to control values. Thus, anakinra administration did not affect the intensity of glial cell reactivation, but improved M2 reactivation of microglia.

Keywords: IL-1Ra, epileptogenesis, neuroinflammation, microglia polarization, astroglia polarization, TLE

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АКТИВИРОВАННЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ СТИМУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И КОРОТКОМ ГИПОКСИЧЕСКОМ
СТРЕССЕ *IN VITRO*

© 2024 г. О. В. Жидкова^{1,*}, Е. Р. Андреева^{1,**}, Л. Б. Буравкова^{1,***}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: flain-fish@yandex.ru

**E-mail: andreeva1564@gmail.com

*** E-mail: buravkova@imbp.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Мультipotентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) применяются для дополнительной терапии ишемических и воспалительных заболеваний. При системном введении трансмиграция МСК в ткани-мишени сопровождается взаимодействием с активированными эндотелиальными клетками (ЭК), выстилающими сосуды в участках повреждений. В настоящей работе изучали эффекты активированных ФНО- α эндотелиальных клеток на активность МСК при гипоксии разной степени выраженности. Для этого использовали модель краткосрочного контактного сокультивирования МСК и предварительно активированных ФНО- α эндотелиальных клеток. После взаимодействия с активированными ЭК МСК сохраняли свой стромальный фенотип, потенциал к мультилинейной дифференцировке. В то же время выявлено изменение экспрессии молекул межклеточного взаимодействия, которые участвуют в формировании контактов МСК с другими клетками, матриксом, а также регулируют деградацию внеклеточного матрикса (ВКМ) и клеточную миграцию. Кроме того, кондиционированная среда от активированного эндотелия увеличивала направленную и ненаправленную миграцию МСК. Взаимодействие усиливало паракринный ответ МСК и активированных ЭК за счет увеличения транскрипции и продукции ИЛ-6, ИЛ-8. В совокупности эти данные указывают на то, что краткосрочное взаимодействие с активированными ЭК способствует формированию миграционного фенотипа МСК, а также увеличивает продукцию плейотропных цитокинов и протеаз/ингибиторов протеаз, которые регулируют процессы репарации и ремоделирования ткани. При этом по сравнению с физиологическими для МСК условиями (5% O₂) острый гипоксический стресс (0.1% O₂, 24 ч) ослаблял стимулирующее действие эндотелия на МСК.

Ключевые слова: мультipotентные мезенхимальные стромальные клетки, эндотелиальные клетки, гипоксия, провоспалительная активация, сокультивирование

DOI: 10.31857/S0869813924030086, **EDN:** CPLWKK

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) представляют собой клетки, основными функциями которых считаются поддержание гомеостаза и репарация тканей как

путем дифференцировки в различные клеточные типы, так и за счет секреции факторов роста и цитокинов. Благодаря иммуноуклончивости для терапевтических целей можно использовать как аутологичные, так и аллогенные клетки [1, 2]. В настоящее время в ряде стран одобрено клиническое применение препаратов на основе МСК для дополнительной терапии различных заболеваний [2–4].

На функционирование МСК существенным образом влияет концентрация O_2 в окружающих тканях. МСК располагаются в тканях периваскулярно, в условиях «физиологической» гипоксии (от 3 до 10% O_2) [5, 6]. Культивирование МСК в условиях, близких к «физиологической» гипоксии, модулирует их важнейшие свойства, что способствует поддержанию их малодифференцированного состояния. *In vitro* продемонстрировано, что при 5% O_2 в популяции МСК выявляется больше клеток, способных давать клоны – колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-ф) при лимитирующей низкой плотности посадки. При стандартной плотности культивирования такие МСК быстрее пролиферируют, менее чувствительны к остео- и адипогенным дифференцировочным стимулам [5, 7].

С другой стороны, значительная депривация O_2 и увеличение содержания провоспалительных медиаторов могут выступать в качестве стимулов для вовлечения МСК в репаративное ремоделирование тканей. Показано, что краткосрочная депривация O_2 (1–72 ч, < 1% O_2) приводит к метаболическим изменениям, таким как усиление гликолиза [5, 8, 9], наблюдается реорганизация цитоскелета, стимуляция миграции [10, 11]. Кроме того, гипоксический стресс повышает секрецию паракринных факторов, которые оказывают трофическое действие на ткань, регулируя активность других клеток [10, 12, 13]. Установлено, что адаптивные изменения функциональных свойств МСК в ответ на гипоксический стресс могут быть обусловлены активацией HIF-1 α -зависимого сигнального пути [8, 14, 15].

Ряд доклинических и клинических исследований продемонстрировал, что применение МСК может улучшать прогноз при различных заболеваниях [16–19]. Показано, что после системной трансфузии МСК частично задерживаются в легких, что ограничивает попадание в другие ткани [20, 21]. Однако терапевтический эффект обусловлен тем, что циркулирующие по кровеносной системе МСК активно мигрируют через эндотелиальную стенку сосуда в поврежденный орган, клетки которого продуцируют медиаторы с хемотактическим действием [20–24]. В связи с этим внутрисосудистое введение МСК часто используется как метод доставки клеток в органы-мишени для терапевтических целей. Воспалительные цитокины (ФНО- α , IFN γ , интерлейкины и др.) не только служат хемоаттрактантами для МСК, но и активируют эпителиальные клетки (ЭК) сосудистой стенки. Активированные ЭК изменяют профиль продуцируемых растворимых медиаторов, а также экспрессируют молекулы адгезии, что необходимо для экстравазации МСК.

Конечные свойства МСК, используемых для терапии, зависят от параметров микроокружения, в которое они попадут. По мере миграции в область повреждения МСК столкнутся с активированными ЭК и гипоксией разной степени выраженности. Известно, что концентрация O_2 в среде влияет на свойства МСК, однако неизвестно, как изменится ответ при взаимодействии с ЭК. Хотя миграция МСК из сосудистого русла в ткань занимает несколько часов [19, 25, 26], даже непродолжительный контакт с эндотелием может повлиять на репаративные свойства стромальных клеток.

Известно, что взаимодействие *in vitro* МСК и ЭК в течение 24–72 ч индуцирует экспрессию генов миеогенной дифференцировки и способствует увеличению продукции ИЛ-6 [27–29]. Эти данные указывают на изменения функциональных свойств МСК, важных для участия в репарации ткани.

Цель настоящей работы заключалась в изучении эффектов провоспалительно активированных ЭК на МСК в условиях гипоксии разной степени выраженности.

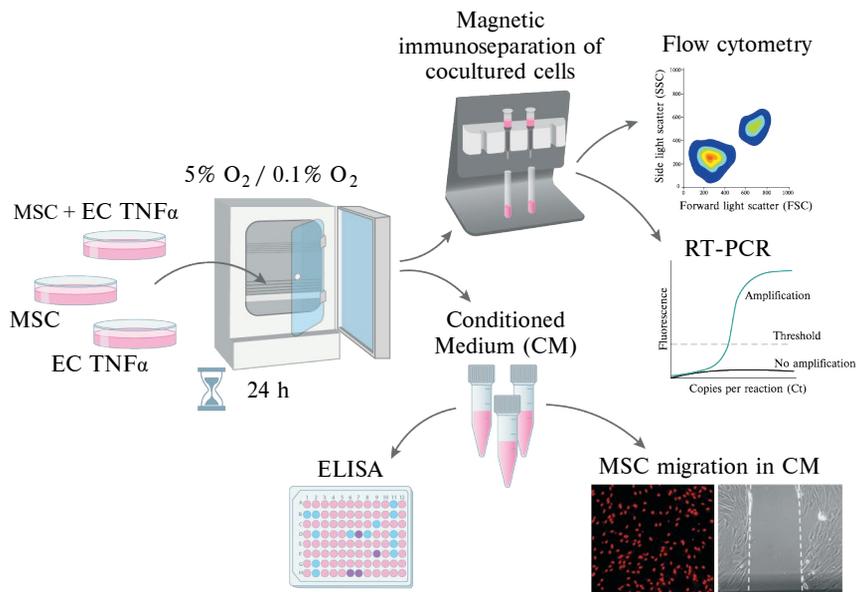


Рис. 1. Схема эксперимента по оценке эффектов взаимодействия мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение и культивирование МСК

Образцы МСК из жировой ткани человека были получены из коллекции Лаборатории клеточной физиологии Института медико-биологических проблем РАН. Культивирование МСК проводили на чашках Петри, используя полную ростовую среду α -MEM (Gibco, США), с добавлением 10% ФТС (HyClone, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 5% O_2 в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония), как описано ранее [30]. В экспериментах использовали клетки 3–6 пассажей.

Культивирование ЭК

ЭК из вены пупочного канатика были предоставлены Банком пуповинной крови Криоцентра (Москва, Россия) в рамках научного соглашения. ЭК культивировали в среде 199 с 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 25 мМ HEPES (Gibco, Life Technologies, США), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% ФТС (HyClone, США), 200 мкг/мл фактора роста эндотелиальных клеток (Sigma-Aldrich, США) при 20% O_2 в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония). После пассирования клетки культивировали на чашках Петри, покрытых 0.2%-ным раствором желатина в полной ростовой среде 199. В экспериментах использовали ЭК 3–5 пассажей. ЭК активировали с использованием ФНО- α (10 нг/мл) (Abcam, США) в течение 24 ч.

Схема эксперимента

Для оценки эффектов активированных ФНО- α ЭК на МСК при тканевых значениях O_2 использовали модель контактного сокультивирования в соответствии со схемой (рис. 1). ЭК активировали в состоянии предмонослоя, добавляя среду, содержащую 10 нг/мл ФНО- α на 24 ч. Далее клетки отмывали от среды с ФНО- α и добавляли су-

спензию МСК к активированным ЭК в соотношении 1:1. Культуральную среду меняли во всех чашках на свежую (α -МЕМ и 199 в соотношении 1:1) и инкубировали 24 ч. После этого сокультуры и монокультуры клеток трипсинизировали и анализировали экспрессию молекул адгезии методом проточной цитометрии. Клеточные сокультуры разделяли методом иммуносепарации с использованием микрочастиц, несущих CD31 антитела (Miltenyi biotec, США).

Проточная цитометрия

МСК были охарактеризованы по экспрессии минимального набора поверхностных маркеров в соответствии с рекомендациями Международного общества клеточной терапии [31]. Для анализа использовали первичные мышинные моноклональные антитела: CD45, CD73, CD90 и CD105 (IgG1) (Immunotech, Франция). В ЭК оценивали экспрессию ряда эндотелиальных маркеров CD144, CD106, CD62E, CD54 (Immunotech, Франция). В качестве отрицательного контроля (автофлуоресценция) использовали FITC- или PE-конъюгированные изотипические антитела IgG1 мыши (Immunotech, Франция).

Для оценки жизнеспособности клеток моно- и сокультуры отделяли с помощью трипсина и окрашивали с использованием набора Annexin V – FITC kit (Beckman Coulter, Франция).

Содержание активных форм кислорода (АФК) в клетках определяли с помощью красителя H_2DCFDA (Sigma, США) (ex/em ~492-495/517-527 нм) в концентрации 10 мкМ. Продукцию оксида азота (OA) определяли после окрашивания клеток 5мкМ раствором DAF-FM Diacetate (Sigma, США) (ex/em ~495/515 нм). Инкубация клеток в среде, содержащей зонд, проводилась 30 мин при 37°C в условиях 5 или 0.1% O_2 . Далее клетки открепляли при помощи трипсина и анализировали на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD Biosciences, США).

Подсчет КОЕ-ф

Колониеобразующая активность МСК оценивалась после посева клеток в низкой плотности на чашки Петри (100 клеток на чашку) диаметром 35 мм. Чашки инкубировали 14 дней, далее образцы фиксировали и окрашивали в течение 5 мин 0.5%-ным раствором кристалл-виолета в метаноле. Чашки с фиксированными клетками высушивали, затем окрашенные колонии подсчитывали.

Направленная миграция МСК

Для определения скорости направленной миграции МСК использовали модифицированную камеру Бойдена, где в качестве нижней камеры выступает ячейка 24-луночного планшета, а верхней камеры – ячейка-вставка (трансвелл, Corning) с полупроницаемой мембраной. В лунки планшета добавляли кондиционированную среду от ЭК, контролем служила ростовая среда для культивирования эндотелия. 20 тыс. клеток помещали в трансвеллы, далее планшеты инкубировали 24 ч в CO_2 -инкубаторе при 20% O_2 . Прикрепившиеся к мембране МСК фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали 30%-ным раствором йодида пропидия в фосфатном буферном растворе. Трансвелл помещали на предметное стекло, далее фотографировали 5 случайных полей зрения в режиме флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях с помощью программы ImageJ (Wayne Rasband, США) подсчитывали количество ядер, окрашенных йодидом пропидия.

Ненаправленная миграция МСК в модели «рана»

Скорость ненаправленной миграции МСК определяли в модели «рана». МСК выращивали до состояния монослоя, наносили «рану» путем механического повреждения и меняли среду для культивирования на кондиционированную среду от ЭК. Далее

чашки инкубировали 24 ч при 20% O_2 . На дне чашки Петри с МСК обозначали 5 случайных участков для фотографирования «раны». Состояние «раны» фотографировали сразу после нанесения механического повреждения (точка 0 ч) и через 24 ч с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-U. С использованием программы NIS-elements AR версии 3.21 (Nikon, Германия) подсчитывали площадь раны в нулевой точке и через 24 ч, по этим показателям оценивали подвижность МСК.

Определение концентрации цитокинов в среде культивирования

Паракринный ответ МСК и ЭК в монокультурах и после взаимодействия изучали путем анализа уровня цитокинов в кондиционированной среде методом иммуоферментного анализа (ИФА). После 72 ч сокультивирования кондиционированную среду собирали, затем определяли концентрации медиаторов с использованием наборов для ИФА IL-6, IL-8 и набора реагентов BD OptEIA™ (BD, США) в соответствии с инструкцией производителя.

ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии генов *RUNX2*, *SOX9*, *PPAR γ* , *IL6*, *IL8* клеточные культуры трипсинизировали. Сокультуру МСК и ЭК разделяли путем магнитной иммуносепарации. Далее выделяли мРНК с использованием Trizol (Qiagen, США). С использованием Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) на матрице мРНК синтезировали кДНК. Экспрессию генов производили методом ОТ-ПЦР на амплификаторе Mx3000P (Stratagene, США), используя праймеры к соответствующим генам (Qiagen). Для определения относительного значения изменения уровня экспрессии целевых генов в качестве контрольного гена использовали значения экспрессии гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*), транскрипция которого постоянна в различном уровне O_2 . Кратность изменения экспрессии генов рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (где Ct – номер порогового цикла).

Анализ профиля протеаз/ингибиторов, продуцируемых МСК

Для оценки белкового профиля МСК после сокультивирования с ЭК определяли содержание соответствующих ферментов в лизатах МСК с использованием наборов Human Protease Array/Human Inhibitor Array Kit (R&D Systems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Детекцию хемилюминесцентного сигнала проводили на приборе ChemiDoc MP (Biorad, США).

Статистический анализ

Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. В каждой группе сравнения количество образцов $n \geq 3$. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МСК в условиях депривации O_2

Прежде чем проводить сокультивирование с ЭК, в МСК охарактеризовали жизнеспособность, иммунофенотип и экспрессию генов, кодирующих белки, связанные с дифференцировкой, и продукцию плейотропных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8.

МСК как при 5, так и при 0.1% O_2 соответствовали минимальным критериям Общества по клеточной терапии [31]. Клетки прикреплялись к поверхности культурального пластика, а также характеризовались фибробластоподобной формой (рис. 2а). Кроме

Таблица 1. Экспрессия стромальных маркеров МСК

Антиген	Условия культивирования	
	5% O ₂	0.1% O ₂ , 24 ч
CD90	93.2–98.8 (96.0)	97.3–98.8 (98.1)
CD73	99.0–99.5 (99.3)	99.0–99.9 (99.5)
CD105	97.6–99.3 (98.5)	98.2–99.5 (98.9)
CD45	0.5–1.0 (0.8)	0.7–1.0 (0.9)

Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), $n \geq 4$.

того, независимо от уровня O₂ МСК экспрессировали стромальные маркеры (CD90, CD73, CD105) и не экспрессировали маркер гемопоэтических клеток (CD45) (табл. 1).

Независимо от содержания O₂ в среде культивирования МСК имели высокую жизнеспособность. При 5% O₂ жизнеспособность клеток составила 95.3–95.7%. Клетки в состоянии раннего апоптоза составили 1.3–2.1%, в состоянии позднего апоптоза – 1.2–1.6% от общего количества МСК в образцах. В условиях гипоксического стресса (0.1% O₂) МСК также демонстрировали высокий уровень жизнеспособности (95.4–96.8%), при этом доля клеток в состоянии раннего и позднего апоптоза составила 1.6–2.2% и 1.2–1.4% соответственно (рис. 2b). После воздействия гипоксического стресса МСК характеризовались в 1.3 раза более высокой продукцией АФК (H₂O₂) по сравнению с клетками, культивируемыми при 5% O₂ (рис. 2c). В условиях гипоксического стресса и при 5% O₂ уровень транскрипции генов-регуляторов дифференцировки *RUNX2*, *SOX9*, *PPAR γ* не отличался (рис. 2d). Оценка паракринной активности не выявила отличий в продукции ИЛ-8, однако продемонстрировала снижение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде от МСК при действии гипоксического стресса (рис. 2e).

ЭК при активации ФНО- α и депривации O₂

Также мы оценили влияние ФНО- α и депривации O₂ на экспрессию молекул межклеточного взаимодействия, жизнеспособность и продукцию активных форм кислорода в ЭК.

Неактивированные ЭК из пупочной вены демонстрировали эндотелиальный фенотип (рис. 3a). Клетки имели округлую и полигональную форму, формировали группы по 5–10 клеток при низкой плотности, сохраняли исходную жизнеспособность, экспрессировали высокий уровень VE-кадгерина и характеризовались низким уровнем VCAM-1, ICAM-1, E-селектина (рис. 3b; табл. 2).

Активированные ЭК были более вытянутыми (рис. 3a), при этом доля жизнеспособных клеток составила 88.1–95.1% при 5% O₂ и 91.6–93.2% при 0.1% O₂, что было сопоставимо с активированными ЭК при 20% O₂ (90.3–96.1%) (рис. 3b; табл. 2). Активация при различном содержании O₂ вызывала увеличение экспрессии маркера провоспалительной активации ICAM-1 в эндотелиальных клетках. Индукция экспрессии H₂O₂ наблюдалась при действии гипоксического стресса. Сочетанное действие ФНО- α и гипоксического стресса вызывало повышение уровня не только H₂O₂, но и NO (табл. 2).

Взаимодействие МСК и активированных ЭК при депривации O₂ различной степени

После взаимодействия с активированными ЭК при 5 и 0.1% O₂ МСК сохраняли стромальный фенотип: имели высокую экспрессию поверхностных стромальных мар-

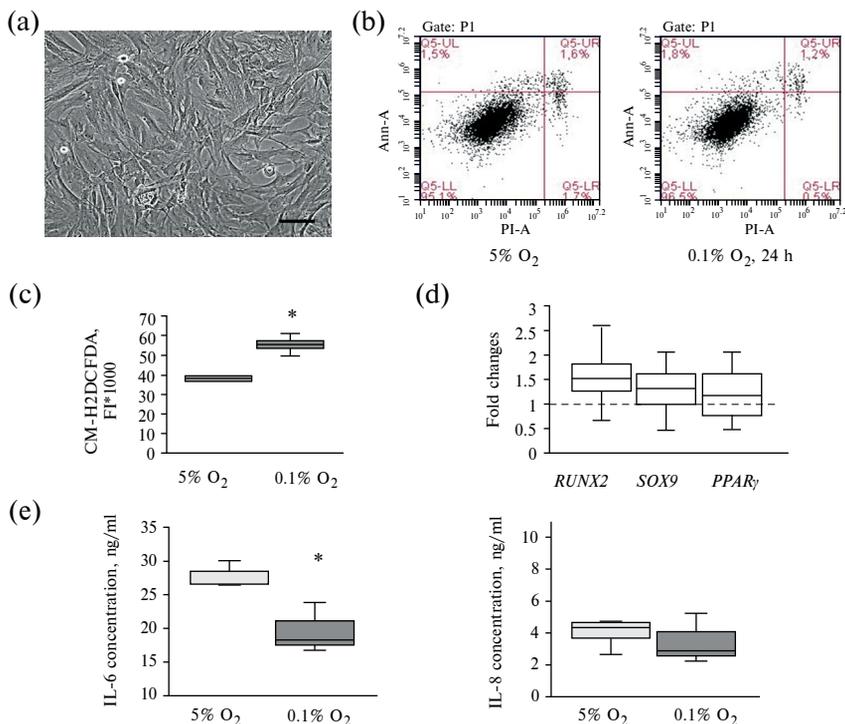


Рис. 2. Характеристика культивируемых МСК при различном содержании O₂. (a) – репрезентативная микрофотография культивируемых МСК при 5% O₂, масштабный отрезок 100 мкм; (b) – характеристика жизнеспособности МСК с применением флуоресцентных красителей аннексин/йодид пропидия (Ann/PI); представлены репрезентативные гистограммы (нижний левый квадрант – популяция живых клеток, верхний левый квадрант – клетки в состоянии раннего апоптоза, правый верхний квадрант – клетки в состоянии позднего апоптоза, нижний правый квадрант – клетки в состоянии некроза); (c) – продукция АДФК; (d) – экспрессия генов-регуляторов дифференцировки в МСК, представлена кратность изменения экспрессии генов по сравнению с монокультурой МСК при 5% O₂; (e) – продукция ИЛ-6, ИЛ-8 в МСК. На графиках представлена медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n \geq 4$, * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК, культивируемых при 5% O₂.

кером CD90, CD73, CD105 и не экспрессировали маркер CD45, характерный для гемопоэтических клеток (табл. 3), а также сохраняли исходное число КОЕ-ф (табл. 4).

Морфологический анализ показал, что через 24 ч после добавления МСК к эндотелиальному монослою наблюдалось распределение стромальных клеток между группами (кластерами) ЭК. Характер распределения клеток в сокультурах был схожим при различном уровне O₂ в среде (рис. 4а).

Для оценки влияния ЭК на мультилинейный дифференцировочный потенциал в МСК определяли уровень транскрипции генов-регуляторов хондрогенной (*SOX9*), остеогенной (*RUNX2*) и адипогенной (*PPARγ*) дифференцировок. После сокультивирования с активированными ЭК в МСК снижался уровень мРНК *SOX9* в условиях «физиологической» гипоксии в 2.5 раза, а после гипоксического стресса в 2 раза (рис. 4б, с). Экспрессия *RUNX2*, *PPARγ* существенно не изменялась.

Краткосрочное взаимодействие с активированным эндотелием приводило к значимому увеличению количества МСК, которые экспрессировали интегрин $\alpha 1$, $\alpha V\beta 3$, ICAM-1 и снижали количество клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 4$ и N-кадгерин

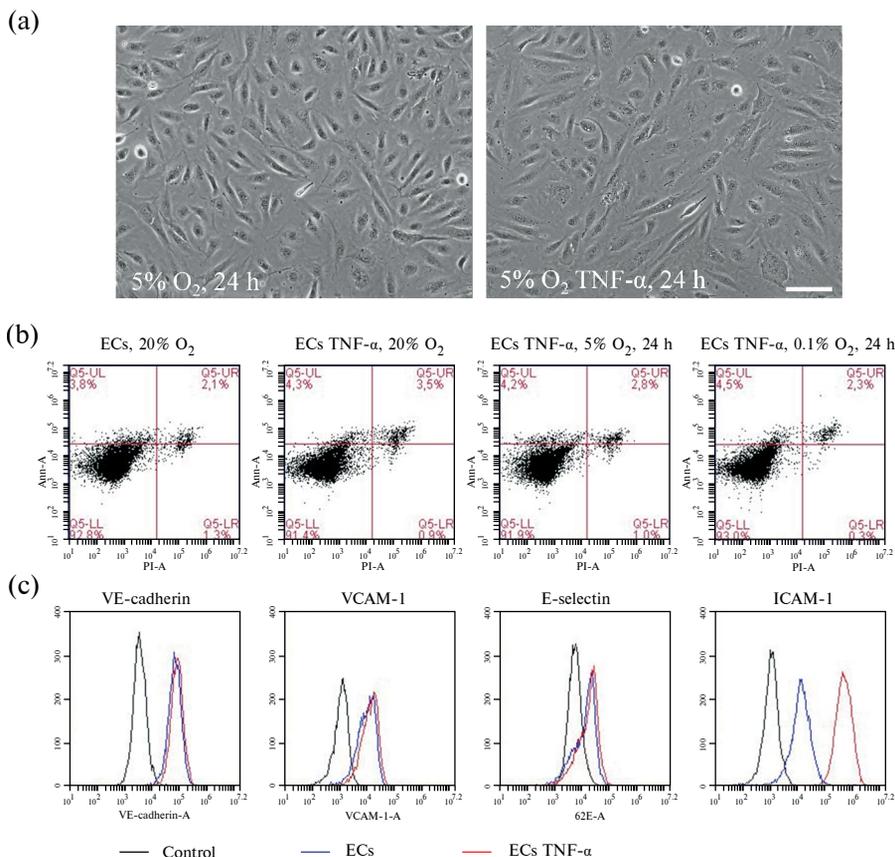


Рис. 3. Влияние активации ФНО- α и депривации O₂ на ЭК при различном уровне O₂. (a) – интактные и ФНО- α активированные ЭК после краткосрочного культивирования при 5% O₂, световая микроскопия, репрезентативные микрофотографии ЭК при 5% O₂, масштабный отрезок 100 мкм; (b) – жизнеспособность ЭК, представлены репрезентативные гистограммы (нижний левый квадрант – популяция живых клеток, верхний левый квадрант – клетки в состоянии раннего апоптоза, правый верхний квадрант – клетки в состоянии позднего апоптоза, нижний правый квадрант – клетки в состоянии некроза); (c) – экспрессия молекул адгезии на ЭК при различном уровне O₂, репрезентативные гистограммы при 5% O₂. ECs – интактные ЭК, ECs TNF- α – активированные ЭК, control – клетки, окрашенные изотипическими IgG1 антителами.

при «физиологической» гипоксии и при гипоксическом стрессе. Также изменялась средняя интенсивность флуоресценции окрашенных антителами интегринов $\alpha 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 4$, ICAM-1 и N-кадгерина. В условиях гипоксического стресса было отмечено возрастание средней интенсивности флуоресценции интегрин $\alpha 5$ на МСК в моно- и сокультуре по сравнению с культивируемыми клетками при «физиологической» гипоксии (рис. 5). Таким образом, после сокультивирования с ЭК при гипоксии разной степени (5, 0.1% O₂) наблюдалось изменение экспрессии молекул адгезии МСК, участвующих в образовании межклеточных контактов и контактов с компонентами внеклеточного матрикса.

Секреция паракринных факторов МСК и активированных ФНО- α ЭК изменялась при взаимодействии, о чем свидетельствовало увеличение концентрации плеiotропных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 в среде от сокультур. В условиях физиологической гипоксии уровень ИЛ-6 в кондиционированной среде вырос в 3.4 раза, а уровень ИЛ-8 – в 6.5

Таблица 2. Характеристика культивируемых ЭК в условиях депривации O₂ и активации ФНО-α

Единицы измерения	Показатель	Концентрация O ₂				
		20%	20→5%, 24 ч		20→0.1%, 24 ч	
		ЭК	ЭК	ЭК+ФНО	ЭК	ЭК+ФНО
% клеток	An/PI	90.0–94.3 (92.1)	88.6–93.4 (91.0)	85.0–90.0 (87.6)	91.1–95.8 (93.4)	90.0–93.0 (92.3)
ИФ*10 ³	VE-кадгерин	49.7–81.9 (51.7)	27.1–117.3 (55.5)	30.0–117.1 (54.0)	34.2–119.4 (41.2)	29.7–111.3 (49.8)
	VCAM-1	9.3–26.9 (17.3)	11.1–20.1 (15.1)	23.0–34.5 (28.3)	12.0–27.7 (19.8)	18.4–26.7 (18.6)
	ICAM-1	28.0–36.0 (31.7)	28.0–36.0 (31.7)	517.0–699.0 (620.1) *	27.8–28.8 (28.3)	578.8–755.9 (668.3) #
	E-селектин	18.8–25.4 (22.0)	25.5–30.1 (27.3)	30.0–32.3 (31.4)	20.9–23.2 (22.9)	27.3–29.6 (27.8)
АФК, отн. ед.	H ₂ O ₂	1	0.4–1.3 (0.8)	1.6–2.7 (2.2)	1.7–3.0 (2.4)*	5.1–8.7 (6.9) #
	NO	1	0.5–1.1 (0.9)	0.9–1.9 (1.4)	0.9–2.2 (1.7)	2.5–2.6 (2.5) #

ЭК – монокультура интактных ЭК, ЭК ФНО – ФНО-α активированные ЭК. В таблице представлены минимальное, максимальное значение и медиана (в скобках), n ≥ 3. В связи с отличиями в базовых значениях интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных зондом для детекции NO и H₂O₂, в таблице этот показатель представлен в относительных единицах по отношению к флуоресценции ЭК, постоянно культивируемых при 20% O₂. * – p < 0.05 по сравнению с ЭК 5% O₂, # – p < 0.05 по сравнению с ЭК 0.1% O₂. ИФ*10³ – интенсивность флуоресценции на клетку.

Таблица 3. Характеристика иммунофенотипа МСК после взаимодействия с активированными ЭК

Концентрация O ₂	CD90	CD73	CD105	CD44	CD45
5%	92.7–98.0 (95.4)	97.9–99.1 (98.5)	97.4–99.2 (98.3)	97.0–100.0 (99.9)	0.9–1.1 (1.0)
0.1%	93.2–98.0 (95.6)	96.0–99.0 (96.1)	98.3–99.2 (98.8)	99.0–100.0 (99.9)	0.2–1.5 (1.0)

Указана доля положительно окрашенных клеток. Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), n ≥ 4.

Таблица 4. Колониеобразующая способность МСК после взаимодействия с активированными ЭК

Параметр	МСК 5% O ₂	МСК+ЭК ФНО 5% O ₂	МСК 0.1% O ₂	МСК+ЭК ФНО 0.1% O ₂
КОЕ-ф	190–250 (205)	180–280 (200)	100–250 (170)	150–280 (215)

Указано количество колоний, образованных КОЕ-ф/1000 МСК. Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), n ≥ 3. МСК – монокультура МСК, МСК+ЭК ФНО – МСК после 24 ч сокультивирования с активированными ФНО-α ЭК.

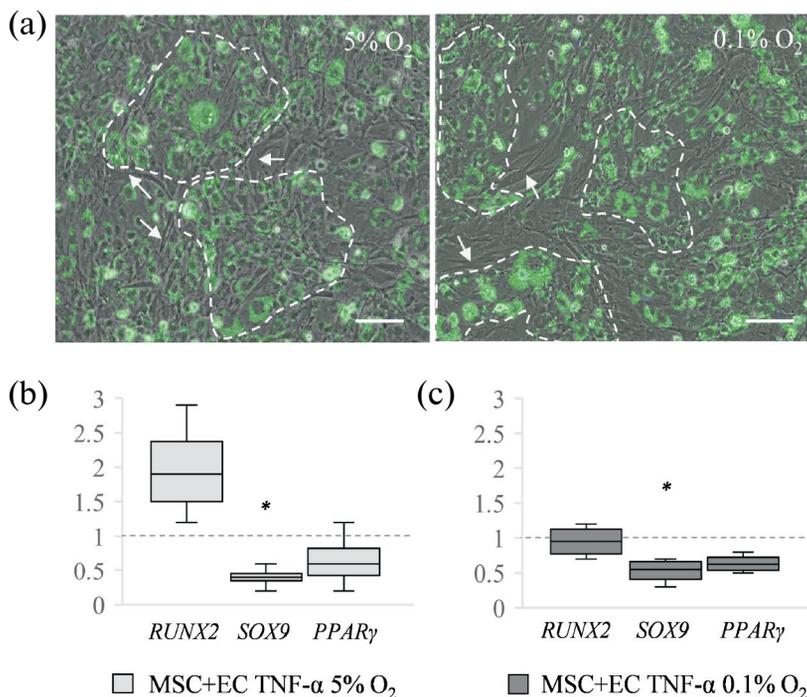


Рис. 4. Морфология и транскрипционный профиль МСК после взаимодействия с ЭК активированными ФНО- α . (а) – вид сокультуры через 24 ч при 5 и 0.1% O₂. Представлены репрезентативные изображения, полученные путем совмещения микрофотографий, сделанных в режиме фазового контраста и флуоресценции, эндотелиальные клетки окрашены флуоресцентным красителем PKH27. Масштабный отрезок равен 100 мкм. Стрелками указаны МСК; (б), (с) – экспрессия дифференцировочных генов МСК после взаимодействия с ЭК, активированными при пониженном содержании O₂. На графиках показана кратность изменения экспрессии генов в МСК после сокультивирования по сравнению с монокультурой МСК (пунктирная линия) в тех же условиях. Данные представлены как медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n \geq 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК, культивируемых при 5% O₂. MSC+EC TNF- α – МСК после 24 ч сокультивирования с активированными ФНО- α ЭК.

раз по сравнению со средой от монокультуры МСК. После действия краткосрочного гипоксического стресса продукция ИЛ-6 и ИЛ-8 в сокультуре увеличилась в 3.9 и в 8.7 раз соответственно по сравнению с монокультурой МСК (рис. 6а, б). Анализ экспрессии генов цитокинов в МСК и ЭК показал, что сокультивирование индуцировало возрастание уровня мРНК *IL6*, *IL8* в МСК и в активированных ЭК. Наблюдаемое возрастание экспрессии *IL8* в клетках после сокультивирования было более выраженным при действии гипоксического стресса (0.1% O₂, 24 ч). В этих же условиях возрастание экспрессии *IL6* в обоих типах клеток было менее выраженным (рис. 6с, d). Таким образом, сокультивирование индуцировало как транскрипцию генов *IL6* и *IL8*, так и продукцию этих цитокинов. Однако после гипоксического стресса в МСК и ЭК индукция транскрипции *IL8* усиливалась, а индукция *IL6* была не такой выраженной как при 5% O₂.

МСК способны мигрировать в ткани благодаря способности отвечать на хемотактические стимулы, продуцируемые находящимися там клетками. Для оценки влияния активированных ЭК на подвижность МСК мы проанализировали эффективность ненаправленной (в модели рана) и направленной (в системе трансвелл) миграции клеток в кондиционированной среде. При различном содержании кислорода

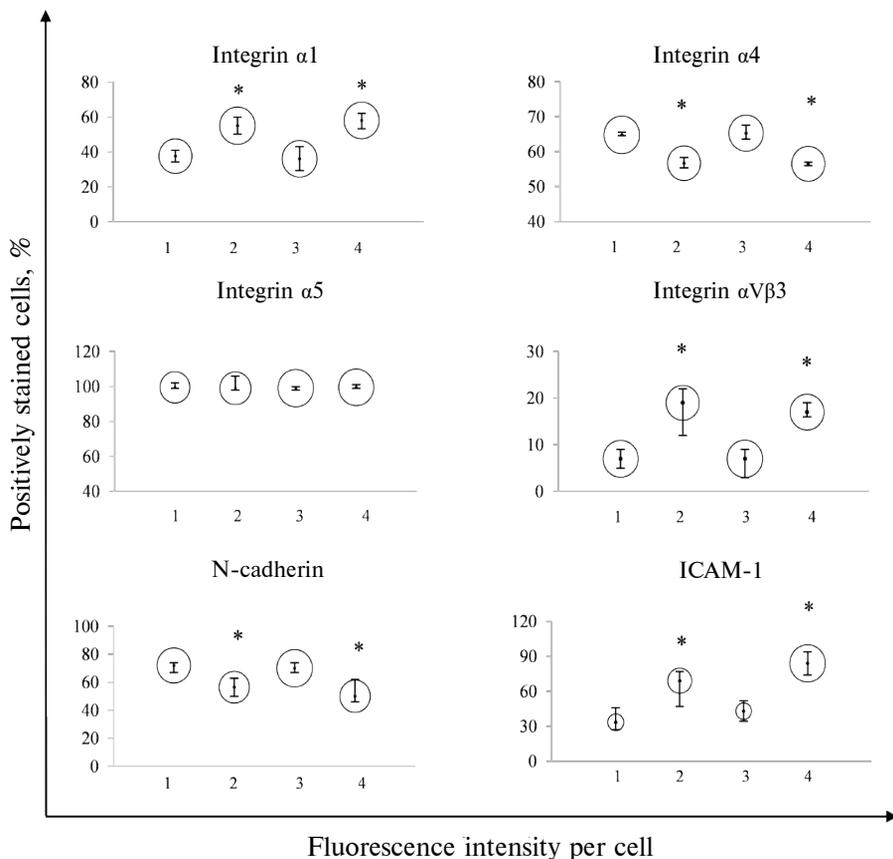


Рис. 5. Экспрессия молекул межклеточного взаимодействия МСК после сокультивирования с ФНО-α активированными ЭК. На графиках представлена доля положительно окрашенных МСК до и после взаимодействия с активированными ЭК (медиана, минимальное и максимальное значение). На этих же графиках размер пузырьков соответствует значению медианы интенсивности флуоресценции окрашенных клеток, $n \geq 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК в тех же условиях культивирования. 1 – МСК 5% O_2 , 2 – МСК после сокультивирования с ЭК 5% O_2 , 3 – МСК 0.1% O_2 , 4 – МСК после сокультивирования с ЭК 0.1% O_2 .

(5 и 0.1% O_2) среда, полученная от активированных ЭК, по сравнению с обычной средой культивирования увеличивала процент закрытия площади экспериментальной «раны» (рис. 7а, б). Кроме того, количество клеток, мигрировавших через трансвелл в кондиционированной среде, в 2.5–3 раза превышало количество МСК, которые мигрировали в ростовой среде (рис. 7с, d). Таким образом, кондиционированная среда, полученная после культивирования активированных ЭК при гипоксии разной степени выраженности, увеличивала скорость направленной и ненаправленной миграции МСК.

МСК могут участвовать в ремоделировании внеклеточного матрикса за счет продукции различных протеаз/ингибиторов протеаз. В условиях повреждения и провоспалительного микроокружения это свойство необходимо для вовлечения клеток в процессы репарации ткани [32–35]. Были определены концентрации 32 протеаз, таких как металлоэндопептидазы, протеиназы ADAMTS, катепсины, калликреиновые протеазы, металлопротеазы и урокиназы (рис. 8, табл. 5). Также были проанализированы уровни 32 белков, обладающих регуляторным действием в отношении протеаз: цистати-

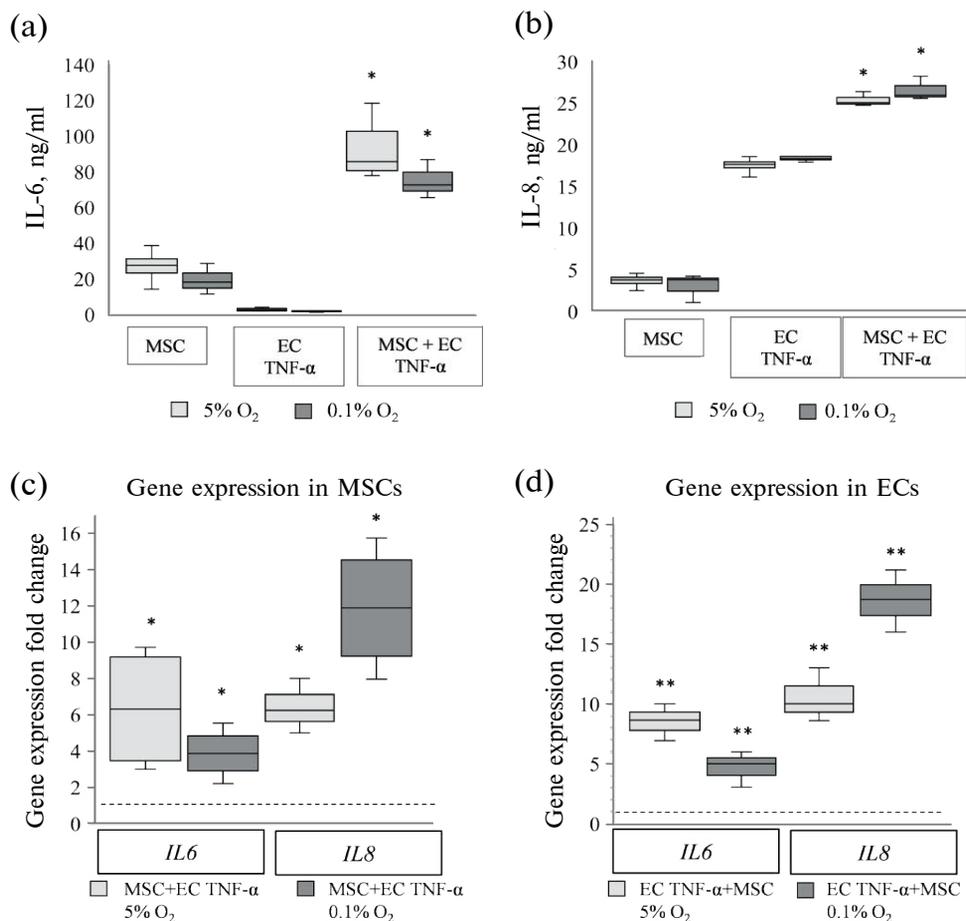


Рис. 6. Изменение паракринной активности ЭК и МСК после взаимодействия при пониженном содержании O₂. (a) – концентрация ИЛ-6 в среде от моно- и сокультур МСК и активированных ЭК; (b) – концентрация ИЛ-8 в среде от моно- и сокультур МСК и активированных ЭК; (c) – изменение экспрессии генов *IL6* и *IL8* в МСК; (d) – изменение экспрессии генов *IL6* и *IL8* в ЭК. На графиках представлена кратность отличий экспрессии генов интереса в МСК (c) и ЭК (d) после взаимодействия по сравнению с монокультурой клеток (пунктирная линия) в тех же условиях культивирования. Данные представлены как медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n = 3$, * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК в тех же условиях культивирования. ** – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой ЭК в тех же условиях культивирования. MSC+EC TNF- α – МСК после взаимодействия с активированными ЭК. EC TNF- α +MSC – активированные ЭК после взаимодействия с МСК.

нов, ингибиторов сериновых протеаз (НАИ), индуктора матричных металлопротеаз (EMMPRIN), серпинов, белков семейства Testican, Latexin, ингибиторов тканевого фактора, тканевых ингибиторов металлопротеаз (табл. 6).

Наши данные показали, что сокультивирование с активированными ЭК вызывало увеличение продукции протеаз, которые участвуют в деградации ВКМ и миграции клеток (ADAM8, Cathepsin B, Cathepsin V, MMP-2, ADAM9, ADAMTS1, Cathepsin A, Cathepsin C, Cathepsin D, Cathepsin X/Z/P, MMP-1, MMP-3, MMP-10, Urokinase), в 1.5 и более раз (табл. 5). В пользу потенциального увеличения протеолитической активности МСК также свидетельствует снижение уровня ингибитора матричных металло-

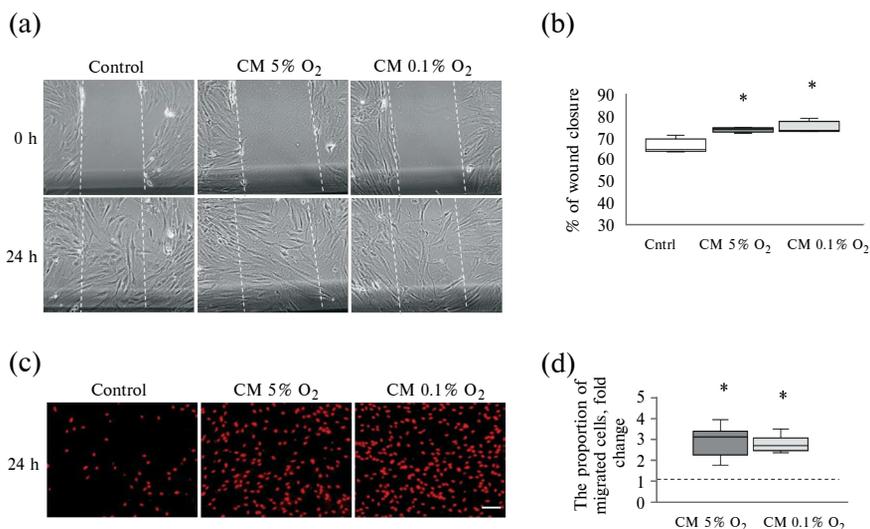


Рис. 7. Паракринное влияние ЭК на подвижность МСК. (а) – ненаправленная миграция МСК в модели «рана» в кондиционированной среде от активированных ЭК. Репрезентативные микрофотографии сразу после нанесения «раны» (0 ч) и через сутки (24 ч); (б) – площадь закрытия раны. На графике площадь закрытия представлена в % относительно изначальной площади раны; (с) – направленная миграция МСК через мембрану трансвелл в кондиционированной среде от активированных ЭК. Репрезентативные микрофотографии, сделанные через 24 ч инкубации клеток в лунках планшетов; (д) – на графике представлена доля клеток, мигрировавших за 24 ч (соотношение клеток, мигрировавших в кондиционированной среде от ЭК, по сравнению с количеством клеток, мигрировавших в ростовой среде). Данные представлены как медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n = 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с количеством клеток, мигрировавших в ростовой среде (Cntrl). CM 5% O₂ – кондиционированная среда от активированных ЭК, культивируемых при 5% O₂. CM 0.1% O₂ – кондиционированная среда от активированных ЭК, культивируемых при 0.1% O₂.

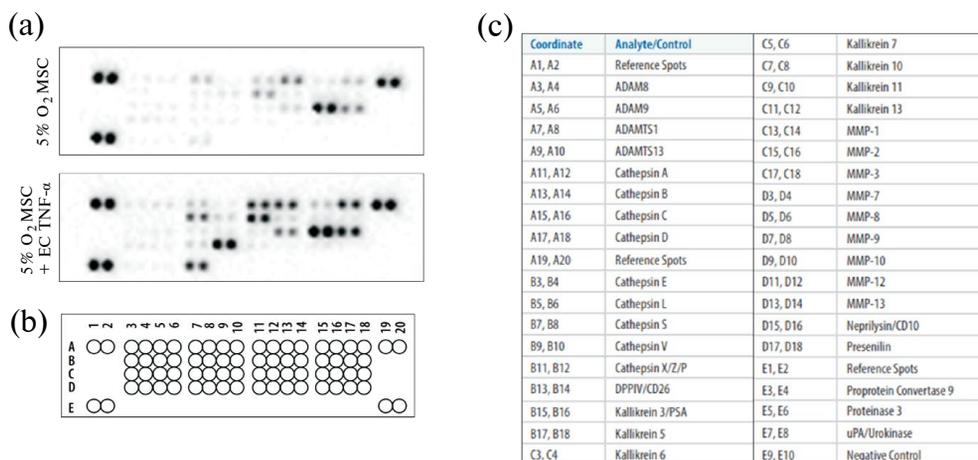


Рис. 8. Определение уровня протеаз в лизатах МСК до и после 24 ч сокультивирования с ЭК активированными ФНО-α. (а) – репрезентативные фотографии мембран; (б), (с) – схема расположения и названия детектирующих антител к различным протеазам.

Таблица 5. Влияние ФНО- α активированных ЭК на продукцию протеаз в МСК

Название протеазы	5% O ₂ МСК	5% O ₂ МСК + ЭК	0.1% O ₂ МСК	0.1% O ₂ МСК + ЭК
ADAMTS1	22.4–28.2 (25.3)	58.7–69.1 (63.9)*	27.4–27.6 (27.5)	75.2–78.6 (76.9)**
Cathepsin A	30.1–35.5 (32.8)	70–129.8 (99.9)*	40.0–48.0 (44.0)	93.4–162.6 (128.0)**
Cathepsin B	59.1–65.3 (62.2)	102.0–103.0 (102.5)*	75.8–76.8 (76.3)	77.6–78.0 (77.8)
Cathepsin C	7.8–9.2 (8.5)	24.7–25.9 (25.2)*	7.6–8.8 (8.2)	11.5–14.7 (13.1)
Cathepsin D	23.9–32.1 (28.0)	100.0–103.4 (101.7)*	36.3–37.5 (36.9)	97.7–117.3 (107.7)**
Cathepsin X/Z/P	35.6–45.6 (40.6)	89.8–136.4 (113.1)*	41.4–49.6 (45.5)	45.6–82.2 (64.0)**
MMP-1	14.3–15.5 (14.9)	52.9–54.7 (53.8)*	11.8–13.8 (12.8)	42.1–43.1 (42.6)**
MMP-2	138.1–173.3 (155.7)	233.6–242.2 (237.9)*	268.0–291.0 (279.5)	231.4–249.8 (240.6)**
MMP-3	61.2–78.4 (69.8)	132.6–153.8 (143.2)*	54.6–80.2 (67.4)	69.3–93.7 (81.5)
MMP-10	4.1–7.1 (5.6)	145.9–175.3 (160.6)*	3.6–5.6 (4.6)	154.6–176.6 (165.6)**
Urokinase	12.4–14.2 (13.3)	78.4–92.6 (85.5)*	8.5–9.5 (9.0)	61.5–76.5 (69.0)**

Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), $n = 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 5% O₂; ** – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 0.1% O₂, 24 ч.

протеаз широкого спектра действия TIMP-1 в 1.9 раза и возрастание уровня индуктора активности различных металлопротеаз EMMPRIN/CD147. Наблюдалось повышение продукции и других белков с регуляторной активностью в отношении протеаз APP/Protease Nexin II, Latexin, Serpin E1/PAI-1, Testican 1/SPOCK1, Cystatin B, Serpin B6, TFPI, TFPI-2 (табл. 6). В условиях гипоксического стресса профиль продуцируемых протеаз и ингибиторов в МСК после сокультивирования с ФНО-активированными ЭК отличался от такового при «физиологической» гипоксии. Наблюдалась отмена увеличения продукции некоторых протеаз (ADAM8, Cathepsin B, Cathepsin X/Z/P, MMP-3) (табл. 5) и антипротеаз (Serpin E1/PAI-1, Serpin F1/PEDF) (табл. 6). При этом продукция Serpin B8 возрастала, а TIMP-2 снижалась в МСК. Таким образом, взаимодействие с эндотелиальными клетками стимулировало секрецию протеаз МСК, однако в условиях значительной кислородной депривации (0.1% O₂) наблюдалось ослабление этого эффекта.

Таблица 6. Влияние сокультивирования с ФНО- α активированными ЭК на продукцию белков-регуляторов протеаз в МСК

Название белка-регулятора	5% O ₂ МСК	5% O ₂ МСК + ЭК	0.1% O ₂ МСК	0.1% O ₂ МСК + ЭК
APP/Protease Nexin II	97.4–101.0 (99.2)	131.3–251.4 (191.3)*	93.8–101.8 (97.8)	174.4–185.7 (180.1)**
Cystatin B	40.4–55.8 (48.0)	144.4–150.9 (147.6)*	41.8–46.5 (44.1)	157.5–179.3 (168.0)**
EMMPRIN/ CD147	47.7–67.9 (57.8)	121.5–132.3 (126.9)*	45.1–46.7 (45.9)	137.6–174.4 (156.1)**
Serpin B6	59.3–65.1 (62.2)	114.9–143.7 (129.3)*	34.7–42.1 (38.4)	112.1–129.5 (120.8)**
Serpin B8	90.9–102.1 (96.5)	92.6–103.2 (98.0)	43.2–58.4 (50.8)	186.8–202.2 (194.5)**
Serpin E1/PAI-1	104.1–108.5 (106.3)	158.7–179.3 (169.0)*	125.9–183.5 (154.8)	114.8–138.2 (126.5)
Testican 1/ SPOCK1	130.9–136.9 (133.9)	254.1–256.1 (255.1)*	138.2–144.6 (141.4)	244.8–245.8 (245.3)**
TFPI	31.3–31.7 (31.5)	107.1–110.7 (108.9)*	26.6–31.2 (28.9)	114.3–115.1 (114.8)**
TFPI-2	54.5–62.1 (58.3)	282.2–356.2 (319.2)*	40.6–40.8 (40.7)	352.2–366.4 (359.3)**
TIMP-1	194.3–226.7 (210.5)	94.5–122.5 (108.1)*	134.6–143.8 (139.2)	117.5–121.1 (119.3)
TIMP-2	193.5–211.9 (202.7)	205.8–214.2 (210.0)	259.0–272.6 (265.8)	134.9–149.1 (142.1)**

Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), $n = 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 5% O₂; ** – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 0.1% O₂, 24 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведена оценка функциональных свойств МСК после краткосрочного сокультивирования с активированными ЭК при физиологической гипоксии (5%) и гипоксическом стрессе O₂ (0.1%).

Мы обнаружили, что сами по себе МСК и ЭК демонстрируют устойчивость к действию краткосрочной депривации O₂. При контактном взаимодействии активированные ЭК не влияли на стромальный фенотип и мультилинейный дифференцировочный потенциал МСК, при этом происходило изменение экспрессии молекул межклеточной адгезии, продукции растворимых медиаторов и протеаз в МСК. Модулирующее действие краткосрочного гипоксического стресса выражалось преимущественно в изменении экспрессии генов *IL6*, *IL8* по сравнению с условиями физиологической гипоксии (5% O₂).

Предварительный этап включал оценку возможных неблагоприятных эффектов гипоксического стресса (0.1% O₂, 24 ч) на МСК и ЭК, а также провоспалительной активации ФНО- α на ЭК. МСК демонстрировали высокую устойчивость к депривации O₂. Предполагается, что изменения, которые помогают клеткам адаптироваться к гипоксическому стрессу, вызваны работой антиоксидантных систем, возрастанием активности транскрипционного фактора NIF и транзиторным увеличением экспрессии *HIF1A*, *HIF3A* [8, 14, 15, 36–38].

Анализ эффектов ФНО- α и кислородной депривации разной степени выраженности на ЭК показал, что краткосрочное воздействие физиологической гипоксии (5% O₂) и активация ФНО- α в этих условиях существенно не влияли на исследуемые параметры ЭК по сравнению с культивированием клеток при стандартных условиях (20% O₂). ЭК демонстрировали морфологические и иммунофенотипические признаки активации при действии ФНО- α , что сопоставимо с полученными ранее экспериментальными данными [39, 40]. На фоне краткосрочной кислородной депривации (0.1% O₂, 24 ч) наблюдались признаки окислительного стресса (\uparrow H₂O₂), а совместно с действием ФНО- α выраженность этих признаков усиливалась (\uparrow H₂O₂ \uparrow NO). Увеличение продукции эндогенных АФК может быть связано с ингибирующим действием NO на фермент каталазу, функция которого заключается в деактивации H₂O₂ [41, 42]. Возможно, устойчивость ЭК к действию краткосрочного гипоксического стресса и ФНО- α обусловлена активацией сигнального пути NF κ B и возрастанием активности NIF, что помогает клеткам адаптироваться к стрессовым факторам среды [43].

Анализ эффектов межклеточного взаимодействия при пониженном содержании O₂ показал, что после краткосрочного контакта с активированными ЭК МСК не отличались от монокультуры клеток по клоногенной активности, экспрессии стромальных маркеров, также отсутствовали признаки коммитирования, судя по экспрессии генов-регуляторов дифференцировки, что может свидетельствовать в пользу сохранения статуса малокоммитированных предшественников. Ранее было показано, что МСК сохраняют мультилинейный потенциал несмотря на длительное взаимодействие с ЭК [28], что согласуется с нашими данными.

В настоящей работе оценивались эффекты ЭК на экспрессию поверхностных молекул МСК, которые участвуют в регуляции межклеточной адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток [44, 45]. Взаимодействие вызывало снижение экспрессии белка гомотипических межклеточных контактов (N-кадгерина) и интегрин α 4 в МСК. При этом увеличивалось количество клеток, экспрессирующих молекулы, которые участвуют в миграции и формировании гетероклеточных контактов МСК-ЭК, МСК-иммунные клетки (интегрин α 1 и α V β 3, ICAM-1) [46, 47]. Гипоксический стресс способствовал усилению индукции ICAM-1 в МСК после взаимодействия с активированными ЭК. Как показано для некоторых клеточных линий, в гипоксических условиях (1% O₂, 24 ч) происходит протеасомная деградация белка I κ B, который является цитоплазматическим ингибитором NF κ B. Известно, что активация сигнального пути NF κ B индуцирует экспрессию ICAM-1, что может объяснять наблюдаемые изменения [48].

Терапевтическое применение МСК напрямую связано с их способностью мигрировать в поврежденные органы по градиенту цитокинов с хемотактическим действием [21, 24]. В настоящем исследовании мы оценили изменение потенциала к направленной и ненаправленной миграции МСК в кондиционированной среде от активированных ЭК. Наблюдаемое нами увеличение подвижности МСК в модели направленной и ненаправленной миграции свидетельствует о мобилизации МСК в ответ на факторы, продуцируемые активированными ЭК.

МСК оказывают трофическое действие на ткань за счет продукции различных цитокинов и факторов роста. Опубликованные ранее экспериментальные данные демонстрируют, что при взаимодействии стромальных и эндотелиальных клеток изме-

нялась транскрипция генов некоторых паракринных медиаторов МСК, однако данные о влиянии ЭК на секреторный профиль МСК практически не представлены [49, 50]. В настоящем исследовании представлены новые данные о том, что сокультивирование МСК и активированных ЭК индуцирует не только транскрипцию, но и продукцию цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8. Известно, что VEGF путем связывания с рецептором VEGFR2 усиливает транскрипцию генов *IL6* и *IL8* в ЭК с помощью протеинкиназы D1 [51]. Можно предположить, что VEGF-опосредованные сигнальные пути способствовали усилению экспрессии генов *IL6* и *IL8* в совместно культивируемых МСК и ЭК, поддерживая повышенную продукцию этих интерлейкинов.

Протеазы участвуют во многих физиологических процессах, таких как репарация ткани, ангиогенез, иммунный ответ, свертывание крови [52–54]. Баланс секретируемых протеаз и их ингибиторов непосредственно контролирует высвобождение связанных форм цитокинов и факторов роста, способствует образованию «путей» для миграции клеток, опосредует иммунный ответ, что влияет на заживление ран и формирование новых сосудов (тканевой гомеостаз/репаративные процессы в ткани) [55–57].

Анализ белкового профиля сокультивируемых МСК показал возрастание протеолитической активности МСК за счет продукции белков, которые индуцируют локально опосредованную деградацию компонентов ВКМ и миграцию МСК, таких как матриксные металлопротеазы (ММП-1, -2, -3, -10), катепсины, урокиназа. Формирование миграционного фенотипа МСК связано с работой матриксных металлопротеаз, и ЭК являются индукторами активности этих ферментов [58, 59]. Продемонстрировано, что кондиционированная среда от ЭК повышает уровни ММП-1, ММП-3 и скорость миграции МСК [33]. Также известно, что ММП-2 положительно влияет на трансэндотелиальную миграцию МСК. В то же время уменьшение трансэндотелиальной миграции МСК связано с ингибированием ММП-2 и возрастанием экспрессии TIMP-3 [60]. Ries и соавт. показали, что подавление ММП-2 или TIMP-2 снижает клеточную подвижность, в то время как подавление экспрессии TIMP-1, наоборот, активизирует клеточную подвижность [61]. Катепсины участвуют в неспецифической деградации ВКМ и процессинге цитокинов, хемокинов и клеточных рецепторов. Показано, что катепсины А, В, D стимулируют миграцию различных типов клеток, в том числе МСК [62–65].

Избыточная продукция клетками протеолитических ферментов, которые деградируют ВКМ, может неблагоприятно отражаться на восстановлении поврежденного органа. Однако регуляция процесса деградации ВКМ осуществляется за счет белковых регуляторов, которые ингибируют или стимулируют действие различных протеаз.

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеаз (TIMP) являются регуляторами функциональной активности соответствующих ферментов. В организме TIMPs контролируют ремоделирование матрикса при регенерации различных тканей [59, 66]. Наблюдаемое нами снижение продукции ингибитора металлопротеаз широкого спектра действия TIMP-1 и возрастание продукции Emmpin (индуктор внеклеточной матриксной металлопротеазы), индуцирующего активность металлопротеаз, наряду с возрастанием продукции ММП-1, -2, -3, -10 может свидетельствовать в пользу увеличения протеолитической активности МСК. Вместе с этим наблюдалась индукция экспрессии белков, которые оказывают ингибирующее действие на подвижность МСК, таких как PAI-1, nexin-1, cystatin B, TFPI, после взаимодействия с активированными ЭК [67–69].

В настоящем исследовании мы также проанализировали влияние значительной депривации O_2 , характерной для ишемического повреждения ткани, на взаимодействие ЭК и МСК.

В условиях гипоксического стресса многие эффекты эндотелия на МСК были подобны таковым при «физиологической» гипоксии (рис. 9). Среди отличий можно

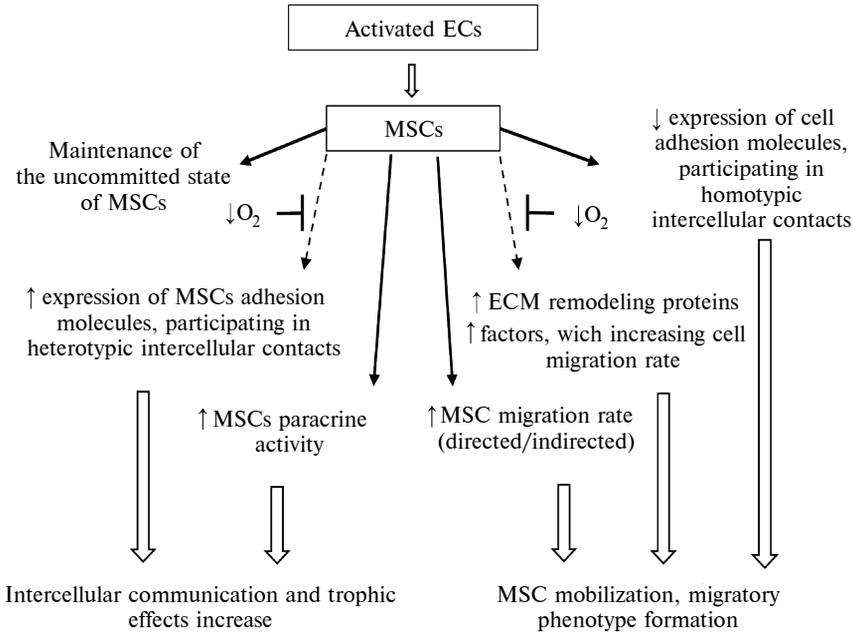


Рис. 9. Эффекты гипоксического стресса на взаимодействие активированных ЭК и МСК.

отметить увеличение экспрессии интегрин $\alpha 5$ как в моно-, так и в сокультуре, значительное увеличение экспрессии ICAM-1 на МСК после взаимодействия с активированными ЭК, что может указывать на потенцирующее действие кислородной депривации на экспрессию некоторых молекул межклеточного взаимодействия. Ранее показано, что краткосрочная кислородная депривация (1–2% O_2 , 24 ч) приводит к возрастанию экспрессии интегрин $\alpha 5$ на поверхности МСК из костного мозга [70, 71], что согласуется с нашими результатами. Увеличение экспрессии ICAM-1 наблюдается при поляризации МСК в провоспалительный фенотип, что связано с активацией TLR4 или действием воспалительных цитокинов (ФНО- α , ИФН γ , ИЛ-1 β) [72]. ЭК могут синтезировать ИЛ-1 α , который обладает ИЛ-1 β -подобным действием (относится к провоспалительным цитокинам), а при гипоксии его секреция увеличивается [73], что может обуславливать потенцирующее влияние гипоксического стресса на экспрессию ICAM-1 в МСК при взаимодействии с ЭК.

При гипоксическом стрессе, как и при «физиологической» гипоксии, концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 в среде после сокультивирования МСК и активированных ЭК значительно возрастали. Кроме того, мы наблюдали, что сокультивирование клеток в условиях гипоксического стресса индуцировало экспрессию гена *IL8* и ослабляло усиление экспрессии *IL6* в МСК и ЭК по сравнению с «физиологической» гипоксией. Также гипоксический стресс отменял увеличение продукции протеаз, стимулирующих клеточную миграцию, таких как катепсины, MMP-3, TIMP-2, что может непосредственно влиять на подвижность МСК.

Таким образом, мы наблюдали изменение экспрессии поверхностных молекул, ответственных за миграцию МСК и образование гомо- и гетероклеточных контактов, а также возрастание скорости миграции МСК, что свидетельствует об увеличении подвижности клеток. Более высокий уровень транскрипции и трансляции провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и активация продукции протеолитических белков может свидетельствовать в пользу усиления межклеточной коммуникации и ремоде-

лирования внеклеточного матрикса. При этом краткосрочная депривация O_2 (0.1% O_2 , 24 ч) частично отменяла индукцию экспрессии *IL6* и некоторых протеаз и ингибиторов протеаз при взаимодействии МСК и ЭК.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Е. Р. А., О. В. Ж.), проведение экспериментов, сбор и обработка данных (О. В. Ж.), написание и редактирование манускрипта (Е. Р. А., О. В. Ж., Л. Б. Б.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Программы фундаментальных исследований Института медико-биологических проблем РАН (тема 65.3 и FMFR-2024-0032). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН, протокол № 550МСК от 22 июля 2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Caplan AI, Correa D* (2011) The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* 9: 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.008>
2. *Squillaro T, Pehuso G, Galderisi U* (2016) Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 25: 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
3. *Galipeau J, Sensébé L* (2018) Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 22: 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>
4. *Fernández-Garza LE, Barrera-Barrera SA, Barrera-Saldaña HA* (2023) Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. *Pharmaceuticals* 16: 1334. <https://doi.org/10.3390/ph16091334>
5. *Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B* (2014) Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion* 19: 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>
6. *Egger D, Lavrentieva A, Kugelmeier P, Kasper C* (2022) Physiologic isolation and expansion of human mesenchymal stem/stromal cells for manufacturing of cell-based therapy products. *Eng Life Sci* 22: 361–372. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100097>
7. *Choi J-W, Shin S, Lee CY, Lee J, Seo H-H, Lim S, Lee S, Kim I-K, Lee H-B, Kim SW, Hwang K-C* (2017) Rapid Induction of Osteogenic Markers in Mesenchymal Stem Cells by Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells. *Cell Physiol Biochem* 44: 53–65. <https://doi.org/10.1159/000484582>
8. *Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R* (2010) Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal CCS* 8: 18. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-18>
9. *Moniz I, Ramalho-Santos J, Branco AF* (2022) Differential Oxygen Exposure Modulates Mesenchymal Stem Cell Metabolism and Proliferation through mTOR Signaling. *Int J Mol Sci* 23: 3749. <https://doi.org/10.3390/ijms23073749>
10. *Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA* (2008) Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26: 2173–2182. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1104>

11. *Udartseva OO, Lobanova MV, Andreeva ER, Buravkov SV, Ogneva IV, Buravkova LB* (2016) Acute Hypoxic Stress Affects Migration Machinery of Tissue O₂-Adapted Adipose Stromal Cells. *Stem Cells Int* 2016: 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2016/7260562>
12. *Busletta C, Novo E, Valfrè Di Bonzo L, Povero D, Paternostro C, Ievolella M, Mareschi K, Ferrero I, Cannito S, Compagnone A, Bandino A, Colombatto S, Fagioli F, Parola M* (2011) Dissection of the Biphasic Nature of Hypoxia-Induced Motogenic Action in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 29: 952–963.
<https://doi.org/10.1002/stem.642>
13. *Wang Q, Li X, Wang Q, Xie J, Xie C, Fu X* (2019) Heat shock pretreatment improves mesenchymal stem cell viability by heat shock proteins and autophagy to prevent cisplatin-induced granulosa cell apoptosis. *Stem Cell Res Ther* 10: 348.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1425-4>
14. *Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M* (2011) Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci* 88: 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.023>
15. *Andreeva ER, Lobanova MV, Udartseva OO, Buravkova LB* (2014) Response of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Tissue-Related O₂ Microenvironment to Short-Term Hypoxic Stress. *Cells Tissues Organs* 200: 307–315.
<https://doi.org/10.1159/000438921>
16. *Caplan AI* (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213: 341–347.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21200>
17. *Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y* (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* 34: 747–754.
<https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>
18. *Lu L, Xu A, Gao F, Tian C, Wang H, Zhang J, Xie Y, Liu P, Liu S, Yang C, Ye Z, Wu X* (2022) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a Novel Strategy for the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Front Cell Dev Biol* 9: 770510.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.770510>
19. *Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria De La Torre R, Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez A, Molina-Leyva A, Arias-Santiago S* (2021) Biodistribution of Mesenchymal Stromal Cells after Administration in Animal Models and Humans: A Systematic Review. *J Clin Med* 10: 2925.
<https://doi.org/10.3390/jcm10132925>
20. *Becker AD, Riet IV* (2016) Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* 8: 73.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>
21. *Szydłak R* (2021) Biological, chemical and mechanical factors regulating migration and homing of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 13: 619–631.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.619>
22. *Leibacher J, Dauber K, Ehser S, Brixner V, Kollar K, Vogel A, Spohn G, Schäfer R, Seifried E, Henschler R* (2017) Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice. *Cytotherapy* 19: 61–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.010>
23. *Zachar L, Bačenková D, Rosocha J* (2016) Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J Inflamm Res* 9: 231–240.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S121994>
24. *Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J* (2017) Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells* 35: 1446–1460.
<https://doi.org/10.1002/stem.2614>
25. *Teo GSL, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, Dvorak AM, Karp JM, Carman CV* (2012) Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and Directly Through Tumor Necrosis Factor- α -Activated Endothelial Cells Via Both Leukocyte-Like and Novel Mechanisms. *Stem Cells* 30: 2472–2486.
<https://doi.org/10.1002/stem.1198>
26. *Guo Y-C, Chiu Y-H, Chen C-P, Wang H-S* (2018) Interleukin-1 β induces CXCR3-mediated chemotaxis to promote umbilical cord mesenchymal stem cell transendothelial migration. *Stem Cell Res Ther* 9: 281.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-1032-9>

27. *Merfeld-Clauss S, Lupov IP, Lu H, Feng D, Compton-Craig P, March KL, Traktuev DO* (2014) Adipose Stromal Cells Differentiate Along a Smooth Muscle Lineage Pathway Upon Endothelial Cell Contact via Induction of Activin A. *Circ Res* 115: 800–809.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304026>
28. *Lin C-H, Lilly B* (2014) Endothelial Cells Direct Mesenchymal Stem Cells Toward a Smooth Muscle Cell Fate. *Stem Cells Dev* 23: 2581–2590.
<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0163>
29. *Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, Zhao G, Ma Z* (2015) Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 6: 55.
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5>
30. *Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhambalova AP, Kozionova MP* (2009) Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under lower oxygen tension. *Cell Tissue Biol* 3: 23–28.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X09010039>
31. *Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
32. *Tondreau T, Meuleman N, Stamatoopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejefneffe M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L* (2009) In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy* 11: 559–569.
<https://doi.org/10.1080/14653240903051541>
33. *Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS* (2014) Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol* 34: 132–143.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.003>
34. *Beloglazova IB, Zubkova ES, Tsokolaeva ZI, Stafeev YuS, Dergilev KV, Ratner EI, Shestakova MV, Sukhareva OYu, Parfenova EV, Menshikov MYu* (2016) Regulatory Effects of Urokinase on Mesenchymal Stromal Cell Migration, Proliferation, and Matrix Metalloproteinase Secretion. *Bull Exp Biol Med* 161: 775–778.
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3507-y>
35. *Wei L, Xu Y, Zhang L, Yang L, Zhao RC, Zhao D* (2023) Mesenchymal Stem Cells Promote Wound Healing and Effects on Expression of Matrix Metalloproteinases-8 and 9 in the Wound Tissue of Diabetic Rats. *Stem Cells Dev* 32: 25–31.
<https://doi.org/10.1089/scd.2021.0218>
36. *Lee JA, Kim BI, Jo CH, Choi CW, Kim E-K, Kim H-S, Yoon K-S, Choi J-H* (2010) Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatr Res* 67: 42–46.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181bf594b>
37. *Pogodina MV, Buravkova LB* (2014) Expression of hypoxia-associated genes in multipotent mesenchymal stromal cells during long-term cultivation at low oxygen. *Dokl Biol Sci* 458: 310–312.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614050056>
38. *Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Camacho-Cardenosa M, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Casado-Díaz A* (2022) Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J Stem Cells* 14: 453–472.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i7.453>
39. *Fontani F, Domazetovic V, Marcucci T, Vincenzini MT, Iantomasi T* (2016) Tumor Necrosis Factor-Alpha Up-Regulates ICAM-1 Expression and Release in Intestinal Myofibroblasts by Redox-Dependent and -Independent Mechanisms: ICAM-1 Expression and Release in 18C o Cells. *J Cell Biochem* 117: 370–381.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25279>
40. *Li M, Van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ* (2018) Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 831: 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.003>
41. *Sigfrid LA, Cunningham JM, Beeharry N, Lortz S, Tiedge M, Lenzen S, Carlsson C, Green IC* (2003) Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *J Mol Endocrinol* 31: 509–518.
<https://doi.org/10.1677/jme.0.0310509>

42. *Bauer G* (2015) Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. *Redox Biol* 6: 353–371.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.017>
43. *Mussbacher M, Salzman M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, Hohensinner P, Basilio J, Petzelbauer P, Assinger A, Schmid JA* (2019) Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol* 10: 85.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00085>
44. *Frith JE, Mills RJ, Hudson JE, Cooper-White JJ* (2012) Tailored Integrin–Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells Dev* 21: 2442–2456.
<https://doi.org/10.1089/scd.2011.0615>
45. *Steward AJ, Kelly DJ* (2015) Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat* 227: 717–731.
<https://doi.org/10.1111/joa.12243>
46. *Huttenlocher A, Horwitz AR* (2011) Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005074–a005074.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005074>
47. *Becerra-Bayona SM, Guiza-Arguello VR, Russell B, Höök M, Hahn MS* (2018) Influence of collagen-based integrin α_1 and α_2 mediated signaling on human mesenchymal stem cell osteogenesis in three dimensional contexts. *J Biomed Mater Res A* 106: 2594–2604.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36451>
48. *Winning S, Spletstoesser F, Fandrey J, Frede S* (2010) Acute Hypoxia Induces HIF-Independent Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through Increased Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression: The Role of Hypoxic Inhibition of Prolyl Hydroxylase Activity for the Induction of NF- κ B. *J Immunol* 185: 1786–1793.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903244>
49. *Thin Luu N, Mcgettrick HM, Buckley CD, Newsome PN, Ed Rainger G, Frampton J, Nash GB* (2013) Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells Leads to Downregulation of Cytokine-Induced Leukocyte Recruitment. *Stem Cells* 31: 2690–2702.
<https://doi.org/10.1002/stem.1511>
50. *Bartaula-Brevik S* (2017) Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *Int J Stem Cell Res Ther* 4.
<https://doi.org/10.23937/2469-570X/1410045>
51. *Hao Q, Wang L, Tang H* (2009) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *Am J Physiol-Cell Physiol* 296: C821–C827.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00504.2008>
52. *Guillamat-Prats R* (2022) Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Coagulation. *Int J Mol Sci* 23: 10393.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810393>
53. *Lund LR, Green KA, Stoop AA, Ploug M, Almholt K, Lilla J, Nielsen BS, Christensen IJ, Craik CS, Werb Z, Danø K, Rømer J* (2006) Plasminogen activation independent of uPA and tPA maintains wound healing in gene-deficient mice. *EMBO J* 25: 2686–2697.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601173>
54. *Rundhaug JE* (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267–285.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x>
55. *McCarty SM, Percival SL* (2013) Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care* 2: 438–447.
<https://doi.org/10.1089/wound.2012.0370>
56. *Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S* (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22: 526–539.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
57. *Habič A, Novak M, Majc B, Lah Turnšek T, Breznik B* (2021) Proteases Regulate Cancer Stem Cell Properties and Remodel Their Microenvironment. *J Histochem Cytochem* 69: 775–794.
<https://doi.org/10.1369/00221554211035192>
58. *Brauer PR* (2006) MMPs-Role in Cardiovascular Development and Disease. *Front Biosci* 11: 447.
<https://doi.org/10.2741/1810>
59. *Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, Ode A, Tuischer J, Matziolis G, Perka C, Duda GN* (2007) Matrix Metalloprotease Activity Is an Essential Link Between Mechanical Stimulus and Mesenchymal Stem Cell Behavior. *Stem Cells* 25: 1985–1994.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0676>

60. *De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, Van Riet I* (2007) Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 92: 440–449.
<https://doi.org/10.3324/haematol.10475>
61. *Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P* (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109: 4055–4063.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-051060>
62. *Tong B, Wan B, Wei Z, Wang T, Zhao P, Dou Y, Lv Z, Xia Y, Dai Y* (2014) Role of cathepsin B in regulating migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes into inflamed tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 177: 586–597.
<https://doi.org/10.1111/cei.12357>
63. *Vangala G, Imhoff FM, Squires CML, Cridge AG, Baird SK* (2019) Mesenchymal stem cell homing towards cancer cells is increased by enzyme activity of cathepsin D. *Exp Cell Res* 383: 111494.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.07.007>
64. *Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B* (2019) Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells* 8: 264.
<https://doi.org/10.3390/cells8030264>
65. *Park S, Huang H, Kwon W, Kim H, Park J, Han JE, Cho G, Han S, Sung Y, Ryoo ZY, Kim MO, Choi S* (2021) Cathepsin A regulates pluripotency, proliferation and differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Biochem Funct* 39: 67–76.
<https://doi.org/10.1002/cbf.3554>
66. *Mott JD, Werb Z* (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558–564.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.010>
67. *Stefansson S, Lawrence DA* (1996) The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha\beta 3$ binding to vitronectin. *Nature* 383: 441–443.
<https://doi.org/10.1038/383441a0>
68. *Richard B, Pichon S, Arocas V, Venisse L, Berrou E, Bryckaert M, Jandrot Perrus M, Bouton MC* (2006) The serpin protease nexin-1 regulates vascular smooth muscle cell adhesion, spreading, migration and response to thrombin. *J Thromb Haemost* 4: 322–328.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01710.x>
69. *Provençal M, Michaud M, Beaulieu É, Ratel D, Rivard G-É, Gingras D, Béliveau R* (2008) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins. *Thromb Haemost* 99: 576–585.
<https://doi.org/10.1160/TH07-10-0623>
70. *Saller MM, Prall WC, Docheva D, Schönitzer V, Popov T, Anz D, Clausen-Schaumann H, Mutschler W, Volkmer E, Schieker M, Polzer H* (2012) Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 379–385.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.134>
71. *Choi JH, Lee YB, Jung J, Hwang SG, Oh I-H, Kim GJ* (2016) Hypoxia Inducible Factor-1 α Regulates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Integrin α_4 . *Stem Cells Int* 2016: 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2016/7932185>
72. *Ren G, Roberts AI, Shi Y* (2011) Adhesion molecules: Key players in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adhes Migr* 5: 20–22.
<https://doi.org/10.4161/cam.5.1.13491>
73. *Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang X-F* (2013) An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol* 6: 61.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>

Activated Endothelium Changes The Activity Of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells During Physiological Hypoxia Or Short Hypoxic Stress *In Vitro*

O. V. Zhidkova^{a, *}, E. R. Andreeva^{a, **}, and L. B. Buravkova^{a, ***}

^a*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**e-mail: flain-fish@yandex.ru*

** *e-mail: andreeva1564@gmail.com*

*** *e-mail: buravkova@imbp.ru*

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are used for supplemental therapy of ischemic and inflammatory diseases. After systemic administration, transmigration of MSCs to the target tissue is accompanied by interaction with activated endothelial cells (ECs) at the site of injury. In this study, we investigated the influence of TNF- α -activated ECs on the functions of MSCs under different levels of hypoxia. For this purpose, MSCs and TNF- α activated ECs were cocultured in a direct cell-to-cell setting for a short period of time. MSCs retained their stromal phenotype and multilineage differentiation potential after interaction with activated ECs. At the same time, changes in molecules involved in MSC-cell and MSC-extracellular matrix interaction were detected. The paracrine activity of MSCs and activated ECs after interaction was demonstrated by both upregulated transcription and increased levels of pleiotropic IL-6 and IL-8. Proteases/antiproteases profiles were also altered after interaction. These data suggest that short-term interaction of MSCs with activated ECs may play an important role in tissue repair and remodeling processes. In particular, it may promote the migratory phenotype of MSCs. In comparison to physiological hypoxia – 5% O₂, acute hypoxic stress (0.1% O₂, 24 h) attenuated the stimulatory effects of ECs on MSCs.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, endothelial cells, hypoxia, proinflammatory activation, cocultivation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ХОЛОДА НА АДРЕНОРЕАКТИВНОСТЬ ВЕРХНЕЙ
БРЫЖЕЕЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ**

© 2024 г. В. Н. Ярцев^{1,*}

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

* *E-mail: yartsevv@infran.ru*

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

После доработки 31.12.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

В опытах на сегментах верхней брыжеечной артерии (ВБА) крысы в изометрических условиях изучалось влияние холода на реактивность этой артерии, оцениваемую по величине сократительной реакции ее сегментов на норадреналин (НА) в концентрации 0.01–10.0 мкМ, а также на стимуляцию периваскулярных нервов электрическим полем с частотой 3, 10 и 40 Гц как при отсутствии, так и при наличии НА в среде и температуре 37°C или 25°C. Было обнаружено, что охлаждение не изменяет тонус ВБА, вызванный НА при всех использованных нами концентрациях. В отсутствие и на фоне действия НА в низкой концентрации (0.01–0.10 мкМ) охлаждение вызывает значительное уменьшение нейрогенного ответа ВБА при всех частотах электростимуляции (ЭС), в то время как на фоне НА в высокой концентрации (1–10 мкМ) охлаждение не оказывает статистически значимого действия на этот ответ. На фоне НА в низкой концентрации охлаждение при низких частотах ЭС не оказывает влияния на незначительное изменение нейрогенного ответа ВБА под действием данного гормона, а при высокой частоте существенно уменьшает потенцирующее действие НА на этот ответ. НА в высокой концентрации в условиях нормальной температуры оказывает угнетающее действие на нейрогенное сокращение при всех частотах ЭС, в то время как в условиях охлаждения при низких частотах оказывает на него потенцирующее, а при высокой частоте ЭС угнетающее действие. Полученные результаты показывают, что наблюдаемое при низкой и исчезающее при высокой концентрации НА угнетающее действие холода на нейрогенную констрикцию ВБА крысы, а также на потенцирование НА нейрогенной вазоконстрикции не связано с уменьшением сократительного действия НА, являющегося основным нейромедиатором в этой артерии.

Ключевые слова: верхняя брыжеечная артерия, нейрогенная констрикция, норадреналин, холод

DOI: 10.31857/S0869813924030096, **EDN:** CPGHHZ

ВВЕДЕНИЕ

Такой фактор внешней среды, как холод, с которым живым организмам приходится часто встречаться, особенно в северных широтах, может значительно и по-разному изменять реактивность различных кровеносных сосудов [1, 2]. Большинство исследований на эту тему проводилось на поверхностно расположенных сосудах (см. обзоры [3, 4]), которые в большей степени подвержены действию данного фактора. Однако при патологической, а также при терапевтической гипотермии, которая у человека ис-

пользуется в лечебных целях [5, 6], холод могут испытывать и глубоко расположенные кровеносные сосуды. Тем не менее работы по выяснению действия холода на реактивность этих сосудов крайне немногочисленны. В частности, на брыжеечных сосудах исследования на эту тему были проведены в единичных работах на собаках [1], кроликах [7] и крысах [8, 9]. Имеются также две работы на подвздошной артерии крысы [2, 10]. Следует заметить, что влияние холода на нейрогенный тонус глубоко расположенных кровеносных сосудов изучалось только в работах Yamamoto и соавт., причем в них проводилась перфузия всех сосудов брыжейки. Как известно, нейрогенный тонус сосудов может значительно изменяться в зависимости от концентрации норадреналина [11–13], уровень которого существенно повышается в различных стрессорных ситуациях, включая действие холода [14, 15]. Однако сведения об изменении нейрогенного тонуса глубоко расположенных сосудов на фоне действия норадреналина в условиях холода отсутствуют. Учитывая все вышесказанное, мы провели данное исследование, целью которого было изучить влияние холода на вызванный норадреналином, а также нейрогенный тонус изолированной брыжеечной артерии крысы при разной концентрации норадреналина в среде.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на самцах крыс линии Вистар массой тела 150–200 г, полученных из Центра коллективного пользования Биокolleкция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Эвтаназию животных осуществляли посредством CO_2 . После эвтаназии отпрепарировали верхнюю брыжеечную артерию (ВБА), от которой отрезали кольцевой участок длиной 1.2 мм, надеваемый на две вольфрамовые иглолочки (диаметром 70 мкм каждая), одна из которых была соединена со штоком устройства растяжения, а вторая – с механотроном 6MX1C, сигнал от которого, отражающий изменение натяжения в стенке сосудистого сегмента, усиливался и поступал на вольтметр самопишущий S-Recorder-L (ADSlab, Россия), а далее на ПК для обработки в программе S-Recorder (ADSlab, Россия). Наличие функционального эндотелия в наших методических условиях при работе на верхней брыжеечной артерии крысы было показано нами ранее при действии ацетилхолина на эту артерию, предсокращенную фенилэфрином [16]. Иголочки с кольцевым участком помещали в проточную термостатируемую (37 °C) ванночку объемом 10 мл, заполненную бикарбонатным раствором Кребса следующего состава (в mM): NaCl – 115, KCl – 4.7, CaCl_2 – 2.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.2, NaHCO_3 – 25, KH_2PO_4 – 1.2, глюкоза – 10. pH раствора поддерживали на уровне 7.4 ± 0.05 в течение всего эксперимента, проводя измерения каждые 15 мин с помощью pH-метра pH-150MA и, в случае необходимости, пропуская через раствор соответствующее количество CO_2 или комнатного воздуха. После погружения в раствор иглолочки миографа ступенчато разводили до значения натяжения, при котором наблюдался максимальный ответ сосудистого сегмента на стимуляцию электрическим полем (30 В, 3 мс, в течение 3 с) с частотой 10 Гц, после чего с интервалом 3 мин проводили стимуляцию с частотой 3 и 40 Гц. Электростимуляция (ЭС) осуществлялась с помощью двух платиновых электродов, расположенных на расстоянии 2 мм от сосудистого сегмента. В течение последующих 30 мин сосуд стимулировали через каждые 3 мин с частотой 10 Гц, а по прошествии 30 мин с интервалом 3 мин проводили стимуляцию с частотой 3 и 40 Гц, после чего на термостате выставляли значение температуры 25°C. Температура раствора в ванночке с сосудом снижалась с 37°C до 25°C за 10 мин. От каждого животного брали один сосудистый сегмент. Контрольная серия экспериментов ($n = 11$, где n – количество животных) отличалась от опытной ($n = 7$) только отсутствием изменения температуры. В течение последующих 60 мин, необходимых для стабилизации ответа на ЭС после смены температурного режима термостата, сосуд стимулировали через

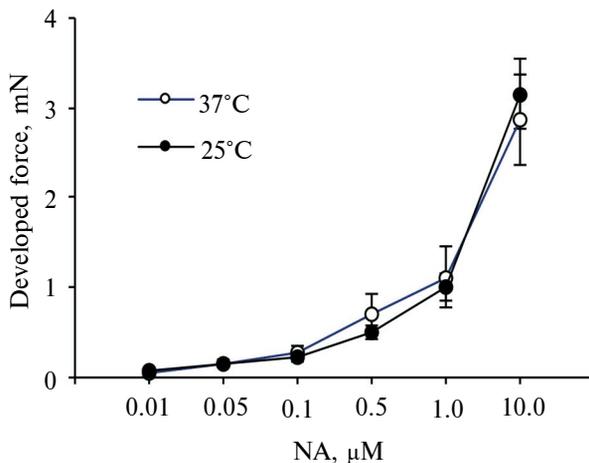


Рис. 1. Величина тонического напряжения, развиваемого сегментом верхней брыжеечной артерии крысы в ответ на введение норадреналина (NA) в концентрации 0.01–10.0 мкМ при температуре 37°C ($n = 11$) и 25°C ($n = 7$).

каждые 3 мин с частотой 10 Гц, а по прошествии 60 мин вводили норадреналин битартрат (Merck, Германия), концентрацию которого кумулятивно увеличивали от 0.01 до 10 мкМ (в ванночке). Перед введением норадреналина после стимуляции с частотой 10 Гц проводили стимуляцию с частотой 3 и 40 Гц, затем ЭС прекращалась, а после достижения максимального (для каждой данной концентрации норадреналина) значения тонического напряжения стенки сосуда проводили серию стимуляций с частотой 10, 3 и 40 Гц с интервалом 3 мин. Ранее в опытах с применением тетродотоксина (0.1 мкМ) нами было показано, что в наших методических условиях при указанных параметрах ЭС сокращение сосуда происходит преимущественно за счет раздражения его периваскулярных нервов, судя по отсутствию сократительного ответа на ЭС после добавления тетродотоксина в перфузионный раствор [17].

При статистическом анализе результатов использовали программу Statistica v. 12. Оценку нормальности распределения выборок проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Вследствие нормальности распределения полученные данные представляли в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий реакций сосуда определяли, применяя однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони при последующем *post-hoc* анализе. Кроме того, проводился линейный корреляционный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было обнаружено, что охлаждение не изменяет сократительную реакцию на норадреналин при всех использованных нами концентрациях (рис. 1). В частности, реакция на норадреналин, наблюдавшаяся при его максимальной концентрации 10.0 мкМ, составляла при температуре 37°C и 25°C 2.9 ± 0.5 и 3.1 ± 0.4 мН ($p > 0.05$) соответственно.

Понижение температуры приводило к значительному уменьшению нейрогенного сократительного ответа на ЭС как в отсутствие норадреналина, так и при его наличии в концентрации 0.01–0.1 мкМ при всех использованных нами частотах ЭС (рис. 2). Однако при высоких концентрациях норадреналина, равных 0.5–10.0 мкМ для частоты

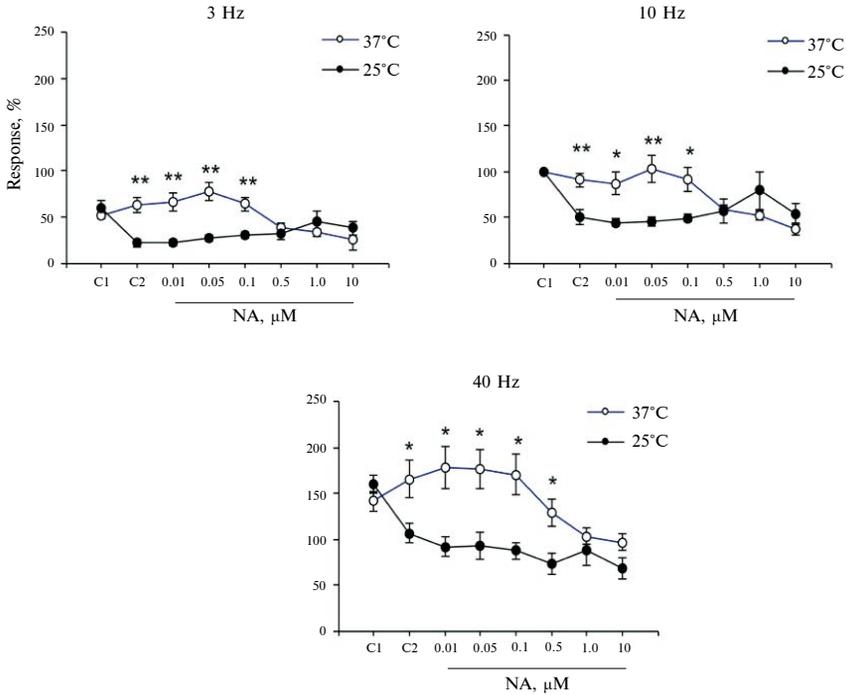


Рис. 2. Сократительная реакция сегмента верхней брыжеечной артерии на электростимуляцию с частотой 3, 10 и 40 Гц через 5–10 мин (C1) и 90 мин (C2) после растяжения этого сегмента в контроле (C), а также на фоне действия норадреналина (NA) при температуре 37°C ($n = 11$) и 25°C ($n = 7$). Для серии с охлаждением данные в точке C1 получены при температуре 37°C, а в точке C2 через 60 мин после начала холодного воздействия. Результаты выражены в % к первоначальной величине сокращения на электростимуляцию с частотой 10 Гц через 5–10 мин после растяжения сегмента. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ при сравнении с соответствующей точкой кривой для 25°C.

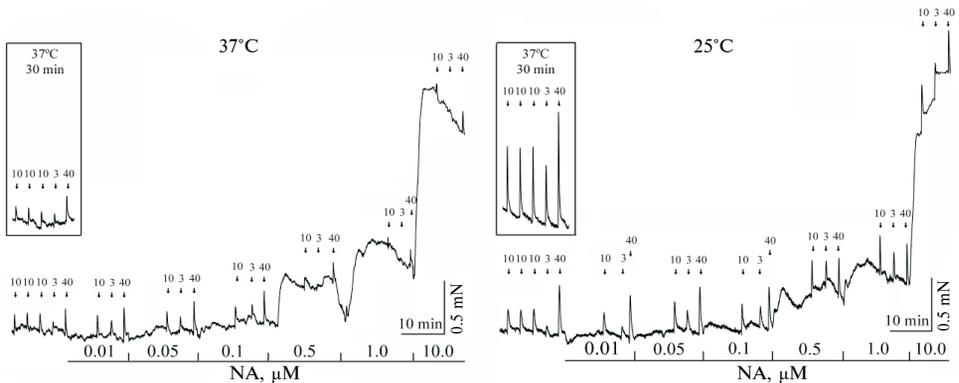


Рис. 3. Оригинальная запись изменения напряжения сегмента верхней брыжеечной артерии в ответ на электростимуляцию (отмечена стрелками) с частотой 3, 10 и 40 Гц до, а также на фоне действия норадреналина (NA) при температуре 37°C и 25°C. На врезках показана величина реакции на электростимуляцию при температуре 37°C через 30 мин после растяжения сегмента.

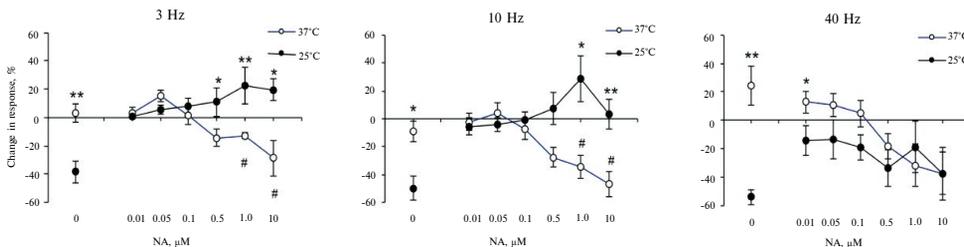


Рис. 4. Изменение сократительной реакции сегмента верхней брыжеечной артерии на электростимуляцию с частотой 3, 10 и 40 Гц через 90 мин после растяжения этого сегмента в контроле (0), а также на фоне действия норадrenalина (NA) при температуре 37°C ($n = 11$) и 25°C ($n = 7$). Результаты выражены в % изменения реакции (в контроле – по сравнению с первоначальной величиной, а на фоне действия NA – по сравнению с величиной реакции непосредственно перед его введением). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ при сравнении с соответствующей точкой кривой для 37°C. # $p < 0.05$ при сравнении с NA 0.05 мкМ при температуре 37°C.

3 и 10 Гц и 1.0–10.0 мкМ для частоты 40 Гц, величина нейрогенного сократительного ответа при охлаждении не изменялась, причем для низких частот ЭС наблюдалась даже тенденция увеличения этого ответа (рис. 2 и 3). Оригинальные записи опытов, приведенные на рис. 3, показывают существенное снижение величины нейрогенного сокращения под действием холода по сравнению с имевшейся непосредственно перед началом охлаждения и отсутствие какого-либо значительного влияния охлаждения на динамику сократительного ответа, вызванного как норадrenalином, так и ЭС.

С целью более наглядного отображения направления (угнетающего/потенцирующего) действия норадrenalина на нейрогенную констрикцию на основании данных, представленных на рис. 2, были построены графики, отражающие изменение величины нейрогенного ответа артерии после введения норадrenalина (рис. 4), которые позволяют оценить и сравнить влияние этого гормона на нейрогенную сократительную реакцию сосуда при разной температуре.

Из этих графиков видно, что холод, существенно уменьшая нейрогенный ответ брыжеечной артерии в отсутствие норадrenalина, не оказывает влияния на незначительное изменение этого ответа под действием низких концентраций данного гормона (0.01–0.1 мкМ) и частоте ЭС, равной 3 и 10 Гц. В то же время при высоких концентрациях (0.5–10.0 мкМ) норадrenalина влияние холода становится существенным: при таких концентрациях норадrenalин в условиях нормальной температуры значительно угнетает нейрогенную реакцию сосуда (о чем, в частности, свидетельствует статистически значимое отличие отрицательных значений изменения реакции на ЭС с частотой 3 и 10 Гц при последних двух концентрациях норадrenalина по сравнению с положительными значениями, составлявшими при концентрации норадrenalина 0.05 мкМ 15.0 ± 4.2 и $3.8 \pm 7.5\%$ соответственно), а в условиях низкой температуры при частоте ЭС, равной 3 и 10 Гц, ее увеличивает (потенцирует), причем угнетение и потенцирование коррелировало с концентрацией норадrenalина в соответствующем диапазоне. Коэффициент корреляции Пирсона (r), рассчитанный для оценки корреляционной связи между изменением реакции на ЭС и концентрацией норадrenalина, при частоте ЭС 3 и 10 Гц в условиях нормальной температуры в диапазоне концентраций 0.1–10 мкМ был отрицательным и составлял -0.412 ($p < 0.01$) и -0.414 ($p < 0.01$), а в условиях низкой температуры в диапазоне концентраций 0.01–1.0 мкМ был положительным и составлял 0.399 ($p < 0.05$) и 0.455 ($p < 0.01$) соответственно. Таким образом, между этими величинами имеется умеренная статистически значимая корреляционная связь, которая в условиях нормальной температуры была отрицательной, а в условиях низкой температуры – положительной. При частоте ЭС, равной 40 Гц, в условиях нормальной температуры и низкой концентрации гормона наблюдалось потенцирующее действие

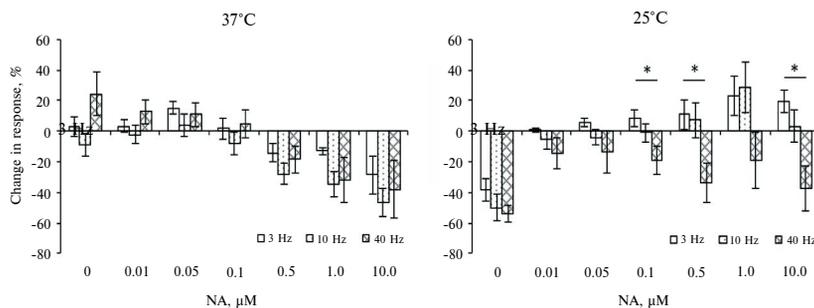


Рис. 5. Зависимость действия норадреналина (NA) на сократительную реакцию сегмента верхней брыжеечной артерии крысы, вызванную электростимуляцией, от частоты стимуляции через 90 мин после растяжения этого сегмента в контроле (0), а также на фоне действия NA при температуре 37°C ($n = 11$) и 25°C ($n = 7$). Результаты выражены в % изменения реакции (в контроле – по сравнению с первоначальной величиной, а на фоне действия NA – по сравнению с величиной реакции непосредственно перед его введением). * $p < 0.05$ при сравнении 3 Hz с 40 Hz.

норадреналина на нейрогенный ответ (при концентрации 0.01–0.1 мкМ среднее значение изменения ответа на ЭС было положительным), в то время как при более высоких концентрациях, а также в условиях холода при всех концентрациях норадреналин оказывал угнетающее действие на этот ответ, судя по отрицательным значениям величин изменения реакции на ЭС.

Для выяснения вопроса о зависимости действия норадреналина на нейрогенный ответ от частоты ЭС данные, представленные на рис. 4, были перегруппированы и построены графики (рис. 5), которые наглядно показывают, что в условиях нормальной температуры действие норадреналина на нейрогенную сократительную реакцию брыжеечной артерии крысы не зависит от частоты ЭС, в то время как в условиях низкой температуры при минимальной частоте ЭС норадреналин в диапазоне концентраций 0.1–10.0 мкМ увеличивает нейрогенный ответ, а при максимальной – его уменьшает, и эта разница является статистически значимой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для холодового воздействия в нашей работе использовалась температура 25°C. Аналогичная температура (24–27°C) применялась и в работах других авторов на брыжеечной и подвздошной артериях [1, 2, 7–10]. Выбор такой температуры оправдан, в частности, тем, что эти артерии могут подвергаться ее воздействию при гипотермии, после которой большинство крыс выживает. Было показано, что LD50 (полулетальная доза) для внутренней температуры тела крысы составляет 23°C [18], а при прекращении ингаляции анестетика изофлурана по достижении ректальной температуры 25°C у большинства крыс происходило спонтанное возвращение ректальной температуры до нормы [19], хотя согласно имеющимся данным даже после снижения ректальной температуры крыс до 13.5–17°C повышение температуры окружающей среды до комнатной приводило к возвращению ректальной температуры до нормы [18, 19].

Нами было показано отсутствие какого-либо значительного изменения сократительной реакции брыжеечной артерии крысы на норадреналин под действием холода, в то время как в экспериментах на хвостовой артерии крысы, поставленных нами [20], а также другими авторами [2, 21] в аналогичных условиях наблюдалось значительное усиление реакции на адреномиметики. Эта разница физиологически оправдана необходимостью уменьшения тепловыделения за счет сокращения поверхностных сосудов

и связанного с этим перераспределения крови, которому способствует отсутствие сокращения сосудов, расположенных глубоко. В опытах на подвздошной артерии крысы [2] и брыжеечной артерии собаки [1] понижение температуры до 24–27°C приводило даже к угнетению сокращения, вызванного фенилэфрином и метоксамином соответственно, которые, в отличие от норадреналина, действуют только на α_1 -адренорецепторы, что, в частности, может объяснять отличие этих данных от полученных нами. В опытах на брыжеечной артерии кролика [7] охлаждение повышало чувствительность этой артерии к норадреналину, однако, как и в наших опытах, не приводило к изменению величины сократительной реакции на высокие концентрации данного вещества.

Увеличение сократительной реакции поверхностных артерий на норадреналин в условиях холода связано с транслокацией α_2 -адренорецепторов из аппарата Гольджи в мембрану гладкомышечных клеток [3, 4]. Следует заметить, что в условиях нормальной температуры реакция как хвостовой, так и брыжеечной артерии крысы на норадреналин обуславливается в основном активацией α_1 -адренорецепторов, однако в брыжеечной артерии, судя по действию блокатора этих рецепторов – празозина, их вклад в эту реакцию выше, чем в хвостовой артерии [22]. Хотя α_2 -адренорецепторы на поверхности гладкомышечных клеток брыжеечной артерии крысы присутствуют и обеспечивают значительную констрикцию этой артерии при их стимуляции соответствующими агонистами [23], однако, судя по отсутствию усиления ответа брыжеечной артерии на норадреналин при снижении температуры, в ней при этом не происходит увеличения общего количества α -адренорецепторов за счет транслокации α_2 -адренорецепторов из аппарата Гольджи.

Нами было показано, что холод значительно ослабляет нейрогенную вазоконстрикцию при всех частотах ЭС в условиях как отсутствия, так и наличия норадреналина в концентрации 0.01–0.1 мкМ. Аналогичные данные были нами получены на хвостовой артерии крысы [24], а также другими исследователями на центральной ушной [25] и сонной [26] артериях кролика в условиях отсутствия норадреналина. Такое ослабление нейрогенной вазоконстрикции под действием холода может быть связано со снижением образования норадреналина в нервных окончаниях, а также его выброса из этих окончаний [9, 4].

В опытах, проведенных Yamamoto и соавт. на перфузируемом участке кишечника крысы, было показано значительное усиление сократительной реакции кровеносных сосудов этого участка на ЭС сосудодвигательных нервов в условиях холода. Отличие от результатов, полученных нами, может объясняться тем, что в указанных опытах в реакции кроме брыжеечной артерии участвовали и другие, в том числе венозные участки сосудистого русла, сократительная реакция которых на норадреналин при охлаждении усиливается [27]. Кроме того, усиление вазоконстрикции в тех опытах было связано с уменьшением обратного захвата норадреналина, выделяющегося из нервных окончаний, который в наших экспериментах на изолированном сегменте брыжеечной артерии мог легче вымываться из этого сегмента длиной 1.2 мм, чем из сосудов, лежащих в ткани перфузируемого участка кишечника крысы, и в меньшей степени влиять на сократительный ответ вследствие значительно меньшего количества норадреналина, выделяющегося из периваскулярных нервов в сегменте, чем в участке кишечника. Как и другими авторами [8, 9], нами не было отмечено какого-либо значительного влияния охлаждения на динамику сократительного ответа брыжеечной артерии крысы, вызванного как норадреналином, так и ЭС, однако для точной оценки этого влияния требуется проведение дополнительного исследования.

Нами было показано, что при высоких концентрациях норадреналина холод перестает оказывать угнетающее действие на нейрогенный тонус брыжеечной (рис. 2), но продолжает его оказывать на тонус хвостовой артерии крысы, который значительно уменьшается [24], что должно приводить к констрикции брыжеечной и дилатации хвостовой артерии. Можно предположить, что это служит для перераспределения крови

к поверхности тела в целях предотвращения отморожения конечностей при низкой температуре, сопровождающейся значительным повышением концентрации норадреналина в крови [14, 15].

В наших опытах на брыжеечной артерии крысы норадреналин в небольших концентрациях не оказывал влияния на нейрогенное сокращение этого сосуда в условиях как нормальной, так и низкой температуры при всех частотах ЭС, за исключением максимальной. При высоких же концентрациях норадреналин значительно уменьшал нейрогенное сокращение в условиях нормальной температуры, но увеличивал его в условиях холода. Во всех предыдущих исследованиях, за исключением работы Су [11], норадреналин в условиях нормальной температуры уменьшал нейрогенную констрикцию различных сосудов либо вызывал появление нейрогенной дилатации. В частности, он уменьшал констрикцию хвостовой артерии крысы [28], желудочно-сальниковой [13] и маточной [12] артерий человека, причем у последней реакция становилась двухфазной. Известно, что экзогенный норадреналин уменьшает выброс эндогенного норадреналина из нервных окончаний [29]. Кроме того, такое изменение нейрогенного сокращения под действием норадреналина связывали с уменьшением чувствительности постсинаптических рецепторов [28], а также с выделением оксида азота [13], что может являться также причиной отмеченного нами снижения нейрогенного ответа в условиях нормальной температуры.

В опытах на брыжеечной артерии кролика в условиях нормальной температуры было отмечено вызванное норадреналином в концентрации 0.3–3 мкМ увеличение нейрогенной констрикции [11], которое сопровождалось уменьшением его выброса из нервных окончаний и не зависело от обратного захвата норадреналина, а также от пресинаптических β -адренорецепторов. Автор делает вывод о том, что возможной причиной описанного потенцирующего эффекта норадреналина является частичная деполаризация мембраны гладкомышечных клеток артерии, облегчающая нейрогенное сокращение этих клеток. Не исключено, что этот же механизм может лежать в основе отмеченного нами увеличения нейрогенной констрикции брыжеечной артерии крысы в условиях холода.

Угнетающее действие норадреналина на нейрогенное сокращение при температуре 25°C и высокой частоте ЭС, не наблюдаемое при минимальной частоте ЭС (рис. 4), вероятно, обусловлено его связыванием с пресинаптическими α_2 -адренорецепторами, вызывающими угнетение выброса норадреналина, являющегося основным нейромедиатором при высокой частоте ЭС, в то время как при низкой частоте ЭС значительно возрастает доля другого медиатора – АТФ [30].

Таким образом, нами впервые показано, что в присутствии норадреналина в низких концентрациях холод значительно уменьшает нейрогенное сокращение брыжеечной артерии крысы и не изменяет действие норадреналина на это сокращение при частоте ЭС, не достигающей 40 Гц, в то время как при высоких концентрациях норадреналина холод не изменяет величину такого сокращения и значительно усиливает потенцирующее действие норадреналина на него. Это может иметь значение для терморегуляции, так как способствует оттоку крови с поверхности вглубь тела при низкой температуре и отсутствии сильного стрессорного воздействия, в то время как при наличии такого воздействия, сопровождающегося значительным повышением концентрации норадреналина в крови, обнаруженные реакции способствуют перераспределению крови в более жизненно важные области.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнена за счет средств бюджета Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 64.1. «Раскрытие механизмов взаимодействия молекулярно-клеточных и системных регуляций функций внутренних органов» (0134-2019-0001).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 03/04/2020 от 10.04.2020 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tsukada M, Chiba S* (2000) Enhancement of vasoconstrictor responses to 5-HT but no to methoxamine by cooling in isolated dog lingual and mesenteric arteries. *Tohoku J Exp Med* 191(3): 139–144. <https://doi.org/10.1620/tjem.191.139>
2. *Ishida H, Saito SY, Hishinuma E, Kitayama T, Ishikawa T* (2018) Differential contribution of calcium channels to $\alpha(1)$ -adrenoceptor-mediated contraction is responsible for diverse responses to cooling between rat tail and iliac arteries. *Eur J Pharmacol* 826: 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.023>
3. *Johnson JM, Kellogg DL, Jr* (2018) Skin vasoconstriction as a heat conservation thermoeffector. *Handb Clin Neurol* 156: 175–192. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63912-7.00011-4>
4. *Alba BK, Castellani JW, Charkoudian N* (2019) Cold-induced cutaneous vasoconstriction in humans: Function, dysfunction and the distinctly counterproductive. *Exp Physiol* 104(8): 1202–1214. <https://doi.org/10.1113/ep087718>
5. *Johnson NJ, Danielson KR, Counts CR, Ruark K, Scruggs S, Hough CL, Maynard C, Sayre MR, Carlhom DJ* (2020) Targeted Temperature Management at 33 Versus 36 Degrees: A Retrospective Cohort Study. *Crit Care Med* 48(3): 362–369. <https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000004159>
6. *You JS, Kim JY, Yenari MA* (2022) Therapeutic hypothermia for stroke: Unique challenges at the bedside. *Front Neurol* 13: 951586. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.951586>
7. *Allen S, Kumar M, Arnfeh B, Chester A, Dzimir N, Duran CM, Yacoub M* (1996) Influence of cooling on mesenteric vascular reactivity. *Eur J Cardiothorac Surg* 10(11): 1015–1020. [https://doi.org/10.1016/s1010-7940\(96\)80407-6](https://doi.org/10.1016/s1010-7940(96)80407-6)
8. *Yamamoto R, Cline WH, Jr., Takasaki K* (1989) Effect of moderate cooling on endogenous noradrenaline release from the mesenteric vasculature of rats. *J Auton Pharmacol* 9(5): 347–355. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.1989.tb00071.x>
9. *Yamamoto R, Takasaki K, Nickols GA* (1992) Purinergic vasoconstrictor component revealed by moderate cooling in the isolated mesenteric vasculature of Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 262(3): 1133–1138.
10. *Ishida H, Saito SY, Ishikawa T* (2018) $\alpha(1A)$ -Adrenoceptors, but not $\alpha(1B)$ - or $\alpha(1D)$ -adrenoceptors, contribute to enhanced contractile response to phenylephrine in cooling conditions in the rat tail artery. *Eur J Pharmacol* 838: 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.09.004>
11. *Su C* (1980) Potentiated effects of alpha agonistic sympathomimetic amines on vasoconstriction by adrenergic nerve stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 215(2): 377–381.
12. *Nelson SH, Steinsland OS, Johnson RL, Suresh MS, Gifford A, Ehardt JS* (1995) Pregnancy-induced alterations of neurogenic constriction and dilation of human uterine artery. *Am J Physiol* 268(4 Pt 2): H1694–H1701. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.268.4.H1694>
13. *Medina P, Segarra G, Peiro M, Flor B, Martínez-León JB, Vila JM, Lluch S* (2003) Influence of nitric oxide on neurogenic contraction and relaxation of the human gastroepiploic artery. *Am J Hypertens* 16(1): 28–32. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(02\)03156-4](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(02)03156-4)
14. *Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS* (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275(4): R1247–R1255. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.4.R1247>

15. Zhang S, Kuang Z, Zhang X (2015) Effects of Simulated Heat Waves with Strong Sudden Cooling Weather on ApoE Knockout Mice. *Int J Environ Res Public Health* 12(6): 5743–5757. <https://doi.org/10.3390/ijerph120605743>
16. Ярцев ВН, Иванова ГТ, Лобов ГИ (2020) Влияние нефрэктомии на реактивность артерий крысы линии Wistar-Kyoto. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(12): 1553–1563. [Yartsev VN, Ivanova GT, Lobov GI (2020) Effect of nephrectomy on the reactivity of arteries from the Wistar-Kyoto rats. *Russ J Physiol* 106(12): 1553–1563. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813920120092>
17. Dvoretzky DP, Yartsev VN, Karachentseva OV, Granstrom MP (2000) Changes in reactivity of rat arteries subjected to dynamic stretch. *Acta Physiol Scand* 169(1): 13–19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00693.x>
18. Gordon CJ (1990) Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* 47(5): 963–991. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90025-y](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90025-y)
19. Shimaoka H, Shiina T, Suzuki H, Horii Y, Horii K, Shimizu Y (2021) Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci* 71(1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00794-1>
20. Yartsev VN (2021) Paradoxical effects of acidosis on the noradrenaline-induced and neurogenic constriction of the rat tail artery at low temperatures. *Can J Physiol Pharmacol* 99(10): 1036–1047. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0740>
21. Jantschak F, Popp AM, Hofmann RA, Villalón CM, Centurión D, Pertz HH (2010) Postjunctional α_2 C-adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382(5-6): 487–497. <https://doi.org/10.1007/s00210-010-0564-z>
22. Liao JF, Yu PC, Lin HC, Lee FY, Kuo JS, Yang MC (1994) Study on the vascular reactivity and alpha 1-adrenoceptors of portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 111(2): 439–444. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb14755.x>
23. Wong ES, Man RY, Vanhoutte PM, Ng KF (2010) Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different $\{\alpha\}_2$ -adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 335(3): 659–664. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.170688>
24. Ярцев ВН, Караченцева ОВ, Дворецкий ДП (2013) Потенцирующее действие норадrenalина на нейрогенную вазореактивность, сниженную в результате охлаждения. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 99(8): 960–967. [Yartsev VN, Karachentseva OV, Dvoretzky DP (2013) Potentiative effects of noradrenaline on the neurogenic vasoreactivity diminished by cooling. *Russ J Physiol* 99(8): 960–967. (In Russ)].
25. García-Villalón AL, Padilla J, Fernández N, Monge L, Martínez MA, Gómez B, Diéguez G (2000) Effect of neuropeptide Y on the sympathetic contraction of the rabbit central ear artery during cooling. *Pflugers Arch* 440(4): 548–555. <https://doi.org/10.1007/s004240000323>
26. Mustafa S, Thulesius O (2002) Cooling-induced carotid artery dilatation: an experimental study in isolated vessels. *Stroke* 33(1): 256–260. <https://doi.org/10.1161/hs0102.101545>
27. Rusch NJ, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1981) The effect of profound cooling on adrenergic neurotransmission in canine cutaneous veins. *J Physiol* 311: 57–65. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013572>
28. Atkinson J, Boillat N, Fouda AK, Guillain H, Sautel M, Sonnay M (1987) Noradrenaline inhibits vasoconstriction induced by electrical stimulation. *Gen Pharmacol* 18(3): 219–223. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(87\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0306-3623(87)90002-4)
29. Kalsner S, Abdali SA (2002) Neurotransmitter release in an arterial preparation and the action of alpha-adrenoceptor antagonists. *Auton Autacoid Pharmacol* 22(5-6): 241–246. <https://doi.org/10.1046/j.1474-8673.2002.00250.x>
30. Tripovic D, McLachlan EM, Brock JA (2013) Removal of half the sympathetic innervation does not reduce vasoconstrictor responses in rat tail artery. *J Physiol* 591(11): 2867–2884. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.250365>

Effects of Cold on the Adrenoreactivity of the Rat Superior Mesenteric Artery**V. N. Yartsev^{a, *}***^aPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*** e-mail: yartsev@infran.ru.*

In experiments on segments of the rat superior mesenteric artery (SMA) under isometric conditions, the effect of cold on the reactivity of this artery, estimated by the magnitude of the contractile reaction of its segments to noradrenaline (NA) at a concentration of 0.01–10.0 μM , as well as to electrical field stimulation (EFS) of perivascular nerves with a frequency of 3, 10 and 40 Hz in the absence and presence of NA in the medium and at a temperature of 37 °C or 25 °C was studied. Cooling was found not to change the tone of the SMA caused by NA at all the concentrations used. In the absence and presence of NA at a low concentration (0.01–0.10 μM), cooling leads to a significant decrease in the neurogenic response of the SMA at all frequencies of EFS, while in the presence of NA at a high concentration (1–10 μM), cooling has no statistically significant effect on this response. In the presence of NA at a low concentration, cooling at low EFS frequencies insignificantly, and at high frequency significantly reduces the potentiating effect of NA on neurogenic contraction of SMA. NA at a high concentration under normal temperature conditions, reduces the neurogenic contraction at all EFS frequencies, while under cooling conditions at low frequencies it has a potentiating effect, and at high EFS frequency it has a depressing effect. The results obtained show that the depressing effect of cold on the neurogenic constriction of the rat SMA, observed at low and disappearing at high concentrations of NA, as well as on the NA-evoked potentiation of the neurogenic vasoconstriction, is not associated with a decrease in the contractile effect of NA, which is the main neurotransmitter in this artery. These effects can contribute to the redistribution of blood from the surface deep into the body, thus reducing heat loss and improve thermoregulation.

Keywords: superior mesenteric artery, neurogenic constriction, noradrenaline, cold

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ГЛУТАМАТ- И ГАМКЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ
НИЖНИХ БУГРОВ ЧЕТВЕРОХОЛМИЯ КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО –
МОЛОДКИНОЙ НА РАННИХ ЭТАПАХ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗА**

© 2024 г. С. Д. Николаева^{1,*}, Л. С. Никитина¹, М. В. Глазова¹, В. Т. Бахтеева¹,
Е. В. Черниговская¹

*¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: sveta.nikolaeva@gmail.com*

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 23.01.2024 г.

Принята к публикации 29.01.2024 г.

Нарушения в работе нейромедиаторных систем при моделировании развития височной эпилепсии наиболее детально изучены в структурах переднего мозга – в височной коре, амигдале и гиппокампе. Известно, что в ходе формирования височной эпилепсии в модели аудиогенного киндлинга наблюдается распространение эпилептиформной активности из стволовых отделов в вышележащие отделы мозга. Однако молекулярные механизмы нарушения регуляции нейротрансмиссии в нижних буграх четверохолмия у грызунов с генетической предрасположенностью к аудиогенным судорожным припадкам в ходе эпилептогенеза остаются неизученными. Изменения в работе нейромедиаторных систем нижних бугров четверохолмия на начальных этапах эпилептогенеза может вносить существенный вклад в эпилептизацию структур переднего мозга. В настоящей работе проведен комплексный анализ маркеров активности глутамат- и ГАМКергических нейронов в нижних буграх четверохолмия крыс Крушинского – Молодкиной (КМ), генетически предрасположенных к аудиогенным судорожным припадкам. Для моделирования ранних этапов развития височной парциальной эпилепсии был использован модифицированный протокол аудиогенного киндлинга, в ходе которого крыс подвергали ежедневным аудиогенным судорожным припадкам в течение семи дней. В качестве контроля использовали наивных крыс КМ. Несмотря на то, что предрасположенность к аудиогенным судорожным припадкам у грызунов часто связывают с нарушениями в ГАМКергической передаче сигнала, нам не удалось выявить значимых изменений в экспрессии ферментов синтеза ГАМК и субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора у крыс линии КМ ни через сутки, ни через неделю после завершения последнего судорожного припадка. При этом через сутки после завершения эксперимента наблюдалось усиление глутаматергической трансмиссии в нижних буграх четверохолмия: повышался уровень активности ERK1/2-киназы и белка экзоцитоза синапсина 1, а также экспрессия VGLUT1 и VGLUT2 и синаптического белка SV2B. Через неделю после последнего припадка наблюдалось только повышенное содержание VGLUT1 в нижних буграх четверохолмия, это свидетельствует о том, что устойчивые изменения затрагивают нейроны вышележащих структур, в частности, височной коры.

Ключевые слова: эпилепсия, нижние бугры четверохолмия, ГАМК, глутамат, крысы линии Крушинского – Молодкиной, аудиогенные судорожные припадки

ВВЕДЕНИЕ

Прогнозы течения и тяжести височной эпилепсии во многом зависят от сроков, в которые начато медикаментозное лечение, а также от этиологии эпилептиформной активности. Такие факторы как большое количество приступов до начала лечения, повторение приступов в первый месяц заболевания и отсутствие ответа на первый противосудорожный препарат являются критичными для пациентов с впервые диагностированной эпилепсией [1–3]. Одной из актуальных задач при исследованиях эпилепсии является изучение патологических процессов, происходящих на начальных этапах развития заболевания. Для изучения механизмов, лежащих в основе хронических форм эпилепсии, а также для изучения эффектов и механизмов действия противосудорожных препаратов используют различные химические, травматические, электрические и генетические животные модели [4].

Генетической моделью рефлекторной эпилепсии являются грызуны, демонстрирующие аудиогенные судорожные припадки (АСП), в том числе крысы линий Wistar Audiogenic Rat (WAR), Genetically Epilepsy Prone Rat (GEPR), Крушинского – Молодкиной (КМ). АСП, возникающие при воздействии звукового стимула, сопровождаются возбуждением в нижних буграх четверохолмия (НБЧ), что было доказано многими авторами на крысах с аудиогенной эпилепсией разных линий GEPR [5, 6], WAR [7, 8] и на мышах линии DBA/2 [9], а также в экспериментах с использованием введения в четверохолмие агонистов и антагонистов рецепторов глутамата и ГАМК [5, 10]. Из НБЧ сигнал передается в верхние бугры четверохолмия, что приводит к началу судорожного припадка, включающему в себя дикий бег, клонические или клонико-тонические судороги. Известно, что для реализации АСП достаточно повышения активности глутаматергической иннервации НБЧ, тогда как перерезка путей в вышележащие отделы не предотвращает развитие АСП [11]. О минорном вовлечении вышележащих отделов мозга на ранних этапах эпилептизации (1–3 последовательных эпизода АСП) свидетельствует также тот факт, что на фоне значительных изменений ЭЭГ в стволовых отделах мозга изменения в коре при первых нескольких АСП или не отмечаются или незначительны [12, 13].

Для исследования механизмов формирования височной эпилепсии широко используется модель аудиогенного киндлинга. Повторные предъявления звукового стимула крысам, демонстрирующим АСП, постепенно приводят к генерализации эпилептиформной активности и формированию посттонических судорог, что является результатом распространения эпилептиформной активности на структуры переднего мозга (гиппокамп, амигдалу, неокортекс) [13, 14]. У крыс линии КМ уже после первых семи припадков мы наблюдали первые признаки генерализации эпилептиформной активности, которые проявлялись в виде посттонического припадка и сопровождалась апоптотическими процессами в гиппокампе [15]. После 14 ежедневных АСП у крыс изменяется характер протекания судорожного припадка, добавляется стадия посттонических судорог, что характерно для височной эпилепсии. Кроме того, ранее было показано возникновение устойчивых нарушений в регуляции глутаматергических нейронов гиппокампа при 14- и 21-дневном аудиогенном киндлинге [16].

Нарушения в работе нейромедиаторных систем при развитии височной эпилепсии наиболее детально изучены в структурах переднего мозга – в височной коре, амигдале и гиппокампе [17, 18]. Однако вопрос о молекулярных механизмах нарушений регуляции нейротрансмиссии в НБЧ у крыс КМ в ходе эпилептогенеза остается открытым, а данные крайне малочисленны. При этом очевидно, что возникновение нарушений в работе НБЧ при аудиогенной эпилепсии сами по себе могут приводить к дальнейшему усилению эпилептиформной активности, ее распространению в другие отделы мозга и формированию лимбических генерализованных судорог, характерных для височной эпилепсии.

Для выявления нарушений в регуляции нейромедиаторных систем НБЧ в настоящей работе мы использовали крыс линии КМ, которых подвергали ежедневным звуковым стимуляциям в течение 7 дней, что позволило рассматривать такой семидневный киндлинг как начальную стадию формирования височной эпилепсии. Целью настоящей работы являлось исследование изменений в регуляции глутамат- и ГАМКергических нейронов в НБЧ после 7 АСП. В работе оценивали как краткосрочные изменения в биохимических показателях активности ГАМК- и глутаматергических систем в НБЧ через 1 день после последней звуковой стимуляции, так и хронические, сохраняющиеся через неделю после последнего АСП и, возможно, приводящие к распространению эпилептиформной активности в высшие отделы мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовали взрослых крыс линии КМ (Московский государственный университет, Россия) в возрасте 4–6-ти месяцев (с полностью сформированной судорожной готовностью). Крыс содержали по 4–5 животных в клетке при цикле день/ночь 12 ч/12 ч со свободным доступом к пище и воде. Общее количество животных в экспериментах – 24.

Экспериментальные группы

Для оценки изменений в ГАМК- и глутаматергической нейротрансмиссии в НБЧ на начальной стадии эпилептизации мозга была использована модифицированная модель аудиогенного киндлинга. Крыс в течение 7 дней подвергали ежедневным звуковым стимуляциям. Звуковой стимул генерировался с помощью компьютерной программы NCH Tone Generator (© NCH Software, Австралия), параметры звука: 50 дБ, 10 кГц. Каждую крысу помещали в тестовую камеру для адаптации на 5 мин и затем подвергали воздействию акустического стимула. Звук выключали, как только крыса начинала демонстрировать судорожный припадок. С помощью видеокамеры регистрировали наличие и продолжительность стадий судорожного припадков, включающих латентный период, дикий бег, клонические и тонические судороги. Если в течение 1 мин стимуляции у животного не возникало судорог, его исключали из эксперимента, но доля таких животных составляла меньше одного процента (по результатам многолетних наблюдений). После повторных звуковых раздражений у животных появлялась дополнительная стадия судорожного припадков, посттонический (лимбический) клонус, что свидетельствовало о распространении эпилептиформной активности в передний мозг [19].

Были проведены две независимые серии экспериментов.

В первой серии экспериментов крыс КМ подвергали 7 АСП, что соответствует стадии начала развития лимбических генерализованных припадков. Первую группу крыс выводили из эксперимента через сутки после седьмого АСП (группа 7 + 1) ($n = 8$), вторую – через 7 дней (период отдыха) после последнего припадков (группа 7 + 7) ($n = 8$). В качестве контрольной группы использовали крыс КМ без опыта АСП ($n = 8$) – наивная группа. Для того, чтобы все животные были выведены из эксперимента одновременно, крыс 1-й группы начинали подвергать звуковым стимуляциям на 7 дней позже, чем крыс 2-й группы.

Половину крыс наркотизировали смесью золетил/ксилазин (60 мг/кг + 10 мг/кг; Virbac, Франция). Затем животных перфузировали транскардиально охлажденным 0.01 М фосфатно-буферным солевым раствором (PBS: (мМ) 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 1.76 KH₂PO₄, pH 7.4), затем 5%-ным формалином (в PBS) в течение 15 мин. Животных декапитировали, мозг всех животных извлекали и фиксировали в 5%-ном формалине при 4°C в течение 5 дней, затем погружали в 20%-ный раствор сахарозы/

PBS для криозащиты (4°C, 3 дня), далее замораживали и хранили при -80°C до дальнейшего использования. Вторую половину крыс быстро декапитировали, из мозга выделяли НБЧ и гомогенизировали в тризоле для ПЦР в реальном времени анализа мРНК белков интереса.

Во второй серии экспериментов также использовали 7-дневную экспозицию действия звука. В первом эксперименте крыс КМ подвергали 7 АСП и выводили из эксперимента через сутки после последнего припадка (группа 7 + 1) ($n = 5$) одновременно с соответствующей контрольной группой крыс КМ без опыта АСП ($n = 5$). Во втором эксперименте крыс КМ подвергали 7 АСП и выводили из эксперимента через 7 дней (период отдыха) после последнего припадка (группа 7 + 7) ($n = 4$) одновременно с соответствующей контрольной группой крыс КМ без опыта АСП ($n = 6$). В этой серии экспериментов животных быстро декапитировали, НБЧ препарировали и гомогенизировали для дальнейшего биохимического анализа. Экспрессию и активность белков, регулирующих активность ГАМК- и глутаматергических нейронов, исследовали с помощью Вестерн-блот анализа.

Гистологический анализ

Срезы НБЧ крыс из 1–3-й групп первого эксперимента толщиной 10 мкм были изготовлены с помощью криостата (Leica, Германия). Изготавливали 15 чередующихся серий препаратов, содержащих фронтальные срезы НБЧ на одном уровне в rostro-caudальном направлении. После стандартных предварительных процедур срезы одной из 15 серий инкубировали с первичными антителами к каждому исследуемому белку (табл. 1). Затем срезы промывали в PBS и инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами (1:300, Vector Laboratories Inc.), после чего следовала часовая инкубация со стрептавидин-пероксидазным комплексом (1:500, Supelco, #S2438). Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%).

Содержание фосфо-ERK1/2, VGLUT1 и GLUT2. Обработку срезов проводили в стандартных условиях в каждом эксперименте, т. е. контрольные и экспериментальные группы в каждом эксперименте собирали, фиксировали и обрабатывали одновременно. Для изучения специфичности иммуноокрашивания проводили отрицательный контроль (тот же протокол без первичных антител), который не показал иммунореактивности. Анализ срезов проводили с микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) и программного обеспечения PhotoM.

Изменения, вызванные судорожной активностью, анализировали в центральном ядре НБЧ. Для каждого животного анализировали пять срезов на одном уровне исследуемой зоны. Для этого фотографии переводили в 8-битный формат с помощью PhotoshopCS6. Количество фосфо-ERK1/2 иммуномеченых клеток в центральном ядре НБЧ считали вручную. Данные представлены в виде количества клеток на 0.2 мм². Поскольку VGLUT 1 и VGLUT2 локализованы преимущественно на пресинаптических окончаниях, их содержание в центральном ядре НБЧ (область интереса выделяли вручную) оценивали по оптической плотности метки в области интереса как разницу между уровнем серого в центральном ядре НБЧ за вычетом уровня серого на участке препарата, не содержащем иммунореактивное вещество. Результаты представлены в относительных единицах оптической площади на мкм².

Вестерн-блот анализ

Экспрессию и активность белков, регулирующих активность ГАМК- и глутаматергических нейронов, исследовали с помощью Вестерн-блот анализа. НБЧ гомогенизировали в буфере для лизиса при 4°C (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА) с ингибиторами протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз

Таблица 1. Список использованных антител

Белок	Использованные первичные антитела	Источник	Разведение первичных антител	Разведение вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой	Разведение вторичных биотинилированных антител	Разведение стрептавидин-пероксидазного комплекса
α,β -Tubulin	Cell Signaling #2148	rabbit	WB 1:2000	WB 1:10000	-	-
GAPDH	Abcam ab8245	mouse	WB 1:1000	WB 1:40000	-	-
GAD65/67	Santa Cruz sc-365180	mouse	WB 1:500	WB 1:40000	-	-
GABAAR α 1	NovusBio NB300-191	rabbit	WB 1:1000	WB 1:10000	-	-
VGLUT1	Merck #MAB5502	mouse	WB 1:1000 IHC 1:250	WB 1:40000	IHC 1:500	IHC 1:1000
VGLUT2	Merck MAB5504	mouse	WB 1:1000 IHC 1:250	WB 1:40000	IHC 1:500	IHC 1:1000
NKCC1	DSHB Hybridoma # t4.	mouse	WB 1:500	WB 1:40000		
phospho-KCC2 (Ser940)	PhosphoSolutions p1551-940	rabbit	WB 1:1000	WB 1:10000		
Total-KCC2	Merck 07-432	rabbit	WB 1:1000	WB 1:10000		
phospho-ERK1/2 (Thr204/ Tyr202)	Cell Signaling #4376	rabbit	WB 1:1000 IHC 1:100	WB 1:10000	IHC 1:300	IHC 1:500
Total-ERK1/2	Cell signaling #9102	rabbit	WB 1:1000	WB 1:10000		
phospho-Syn1 (Ser 62, Ser 67)	Merck AB9848	rabbit	WB 1:750	WB 1:10000		
Total-Syn1	Millipore AB1543P	rabbit	WB 1:1000	WB 1:10000		
SV2A	DSHB AB_2315387	mouse	WB 1:1000	WB 1:40000		
SV2B	BiossAntibodies bs-11365R	rabbit	WB 1:750	WB 1:10000		

Таблица 2. Использованные праймеры

Ген	Номер в базе данных NCBI	Последовательность левого праймера	Стартовая позиция левого праймера	Последовательность правого праймера	Стартовая позиция правого праймера
<i>gaba_A1</i>	NM_183326.2	agcctgcatttaagaacaga	2726	gcaacagtgaagttatgagc	2830
<i>gad65</i>	NM_012563.2	gtacgccatgctcattgcc	818	agagaggatcaaaagccccc	1115
<i>gad67</i>	NM_017007.2	gctggaaggcatggaaggttta	615	acgggtgcaatttcataatggaacata	836
<i>nkcc1</i>	NM_031798.2	tcctgagaggaggaggacatac	1137	agatgccccagaagaaccaccac	1370
<i>kcc2</i>	NM_001393675	tgatggggactggatattct	4986	aacagaactttgctcttgc	5208
<i>s18</i>	NM_213557.1	cctgcgagtactcaacacca	81	ctgcttctcaacaccaca	190
<i>gapdh</i>	NM_017008.4	tcacctcaagattgtcagcaa	496	agatccacaacggatacatt	803

(Roche, #04 906 837 001). Нерастворимый осадок удаляли центрифугированием. Общее содержание белка в образцах определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в качестве стандарта. Супернатант смешивали в соотношении 2:1 с загрузочным буфером (0.2 М Трис-НСI pH 6.7, 6% додецилсульфата натрия, 15% глицерина, 0.003% бромфенолового синего и 10% β -меркаптоэтанола) и инкубировали в течение 10 мин при 96°C. Равные количества проб (10 мкг белка на линию) загружали для электрофореза. Белки разделяли в 10- или 12%-ном полиакриламидном геле, а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3718). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке или 3%-ном БСА в Tris буфере с добавлением Tween 20 (TBST; 0.1% Tween 20, 20 мМ Tris, 137 мМ NaCl; pH 7.4) в течение 1 ч и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами против исследуемых белков (табл. 1). Затем мембраны промывали в буфере TBST и инкубировали со вторичными поликлональными (1:10000; Sigma-Aldrich, #A5420) или моноклональными (1:40000; Sigma-Aldrich, #A9044) антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Специфические белки визуализировали с помощью хемилюминесцентной реакции с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad). Относительную плотность каждой белковой полосы оценивали по соотношению каждого исследуемого белка к GAPDH или α , β -тубулину с помощью программного обеспечения ImageLab (версия 6.0; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Калифорния, США).

Анализ мРНК с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из образцов НБЧ с помощью реагента для выделения РНК PureZOL™ (BioRad, #732-6890). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) по стандартной методике. Чистоту образцов РНК проверяли по соотношению оптической плотности A260/A280 > 1.8. Два мкг тотальной РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622). Количественную ОТ-ПЦР в реальном времени проводили с использованием Evrogen 5x qPCR mix-HS SYBR (Evrogen, #PK147L). Праймеры (табл. 2) были сконструированы с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, США).

Для ПЦР в реальном времени использовали систему LightCycler 96 (Roche). Параметры ПЦР были следующими: начальная денатурация – один цикл при 95°C в течение 5 мин; 45 циклов денатурации, амплификации и количественной оценки (95°C в течение 10 с, 53°C в течение 15 с и 72°C в течение 30 с); кривая плавления – начало при 65°C и постепенное повышение до 95°C. Пороговые значения циклов нормировали по отношению к среднему геометрическому референсных генов *s18* и *gapdh*. Экспрессия в контрольных НБЧ оценивалась как «1». Относительную кратность экспрессии генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты представлены в виде гистограмм. Каждое значение было объединено из 3 независимых ПЦР-реплик для каждого образца кДНК.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью U-теста Манна–Уитни и теста Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна при $p < 0.05$. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., Сан-Диего, Калифорния). Все результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (*SEM*). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка ГАМКергической нейротрансмиссии в НБЧ крыс линии КМ после киндинга

ГАМКергическую нейротрансмиссию оценивали по двум параметрам: оценка содержания ферментов синтеза ГАМК глутаматдекарбоксилазы 65 и 67 (GAD65 и GAD67) использована как показатель продукции ГАМК в НБЧ, а содержание $\alpha 1$ -субъединицы GABA_A-рецептора использовали как маркер чувствительности нейронов НБЧ к действию ГАМК-опосредованной нейротрансмиссии, поскольку именно $\alpha 1$ является одной из основных субъединиц, присутствующих в центральном ядре НБЧ наряду с $\beta 2$ - и $\gamma 2$ -субъединицами GABA_A-рецептора [20]. Оказалось, что после семи судорог уровень экспрессии ферментов синтеза ГАМК остается неизменным: мы не обнаружили статистически значимых различий ни в экспрессии мРНК GAD65 и 67 (рис. 1a, b), ни в содержании белка (рис. 1c). Уровень экспрессии $\alpha 1$ -субъединицы GABA_A-рецептора, также оцениваемый методами ОТ-ПЦР (рис. 1d) и Вестерн-блот анализа (рис. 1e, f), остался на уровне контроля.

Оценка активности регуляторов внутриклеточной концентрации хлорид-ионов в НБЧ после киндинга

Поскольку GABA_A-рецепторы являются каналами для ионов хлора, изменение концентрации хлорид-ионов в нейронах может изменить функциональные свойства рецепторов [21]. Ключевыми регуляторами внутриклеточной концентрации хлора в нейронах являются два котранспортера: натрий-калий-два-хлор котранспортер (NKCC1) и калий-хлор-котранспортер (KCC2) [22]. Сравним экспрессию NKCC1 и KCC2 в НБЧ

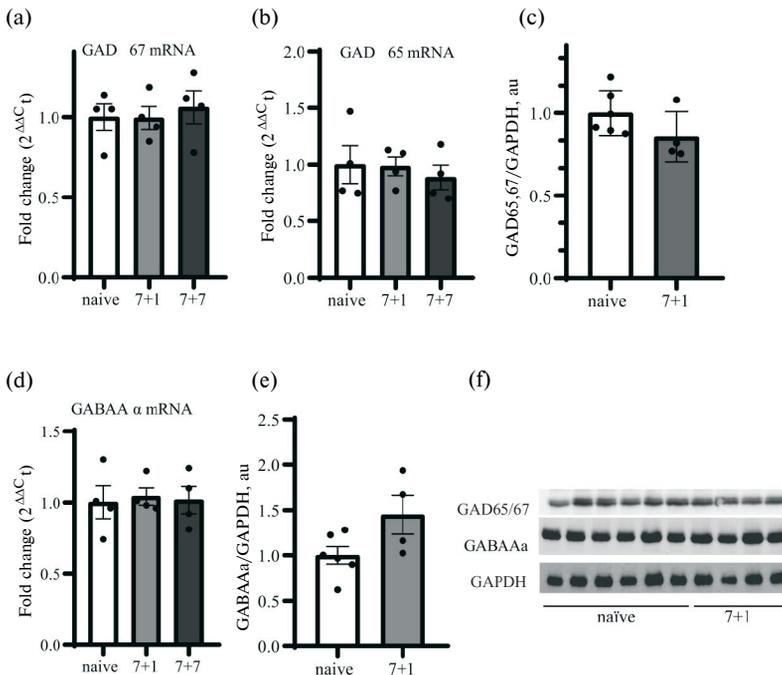


Рис. 1. Анализ белков, участвующих в ГАМКергической нейротрансмиссии в НБЧ крыс линии КМ после 7-дневного киндлинга: экспрессия мРНК GAD67 (a) и GAD65 (b) в НБЧ у наивных животных и у крыс через 24 ч и через 7 дней после киндлинга не отличалась; Вестерн-блот анализ не выявил изменений в содержании белков GAD65 и GAD67 в НБЧ у крыс КМ через 24 ч после киндлинга (c, f); экспрессия мРНК $\alpha 1$ -субъединицы рецептора GABA_A в НБЧ у наивных животных и через 24 ч после киндлинга не отличалась (d); Вестерн-блот анализ не выявил изменений в содержании $\alpha 1$ -субъединицы рецептора GABA_A через 24 ч и через 7 суток после киндлинга (e, f). Репрезентативные изображения иммуноблота (f). Графики результатов анализа ПЦР в реальном времени показывают изменение экспрессии мРНК по сравнению с наивными животными. Значения нормированы на среднее геометрическое референсных генов. Графики результатов Вестерн-блот анализа показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а. у.). Данные представлены как среднее \pm SEM.

крыс через сутки и спустя неделю после семидневного киндлинга, мы показали, что экспрессия белка и мРНК NKCC1 остается неизменной через сутки после семидневного киндлинга и остается на том же уровне после недели отдыха (рис. 2a, c, e). Экспрессия мРНК KCC2 (рис. 2b) и общее содержание белка оставались на том же уровне, что и у контрольных животных (рис. 2f, j). Анализ содержания фосфорилированной (по Ser⁹⁴⁰) формы KCC2 в НБЧ показал, что семикратное предъявление звукового стимула вызывает достоверное увеличение фосфорилированной (активной) формы KCC2 спустя сутки после киндлинга (рис. 2h, j). Через неделю уровень экспрессии мРНК KCC2 и NKCC1 (рис. 2a, b) и содержание белков KCC2 и NKCC1, а также фосфорилированного KCC2 не отличались от контрольных значений (рис. 2g, i, k).

Оценка активности глутаматергической нейротрансмиссии в НБЧ крыс линии КМ после киндлинга

Для оценки активности глутаматергической системы мы оценивали экспрессию везикулярных транспортеров глутамата VGLUT1 и VGLUT2. Повторяющиеся судороги приводили к увеличению содержания VGLUT1 в центральном ядре НБЧ, оцениваемо-

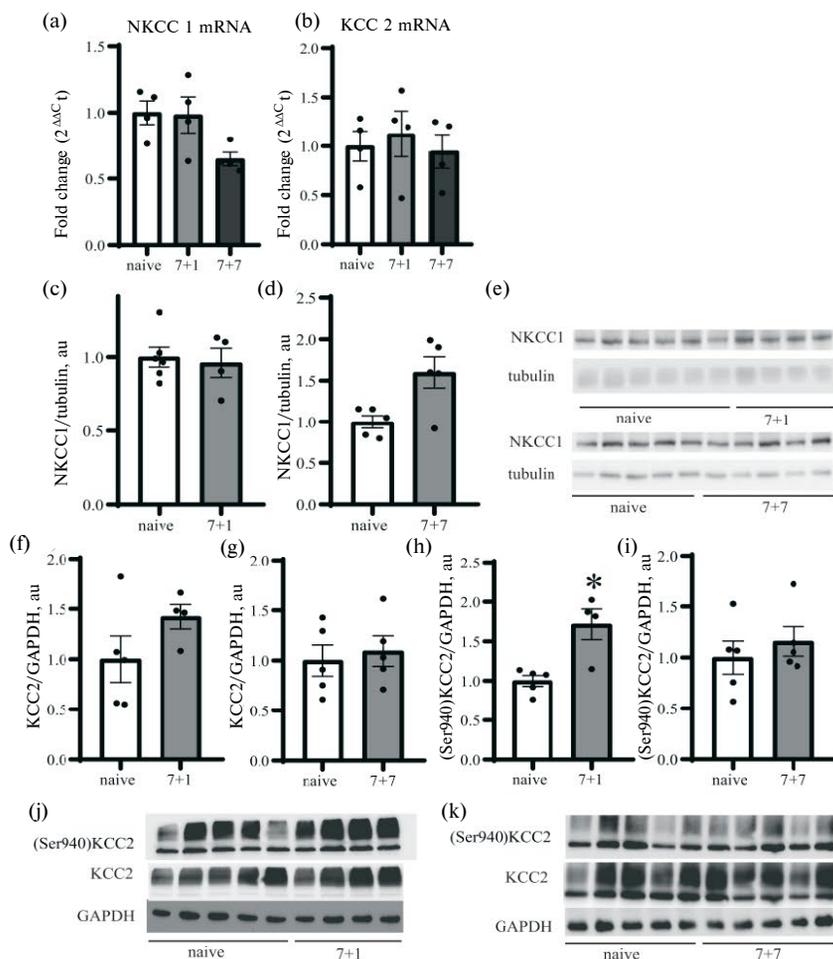


Рис. 2. Анализ котранспортеров Cl⁻ в НБЧ крыс линии КМ после 7-дневного киндлинга: содержание мРНК NKCC1 (a) и мРНК KCC2 (b) в НБЧ у наивных животных через 24 ч и через 7 суток после киндлинга не отличалось; содержание белка NKCC1 (c, d, e) и KCC2 (f, g, j, k) в НБЧ у наивных животных через 24 ч и через 7 суток после киндлинга не отличалось; содержание фосфорилированного KCC2 увеличивалось через сутки после киндлинга (h, j); содержание общего белка KCC2 в НБЧ у наивных животных через 24 ч и через 7 суток после киндлинга не отличалось (i, k). Репрезентативные изображения иммуноблота (e, j, k). Графики результатов анализа ПЦР в реальном времени показывают изменение экспрессии мРНК по сравнению с наивными животными. Значения нормированы на среднее геометрическое референсных генов. Графики результатов Вестерн-блот анализа показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а. у.). Данные представлены как среднее ± SEM. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

го иммуногистохимически, через 24 ч после последнего судорожного припадка (рис. 3a, b). Аналогичные результаты для этой временной точки были получены методом Вестерн-блот анализа (рис. 3c, e). Повышенный уровень экспрессии белка VGLUT1 сохранялся спустя неделю после последнего АСП (рис. 3d, e). Содержание белка VGLUT2 в НБЧ также было выше после серии припадков как при выявлении методом ИГХ (рис. 3i, j), так и при оценке экспрессии белка методом Вестерн-блот анализа (рис. 3f, h). В отличие от VGLUT1 содержание VGLUT2 через неделю после киндлинга уже не отличалось от контрольных значений (рис. 3g, h).

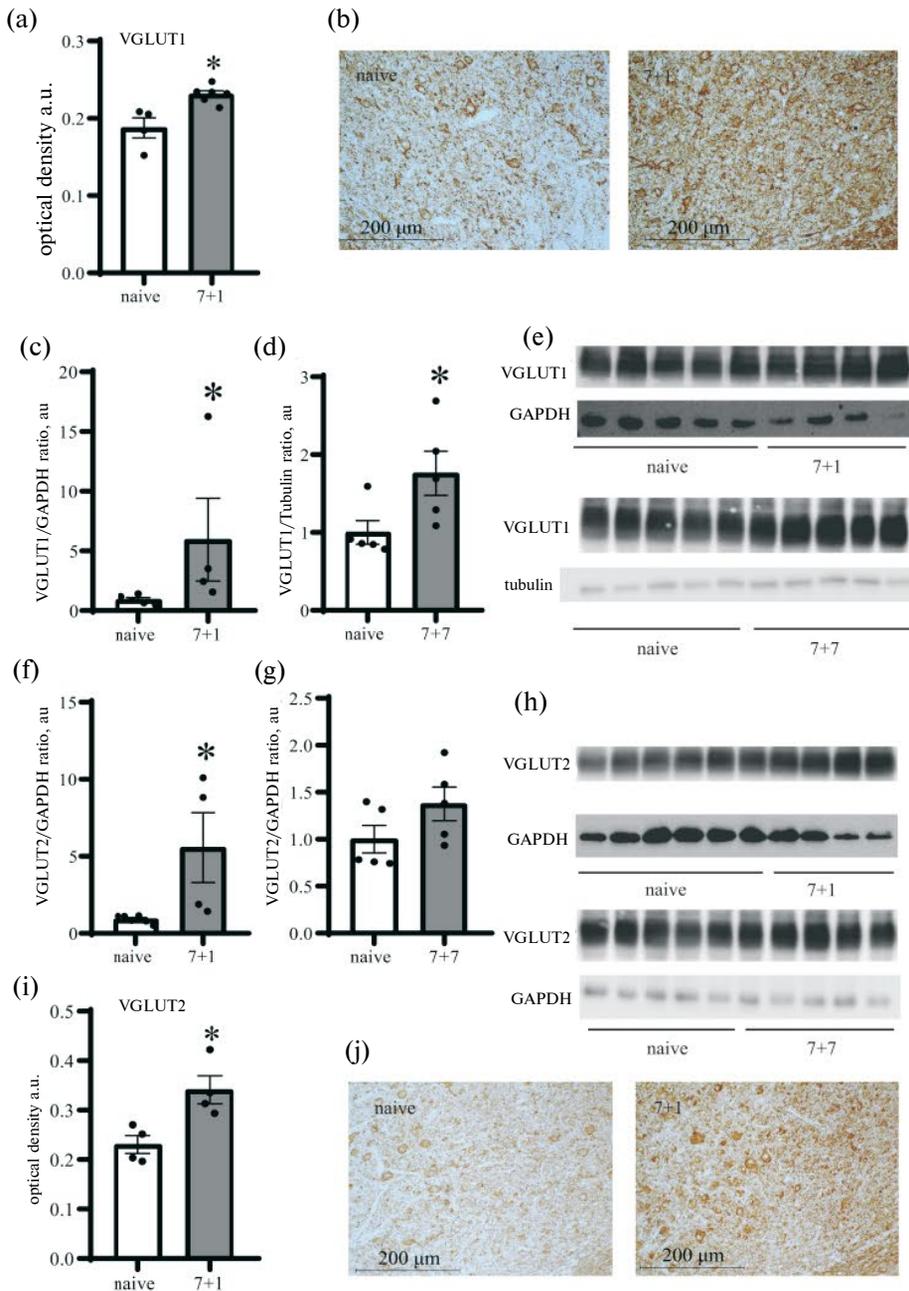


Рис. 3. Анализ содержания транспортеров глутамата VGLUT1 и VGLUT2 в НБЧ крыс линии КМ после 7-дневного киндлинга: содержание белков VGLUT2 и VGLUT1 оценивали по оптической плотности VGLUT1 (a); VGLUT2 (i) иммунореактивного вещества на гистологических препаратах НБЧ. Представительные изображения НБЧ: VGLUT1 (b); VGLUT2 (j). Также оценку содержания везикулярных транспортеров проводили методом Вестерн-блот анализа: VGLUT1 (c, d); VGLUT2 (f, g). Графики показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а. у.). Представительные изображения иммуноблотов (e) и (h) соответственно. Данные представлены как среднее ± SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

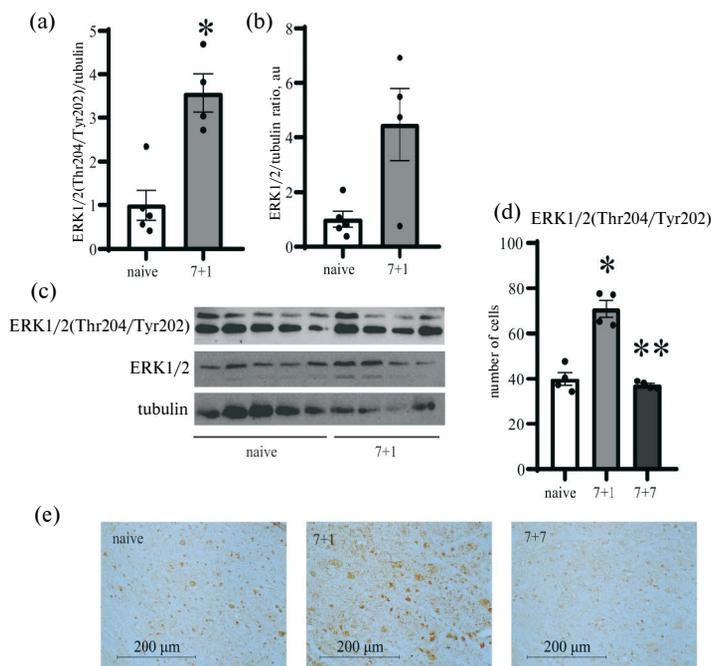


Рис. 4. Анализ содержания фосфо-ERK1/2 в НБЧ крыс линии КМ после 7-дневного киндлинга. На графиках представлены результаты Вестерн-блот анализа фосфорилированного (а) и общего белка ERK1/2 (б) в НБЧ наивных крыс линии КМ и через 24 ч после окончания последнего припадка. Графики показывают увеличение оптической плотности фосфо-ERK1/2-киназа, произвольные единицы (а. у.). Репрезентативные изображения иммуноблотов (с). Иммуногистохимическим методом показано увеличение числа фосфо-ERK1/2 иммунопозитивных клеток в НБЧ крыс линии КМ через 24 ч после киндлинга (д). Репрезентативные изображения фосфо-ERK1/2-иммунореактивного вещества на гистологических препаратах НБЧ (е). Данные представлены как среднее \pm SEM. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0.01$ отличия между группами крыс, декапитированных через сутки и через 7 дней после последнего припадка.

Оценка активности ERK1/2-киназы в НБЧ крыс линии КМ после киндлинга

ERK1/2 сигнальный каскад является важнейшим посредником в глутаматергической нейротрансмиссии [23]. Активность ERK1/2 опосредованной регуляции активности нейронов НБЧ определяли по экспрессии и содержанию активных (фосфорилированных) форм ERK1/2-киназы. Методом Вестерн-блот анализа было показано, что после серии из семи АСП увеличивается содержание активной (фосфорилированной по Thr²⁰⁴/Tyr²⁰²) формы белка ERK1/2 (рис. 4а, с) при неизменяющемся содержании неактивной формы киназы (рис. 4б, с). Чтобы оценить, насколько устойчивы эти изменения, мы сравнили содержание фосфо-ERK1/2 у контрольных животных через сутки после семидневного киндлинга и спустя неделю. Иммуногистохимическое окрашивание показало значительное увеличение фосфо-ERK1/2-иммунопозитивных клеток через 24 ч после последней судороги, через 7 дней после последнего припадка количество нейронов, содержащих фосфо-ERK1/2, в центральном ядре НБЧ снижается до контрольных значений (рис. 4д, е).

Оценка активности экзоцитоза в нижних буграх четверохолмия

Экзоцитоз является одним из механизмов регуляции глутаматергической нейротрансмиссии, в том числе за счет регуляции ERK1/2-киназами активности белка си-

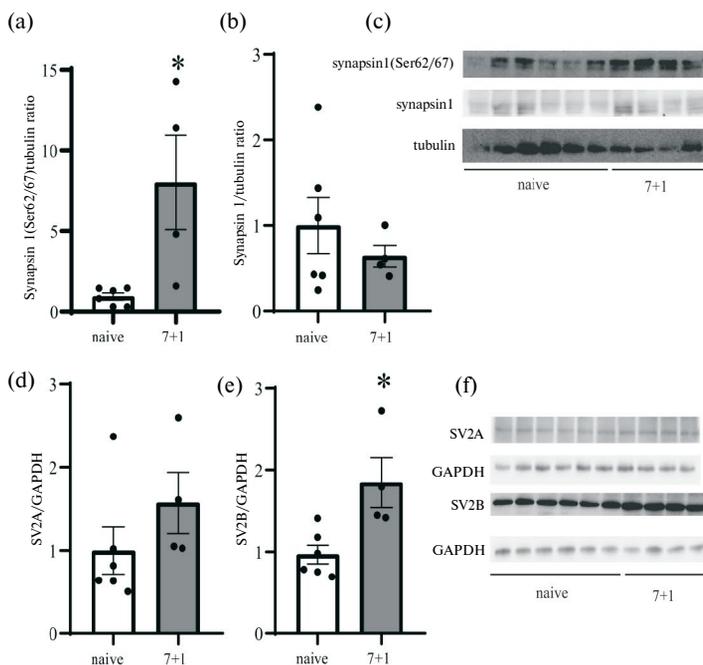


Рис. 5. Анализ содержания синаптических белков синапсина 1, SV2A и SV2B в НБЧ крыс линии КМ после 7-дневного киндлинга. На графиках представлены результаты Вестерн-блот анализа фосфорилированного (a) и общего белка синапсина 1 (b, c), SV2A (d, f) и SV2B (e, f) в НБЧ наивных крыс линии КМ и через 24 ч после киндлинга. Графики показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а. у.). Репрезентативное изображение иммуноблотов (f). Данные представлены как среднее \pm SEM. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

напсин 1. Кроме того, показано, что эпилептиформная активность связана с повышенным уровнем фосфорилирования синапсина 1 в положении Ser⁶²/Ser⁶⁷, регулируемого киназами ERK1/2 [24–26]. Мы сравнили экспрессию и фосфорилирование (по Ser⁶²/Ser⁶⁷) синаптического белка синапсина 1 и везикулярных синаптических белков SV2A и SV2B у контрольных животных и у животных через 24 ч после последней судороги. Оказалось, что содержание фосфорилированного синапсина 1 (Syn1(Ser⁶²/Ser⁶⁷)) значительно повышалось после семи судорожных припадков, в то время как общее содержание синапсина 1 в НБЧ оставалось неизменным (рис. 5a, b, c). Помимо экспрессии и уровня фосфорилирования синапсина 1, мы оценивали содержание в НБЧ синаптических гликопротеинов SV2A и SV2B, для которых показано изменение экспрессии при височной эпилепсии [27, 28]. При сравнении экспрессии белков SV2A и SV2B в НБЧ у крыс, перенесших 7 АСП, и контрольных животных мы обнаружили, что экспрессия SV2A оставалась неизменной (рис. 5d, f), а содержание белка SV2B, характерного для глутаматергических нейронов, возрастало в результате киндлинга (рис. 5e, f), что также свидетельствует об усиленном выбросе глутамата.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Семидневный киндлинг не вызывает изменений в синтезе ГАМК и экспрессии GABA_A1

В последнее время появляется все больше доказательств того, что эпилептогенез возникает в первую очередь из-за дефицита торможения, опосредованного ГАМК

[29, 30] и вызванного снижением экспрессии субъединиц рецепторов ГАМК и потерей ГАМКергических интернейронов [30, 31]. ГАМКергическая система в НБЧ играет важную роль в предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. Однако данные о количестве ГАМКергических нейронов, уровне экспрессии глутаматдекарбоксилазы и чувствительности рецепторов к ГАМК разнятся. Так, у крыс линии GEPР после 3 судорожных припадков показано увеличение количества ГАМКергических нейронов в НБЧ [32]. У наивных крыс линии КМ количество ГАМКергических клеток в НБЧ не отличается от такового у крыс КМ 0, устойчивых к действию звука, однако уровень экспрессии GAD67 выше, чем у контрольных животных [33]. В нашей лаборатории было показано, что у крыс линии КМ на ранних этапах онтогенеза активность ГАМКергической системы, оцениваемая по экспрессии кальций-связывающего белка парвальбумина в клетках, содержащих GAD67, в НБЧ достоверно выше, чем у крыс линии Вистар [34]. Однако у взрослых крыс КМ экспрессия парвальбумина и GAD67 падает значительно ниже уровня, характерного для взрослых крыс линии Вистар, и такой дефицит ГАМКергического торможения, вероятно, является одним из условий формирования судорожной готовности и возникновения стабильных судорог в ответ на звуковой стимул [34]. Предполагая, что развитие височной эпилепсии в результате аудиогенного киндлинга может быть связано с дальнейшим угнетением активности ГАМКергических нейронов в НБЧ, мы оценили их активность после семидневного киндлинга. Оказалось, что через сутки после семи АСП уровень экспрессии ферментов синтеза ГАМК остается неизменным: мы не обнаружили статистически значимых различий ни в содержании белка, ни в экспрессии мРНК GAD65 и 67. При этом мы показали, что и через сутки, и через 7 суток после семи АСП уровень экспрессии $\alpha 1$ -субъединицы GABA_A-рецептора также остался на уровне контроля. Это подтверждает полученные ранее данные, свидетельствующие о том, что под влиянием трех кратковременных эпилептических припадков не изменяется уровень экспрессии субъединиц $\alpha 1$ и $\alpha 4$ GABA_A-рецептора, однако ГАМК-опосредованные моносинаптические тормозные постсинаптические токи (IPSC) снижаются на 55%. Причиной этого снижения, вероятно, является изменение состава субъединиц рецепторов за счет снижения уровня субъединицы $\gamma 2$ [35].

Семидневный киндлинг вызывает кратковременное повышение активности KCC2 и не влияет на экспрессию KCC2 и NKCC1

Роль ГАМК в передаче сигнала ГАМКергическими рецепторами зависит от внутриклеточной концентрации ионов хлора, которая определяет реверсивный потенциал для токов. Если внутриклеточная концентрация ионов хлора низкая, то поток хлора будет направлен внутрь клетки, вызывая гиперполяризацию мембраны и ингибируя проведение нервного импульса; в противном случае, когда концентрация ионов хлора повышена, поток хлора изменяет свое направление, и GABA_A-рецепторы вместо тормозной выполняют возбуждающую функцию. В норме в зрелых нейронах поддерживается низкая концентрация ионов хлора, что позволяет мембране быть гиперполяризованной. Деполяризующие потенциалы ГАМК наблюдаются у новорожденных, а также при таких патофизиологических состояниях, как травма, инсульт или эпилепсия [36]. Таким образом, баланс хлора крайне важен для обеспечения эффективного торможения. Ключевыми регуляторами внутриклеточной концентрации ионов хлора в нейронах являются два котранспортера: NKCC1 и KCC2.

Известно, что изменения в экспрессии и активности NKCC1 и KCC2 наблюдаются при ряде неврологических и психических заболеваний, в том числе у пациентов с диагнозом эпилепсия, а также при моделировании эпилепсии на животных. Причем в литературе встречаются данные как о снижении экспрессии KCC2 и повышении NKCC1 [37, 38], так и наоборот: в ряде работ показано повышенное содержание KCC2 в отдельных структурах мозга у пациентов с височной эпилепсией, а также на экспери-

ментальных моделях эпилептиформных состояний. Так, было показано, что у хомяков с аудиогенной эпилепсией в продолговатом мозге экспрессия КСС2 увеличена, но понижена в НБЧ и гиппокампе [39, 40]. Предположив, что баланс хлорид-ионов может быть нарушен и в ходе формирования височной эпилепсии у крыс линии КМ, мы оценивали экспрессию НКСС1 и КСС2 в НБЧ мозга крыс через сутки и спустя неделю после семидневного киндлинга. Мы показали, что экспрессия мРНК КСС2 и НКСС1 не отличалась у наивных и подвергнутых звуковой стимуляции крыс КМ. Также экспрессия белка НКСС1 не изменяется через сутки после семидневного киндлинга и остается на том же уровне после недели отдыха. Анализ КСС2 в четверохолмии животных после киндлинга показал, что семикратное предъявление звукового стимула вызывает достоверное увеличение фосфорилированной (активной) формы КСС2 спустя сутки после семидневного киндлинга. Через неделю уровень фосфорилированного КСС2 не отличался от контрольного. Неизменность экспрессии НКСС1 и увеличение фосфорилированной формы КСС2 позволяют предположить, что изменяется соотношение транспорта ионов хлора двумя котранспортерами, это может приводить к некоторому снижению, но никак не к повышению внутриклеточной концентрации ионов хлора. То есть при семидневном киндлинге мембрана остается гиперполяризованной, синтез ГАМК и экспрессия $\alpha 1$ -субъединицы $GABA_A$ -рецептора не изменяется, и ГАМК по-прежнему продолжает оказывать тормозящее действие.

2. Киндлинг вызывает изменения экспрессии везикулярных транспортеров глутамата VGLUT1 и VGLUT2 в нижних буграх четверохолмия

Одним из маркеров активности глутаматергических нейронов являются везикулярные транспортеры глутамата VGLUT1 и VGLUT2, отвечающие за захват нейротрансммиттера синаптическими везикулами, что подготавливает их к выведению. В четверохолмии обнаруживаются везикулярные транспортеры глутамата VGLUT1 и VGLUT2. Глутаматергические нейроны, иннервирующие НБЧ, в которых экспрессируется VGLUT2, в основном локализованы в нижележащих отделах головного мозга, а также в самих НБЧ. А VGLUT1, выявляемый в НБЧ, экспрессируется главным образом в клетках слуховой коры [41]. Мы показали, что повторяющиеся судороги приводят к увеличению экспрессии VGLUT2 в НБЧ через сутки после окончания последнего припадка. Содержание VGLUT2 в НБЧ через неделю после семидневного киндлинга уже не отличалось от контрольных значений. Содержание белка VGLUT1 также повышалось после семи АСП и, в отличие от VGLUT2, сохранялось повышенным спустя неделю после последней судороги. Изменения в экспрессии обоих транспортеров глутамата свидетельствуют об усилении глутаматергической трансмиссии в НБЧ после семидневного киндлинга. Ранее нами было показано, что после семи АСП уже происходит активация механизмов, отвечающих за структурную перестройку гиппокампа, наблюдаемую при более продолжительном аудиогенном киндлинге [15]. Повышенное содержание VGLUT1 в четверохолмии через неделю после семи припадков позволяет предположить устойчивое повышение продукции VGLUT1 глутаматергическими нейронами слуховой коры, что может быть биохимическим субстратом генерализации эпилептиформной активности мозга вследствие семи перенесенных АСП.

3. Киндлинг вызывает увеличение активности ERK1/2

Известно, что одним из факторов, участвующих в реализации судорожной активности и влияющих на экспрессию везикулярного транспортера глутамата VGLUT2, является активность ERK1/2-киназ, которые выявляются в глутаматергических нейронах, экспрессирующих VGLUT2 [23]. Уровень экспрессии и фосфорилирования ERK1/2-киназ позволяет судить об активности нейронов в НБЧ. Мы показали, что через сутки после серии из семи АСП содержание активной фосфорилированной фор-

мы белка ERK1/2 в ткани НБЧ увеличивается при неменяющемся уровне экспрессии этого белка. Также в центральном ядре НБЧ через сутки после окончания киндлинга увеличилось число нейронов, содержащих фосфорилированные ERK1/2-киназы, что свидетельствует об усилении активности большего числа нейронов. Чтобы оценить, насколько устойчивы эти изменения, мы сравнили содержание фосфорилированных ERK1/2-киназ у контрольных животных спустя неделю после семидневного киндлинга. Оказалось, что через 7 дней после последнего припадка число нейронов, содержащих активную форму ERK1/2-киназ, снижается и уже не отличается от контрольных значений. Показанное нами транзиторное повышение активности ERK1/2-киназ в четверохолмии хорошо согласуется с кратковременным же повышением содержания VGLUT2 в этой структуре и указывает на то, что семидневный аудиогенный киндлинг вызывает непродолжительную активацию глутаматергической нейротрансмиссии в НБЧ.

4. Семидневный киндлинг приводит к активации синаптических белков в нижних буграх четверохолмия

Экзоцитоз является одним из важнейших механизмов работы химического синапса, определяющих активность секреции нейромедиаторов через пресинаптическую мембрану в синаптическую щель. Чтобы оценить активность экзоцитоза в нейронах НБЧ у крыс после перенесенного киндлинга, мы сравнили экспрессию и фосфорилирование синапсина 1, одного из ключевых белков, участвующих в регуляции высвобождения нейромедиаторов. Активность синапсина 1 зависит от уровня его фосфорилирования, в том числе обусловленного работой ERK1/2-киназ, фосфорилирующих синапсин 1 по Ser⁶²/Ser⁶⁷ [26]. Известно, что синапсин 1 экспрессируется в тех же нервных окончаниях, что и транспортеры глутамата [42]. Мы показали, что содержание фосфорилированного по Ser⁶²/Ser⁶⁷ синапсина 1 в НБЧ значительно повышалось после семи АСП, в то время как общее содержание синапсина 1 оставалось неизменным. Мы предполагаем, что повышенная активность синапсина 1, вероятно, способствует интенсивному выбросу глутамата у животных после серии аудиогенных припадков.

Помимо активности синапсина 1, мы оценивали такие показатели активности экзоцитоза, как везикулярные синаптические белки SV2A и SV2B. Обе изоформы экспрессируются в четверохолмии. Известно, что SV2A может экспрессироваться как в глутаматергических, так и в ГАМКергических нейронах, в то время как экспрессия SV2B характерна преимущественно для глутаматергических нейронов [43, 44]. Сравнив экспрессию этих белков в НБЧ у крыс, перенесших 7 АСП, и контрольных животных, мы обнаружили, что экспрессия SV2A оставалась неизменной, а содержание белка SV2B, характерного для глутаматергических нейронов, возрастало в результате киндлинга, что также свидетельствует об усиленном выбросе глутамата. Увеличение содержания белка SV2B и фосфорилированного синапсина 1 может быть одной из причин патологического повышения глутамат-опосредованной синаптической пластичности на ранних этапах эпилептогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что предрасположенность к аудиогенным судорогам у грызунов часто связывают с нарушениями в ГАМКергической передаче сигнала, нам не удалось выявить значимых изменений в экспрессии ферментов синтеза ГАМК и $\alpha 1$ -субъединицы GABA_A-рецептора у крыс линии КМ после семидневного киндлинга на начальном этапе формирования эпилепсии. При этом у крыс линии КМ на начальной стадии формирования височной эпилепсии наблюдается усиление глутаматергической трансмиссии в НБЧ – повышается уровень экспрессии VGLUT1 и VGLUT2, а также экспрессия синаптического белка SV2B и активность синапсина 1. Повышенное со-

держание VGLUT1 в НБЧ через неделю после последнего припадка свидетельствует об устойчивых изменениях, затрагивающих нейроны вышележащих структур, в частности, височной коры.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С. Д. Н. – планирование экспериментов, проведение Вестерн-блот анализа, проведение ОТ-ПЦР, изготовление и иммуногистохимическое окрашивание срезов, написание статьи. Л. С. Н. – работа с животными, подготовка проб, написание и перевод статьи на английский язык. М. В. Г. – обсуждение результатов, интерпретация данных. В. Т. Б. – статистическая обработка результатов, редактирование текста. Е. В. Ч. – постановка задачи, планирование экспериментов, написание статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-00967-23-00. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Протокол № 2-6 / 2023 от 28.02.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reynolds EH* (1987) Early treatment and prognosis of epilepsy. *Epilepsia* 28: 97–106. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1987.tb03633.x>
2. *Del Felice A, Beghi E, Boero G, La Neve A, Bogliun G, De Palo A, Specchio LM* (2010) Early versus late remission in a cohort of patients with newly diagnosed epilepsy. *Epilepsia* 51: 37–42. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02141.x>
3. *Su L, Di Q, Kwan P, Yu N, Zhang Y, Hu Y, Gao L* (2013) Prediction for relapse and prognosis of newly diagnosed epilepsy. *Acta Neurol Scand* 127: 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2012.01711.x>
4. *Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP* (2014) Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10: 1693–1705. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>
5. *Millan MH, Meldrum BS, Boersma CA, Faingold CL* (1988) Excitant amino acids and audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. II. Efferent seizure propagating pathway. *Exp Neurol* 99: 687–698. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(88\)90185-9](https://doi.org/10.1016/0014-4886(88)90185-9)
6. *Faingold CL* (1999) Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv Neurol* 79: 311–321.
7. *Garcia-Cairasco N* (2002) A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear Res* 168: 208–222. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00371-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00371-4)
8. *Simler S, Vergnes M, Marescaux C* (1999) Spatial and temporal relationships between C-Fos expression and kindling of audiogenic seizures in Wistar rats. *Exp Neurol* 157: 106–119. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7036>

9. Willott JF, Lu SM (1980) Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Exp Neurol* 70: 288–299.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(80\)90028-x](https://doi.org/10.1016/0014-4886(80)90028-x)
10. Chakravarty DN, Faingold CL (1999) Differential roles in the neuronal network for audiogenic seizures are observed among the inferior colliculus subnuclei and the amygdala. *Exp Neurol* 157: 135–141.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7047>
11. Browning RA, Wang C, Nelson DK, Jobe PC (1999) Effect of precollicular transection on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Exp Neurol* 155: 295–301.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6981>
12. Naritoku DK, Mecozzi LB, Aiello MT, Faingold CL (1992) Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp Neurol* 115: 317–324.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(92\)90197-x](https://doi.org/10.1016/0014-4886(92)90197-x)
13. Vinogradova LV (2017) Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *Epilepsy Behav* 71: 142–153.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.06.014>
14. Семюхина АФ, Федотова ИВ, Поletaева ИИ (2006) Крысы линии Крушинского – Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. *Журн высш нерв деят им ИП Павлова* 56: 298–316. [Semiokhina AF, Fedotova IB, Poletaeva II (2006) Rats of Krushinsky – Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology, and behavior. *Zh Vyssh Nerv Deiat im IP Pavlova* 56: 298–316. (In Russ)].
15. Kulikov AA, Naumova AA, Dorofeeva NA, Ivlev AP, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2022) Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky – Molodkina rats correlates with the progression of limbic seizures. *Epilepsy Behav* 134: 108846.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108846>
16. Александрова ЕП, Ивлев АП, Куликов АА, Никитина ЛС, Глазова МВ, Черниговская ЕВ (2023) Хронические нарушения регуляции глутаматергической трансмиссии в гиппокампе крыс линии Крушинского – Молодкиной, вызванные многократными судорожными припадками. *Журн эвол биохим физиол* 59: 427–440. [Aleksandrova EP, Ivlev AP, Kulikov AA, Nikitina LS, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2023) Chronic dysregulation of glutamatergic transmission in the hippocampus of Krushinsky – Molodkina rats caused by repeated convulsive seizures. *J Evol Biochem Physiol* 59: 427–440.
<https://doi.org/10.31857/S0044452923050029>
17. Ross KC, Coleman JR (2000) Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 639–653.
18. Li SY, Xu DS, Jia HT (2003) AGS-induced expression of Narp is concomitant with expression of AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in hippocampus but not inferior colliculus of P77PMC rats. *Neurobiol Dis* 14: 328–335.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.010>
19. Vinogradova LV (2008) Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *Epilepsia* 49: 1665–1674.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01617.x>
20. Shiraishi S, Shiraishi Y, Oliver DL, Altschuler RA (2001) Expression of GABA(A) receptor subunits in the rat central nucleus of the inferior colliculus. *Brain Res Mol Brain Res* 96: 122–132.
[https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00282-0)
21. Farrant M, Kaila K (2007) The cellular, molecular and ionic basis of GABAA receptor signalling. *Elsevier* 160: 59–87.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60005-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60005-8)
22. Watanabe M, Fukuda A (2015) Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front Cell Neurosci* 9: 371.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00371>
23. Doyle S, Pyndiah S, De Gois S, Erickson JD (2010) Excitation-transcription coupling via calcium/calmodulin-dependent protein kinase/ERK1/2 signaling mediates the coordinate induction of VGLUT2 and Narp triggered by a prolonged increase in glutamatergic synaptic activity. *J Biol Chem* 285: 14366–14376.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080069>
24. Hung KL, Wang CC, Wang SJ (2011) Cellular mechanisms of acute decrease of glutamate release induced by raloxifene in rat cerebral cortex. *Neuropharmacology* 61: 293–304.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.016>
25. Lin TY, Lu CW, Huang SK, Wang SJ (2012) Curcumin inhibits glutamate release from rat prefrontal nerve endings by affecting vesicle mobilization. *Int J Mol Sci* 13: 9097–9109.
<https://doi.org/10.3390/ijms13079097>

26. Yamagata Y, Kaneko K, Kase D, Ishihara H, Nairn AC, Obata K, Imoto K (2013) Regulation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by NMDA-receptor-induced seizure activity in cortical slices. *Brain Res* 1507: 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.02.015>
27. Crèvecoeur J, Kaminski RM, Rogister B, Foerch P, Vandenplas C, Neveux M, Mazzuferi M, Kroonen J, Poulet C, Martin D, Sadzot B, Rikir E, Klitgaard H, Moonen G, Deprez M (2014) Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40(2): 191–204.
<https://doi.org/10.1111/nan.12054>
28. Pazarlar BA, Aripaka SS, Petukhov V, Pinborg L, Khodosevich K, Mikkelsen J (2022) Expression profile of synaptic vesicle glycoprotein 2A, B, and C paralogues in temporal neocortex tissue from patients with temporal lobe epilepsy (TLE). *Mol Brain* 15: 45.
<https://doi.org/10.1186/s13041-022-00931-w>
29. Kilb W (2021) When Are Depolarizing GABAergic Responses Excitatory? *Front Mol Neurosci* 14: 747835.
<https://doi.org/10.3389/fnfmol.2021.747835>
30. Wang Y, Wang Y, Chen Z (2018) Double-edged GABAergic synaptic transmission in seizures: The importance of chloride plasticity. *Brain Res* 1701: 126–136.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.008>
31. Kourdougli N, Pellegrino C, Renko JM, Khirug S, Chazal G, Kukko-Lukjanov TK, Lauri SE, Gaiarsa JL, Zhou L, Peret A, Castren E, Tuominen RK, Crepel V, Rivera C (2017) Depolarizing gamma-aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. *Ann Neurol* 81: 251–265.
<https://doi.org/10.1002/ana.24870>
32. Ribak CE (2017) An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Behav* 71: 160–164.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.02.024>
33. Solius GM, Revishchin AV, Pavlova GV, Poletaeva II (2016) Audiogenic epilepsy and GABAergic system of the colliculus inferior in Krushinsky – Molodkina rats *Dokl Biochem Biophys* 466: 32–34.
<https://doi.org/10.1134/S1607672916010099>
34. Черниговская ЕВ, Дорофеева НА, Лебеденко ОО, Николаева СД, Наумова АА, Лаврова ЕА, Глазова МВ (2019) Нейрохимическая организация нижних бугров четверохолмия у аудиогенных крыс Крушинского – Молодкиной в период развития предрасположенности к судорогам. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 724–741. [*Chernigovskaya EV, Dorofeeva NA, Lebedenko OO, Nikolaeva SD, Naumova AA, Lavrova EA, Glazova MV* (2019) Neurochemical Organization of the Inferior Colliculus in Audiogenic Krushinsky – Molodkina Rats During Development of Seizure Susceptibility. *Russ J Physiol* 105: 724–741. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919060013>
35. Bandara SB, Eubig PA, Sadowski RN, Schantz SL (2016) Developmental PCB Exposure Increases Audiogenic Seizures and Decreases Glutamic Acid Decarboxylase in the Inferior Colliculus. *Toxicol Sci* 149: 335–345.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv237>
36. Tillman L, Zhang J (2019) Crossing the Chloride Channel: The Current and Potential Therapeutic Value of the Neuronal K(+)-Cl(-) Cotransporter KCC2. *Biomed Res Int* 2019: 8941046.
<https://doi.org/10.1155/2019/8941046>
37. Sen A, Martinian L, Nikolic M, Walker MC, Thom M, Sisodiya SM (2007) Increased NKCC1 expression in refractory human epilepsy. *Epilepsy Res* 74: 220–227.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.01.004>
38. Schulte JT, Wierenga CJ, Bruining H (2018) Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci Biobehav Rev* 90: 260–271.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.001>
39. Prieto-Martin AI, Aroca-Aguilar JD, Sanchez-Sanchez F, Munoz LJ, Lopez DE, Escribano J, de Cabo C (2017) Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. *Epilepsy Behav* 71: 218–225.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.025>
40. Karlocai MR, Wittner L, Toth K, Magloczky Z, Katarova Z, Rasonyi G, Eross L, Czirjak S, Halasz P, Szabo G, Payne JA, Kaila K, Freund TF (2016) Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct* 221: 3601–3615.
<https://doi.org/10.1007/s00429-015-1122-8>
41. Ito T, Oliver DL (2010) Origins of Glutamatergic Terminals in the Inferior Colliculus Identified by Retrograde Transport and Expression of VGLUT1 and VGLUT2 Genes. *Front Neuroanat* 4: 135.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00135>

42. Chernigovskaya EV, Korotkov AA, Dorofeeva NA, Gorbacheva EL, Kulikov AA, Glazova MV (2019) Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. *Epilepsy Behav* 99: 106494.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106494>
43. Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH (1994) Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci* 14: 5223–5235.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-09-05223.1994>
44. Gronborg M, Pavlos NJ, Brunk I, Chua JJ, Munster-Wandowski A, Riedel D, Ahnert-Hilger G, Urlaub H, Jahn R (2010) Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *J Neurosci* 30: 2–12.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4074-09.2010>

Analysis of the State of Glutamate- and Gaba-Ergic Neurons in the Inferior Colliculi of Krushinsky – Molodkina Strain Rats at Early Stages of Epileptogenesis

**S. D. Nikolaeva^{a,*}, L. S. Nikitina^a, M. V. Glazova^a, V. T. Bakhteeva^a,
and E. V. Chernigovskaya^a**

*^aInstitute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

**e-mail: sveta.nikolaeva@gmail.com*

Disturbances in the neurotransmitter systems during the development of temporal lobe epilepsy have been most detailed studied in forebrain structures – in the temporal cortex, amygdala, and hippocampus [1, 2]. It is known that during the formation of temporal lobe epilepsy in the model of audiogenic kindling there is a spread of epileptiform activity from brainstem to forebrain structures. However, the molecular mechanisms of neurotransmission dysregulation in the inferior colliculi in rodents with genetic prone to audiogenic seizures during epileptogenesis remain unknown. Changes in neurotransmitter systems of inferior colliculi may contribute significantly to the recruitment of forebrain structures during the initial stages of epileptogenesis.

The current work provides a comprehensive analysis of activity markers of glutamate- and GABA-ergic neurons in inferior colliculi of Krushinsky – Molodkina (KM) rats genetically prone to audiogenic seizures. A modified audiogenic kindling protocol was used to model the early stages of temporal lobe epilepsy development. In this protocol rats were subjected to daily audiogenic seizures for seven days. Naive KM rats were used as controls.

Although the rodent's predisposition to audiogenic seizures is often associated with disruptions in GABAergic transmission, no significant changes were found in the expression of GABA synthesis enzymes or the $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptor in the brains of KM rats, either 24 hours or a week after their last convulsive seizure. However, 24 hours after the last audiogenic seizure, an increase in glutamatergic transmission in the inferior colliculi was observed: the activity of ERK 1/2 kinases and the exocytosis protein synapsin 1 increased, as well as the expression of VGLUT1 and VGLUT2 and the synaptic protein SV2B. One week after the last seizure, only an increase in VGLUT1 content in the inferior colliculi was observed, suggesting that persistent changes occur in the neurons of forebrain structures, in particular, the temporal cortex.

Keywords: epilepsy, inferior colliculi, GABA, glutamate, rat, Krushinsky – Molodkina strain, audiogenic convulsive seizures

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *AQP4*
В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПРИ СМЕНЕ ПИТЬЕВОГО РЕЖИМА
И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

© 2024 г. А. А. Евтушенко^{1,*}, И. В. Орлов^{1,2}, И. П. Воронова¹, Т. В. Козырева^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Россия, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

*E-mail: evtushenkoaa@neuronm.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 31.01.2024 г.

Аквапорин-4 (AQP4) является основным водным каналом в центральной нервной системе. Его высокая экспрессия в структурах головного мозга предполагает важную роль в транспорте воды в норме и при патологии. Исследовалось влияние изменения питьевого режима (водная депривация и гипергидратация) и наследственной артериальной гипертензии на экспрессию гена водного канала AQP4 в гипоталамусе – центре регуляции висцеральных функций. Показано, что уровень мРНК *Aqp4* у гипергидратированных животных более чем в 1.5 раза ниже, чем у животных с водной депривацией. Такое изменение экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе может быть связано с возможностью предотвращения цитотоксического отека при повышенном поступлении жидкости в организм. Крысы с наследственной артериальной гипертензией характеризуются повышенным уровнем мРНК *Aqp4* в гипоталамусе, что позволяет предполагать вовлеченность этого канала в процессы, связанные с особенностями регуляции водного баланса мозга при артериальной гипертензии и предотвращения вазогенного отека. Таким образом, представительство водного канала AQP4 в мозге, связанное с защитой клеток мозга, функционально обусловлено состоянием организма, о чем могут свидетельствовать разнонаправленные изменения экспрессии гена *Aqp4* при гипергидратации и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: AQP4, экспрессия генов, гипоталамус, водная депривация, гипергидратация, артериальная гипертензия

DOI: 10.31857/S0869813924030117, **EDN:** COYXCH

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция водно-солевого обмена является важнейшей гомеостатической функцией организма. Молекулярные механизмы трансмембранного движения воды находятся под пристальным вниманием исследователей. Еще в середине прошлого века было показано существование водных пор, пронизывающих липидный бислой [1, 2]. Прогресс в изучении молекулярной природы водных каналов был достигнут после открытия внутримембранного белка СНР-28 (channel-forming integral protein, 28 kDa). В дальнейшем СНР-28 был функционально идентифицирован как белок водных каналов и назван аквапорином-1 (AQP1) [3, 4]. У человека было клонировано и охарактеризо-

вано 13 аквапоринов. Нумерация аквапоринов, начиная с AQP1, связана с последовательностью их идентификации [5].

Аквапорины (AQPs) представляют собой гидрофобные мембранные белки. Эти белки имеют внутриклеточные N- и C-концевые участки, 6 трансмембранных доменов и 5 петель, две из которых участвуют в формировании поры канала. В мембране аквапорины формируют гомотетрамеры, при этом каждый мономер образует собственную функциональную водную пору [6]. В зависимости от структуры и проницаемости у млекопитающих в настоящее время различают три подсемейства аквапоринов: 1) строго специфичные AQP (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 и 8), проницаемы только для воды; 2) «акваглицеропорины» (AQP3, 7, 9 и 10), проницаемы для воды, глицерина и некоторых небольших растворенных веществ; 3) «супераквапорины» (AQP11, AQP12), проницаемы для воды, глицерина и перекиси водорода [5, 7]. Транспорт воды и небольших растворенных веществ через клеточную мембрану с участием аквапоринов управляется осмотическим или концентрационным градиентом [6, 8]. Основная роль аквапоринов – поддержание водного баланса в клетках и тканях организма [6, 9].

Важное физиологическое и клиническое значение имеет водный гомеостаз головного мозга. Преобладающим аквапорином головного мозга является аквапорин-4 (aquaporin-4, AQP4). AQP4 наиболее распространен в астроцитах и эндимальных клетках, выстилающих желудочки, с наибольшей экспрессией на периваскулярных концах астроцитов, которые окружают кровеносные сосуды [10, 11]. Такое распределение предполагает участие AQP4 в двустороннем движении воды между кровью и паренхимой мозга, а также между паренхимой мозга и спинномозговой жидкостью [6, 8, 12]. По мнению ряда исследователей, AQP4 является важной частью гематоэнцефалического барьера, а его основная роль в центральной нервной системе заключается в поддержании водного баланса клеток мозга [13–15]. Имеется большое количество работ, указывающих на важное значение этого водного канала при цереброваскулярных [16, 17] и нейродегенеративных [18, 19] заболеваниях. Однако роль AQP4 в поддержании водного баланса мозга при физиологических воздействиях, приводящих к изменению водно-солевого обмена, таких как алиментарная гипо- (водная депривация) и гипергидратация, не исследовалась, хотя изменения водного режима (водная депривация или гипергидратация) могут привести к изменениям функционирования водного канала AQP4 в структурах мозга.

Нарушение водно-солевого баланса может наблюдаться при ряде заболеваний, в частности, при артериальной гипертензии [20–22]. Признанной в мире оригинальной моделью гипертонической болезни человека является линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) [23, 24], полученная путем многолетнего отбора в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) [25]. Известно, что у крыс линии НИСАГ в почках наблюдается изменение экспрессии некоторых генов, белки которых участвуют в контроле водно-электролитного баланса [22]. Как упоминалось выше, поддержание водного баланса клеток и тканей осуществляется в том числе с участием водного канала AQP4, который у крыс с наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертензией (НИСАГ) ранее не исследовался.

Важнейшим отделом головного мозга, участвующим в регуляции целого ряда вегетативных функций, в том числе осморегуляции и кровяного давления – является гипоталамус. Можно предположить, что изменение водного режима у животных, а также состояние повышенного артериального давления приведут к изменениям количества AQP4 в гипоталамусе, что, в свою очередь, должно найти отражение в изменении экспрессии гена, кодирующего этот канал.

Таким образом, целью настоящего исследования являлась оценка экспрессии гена водного канала AQP4 в гипоталамусе – центре регуляции висцеральных функций при изменении водного режима (водной депривации и гипергидратации) и при наследственной артериальной гипертензии у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные серии

1. *Влияние водной депривации и гипергидратации на экспрессию гена Aqp4 в гипоталамусе крыс.* Эксперименты выполнялись на самцах крыс линии Wistar ($n = 30$) в возрасте 3-х месяцев и массой тела 250–300 г. В течение эксперимента (6 дней) животные содержались в индивидуальных клетках при температуре окружающей среды 22–24°C и 12-часовом цикле темноты/света. На седьмые сутки животные были выведены из эксперимента путем декапитации, после чего забирался биологический материал (кровь – для определения осмоляльности плазмы, гипоталамус – для ПЦР анализа).

Группы животных. Контроль ($n = 10$). Животные контрольной группы имели свободный доступ к воде и сухому корму. На протяжении эксперимента контролировалось количество выпитой воды в сутки. *Водная депривация* ($n = 10$). В течение первых трех дней животные находились в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму, а далее в течение трех дней были лишены воды и питались только сухим кормом. *Гипергидратация* ($n = 10$). Животные лишались твердой пищи на 6 дней. Вместо сухого корма без ограничения животным предлагался 4%-ный раствор сахарозы. На протяжении эксперимента контролировалось количество выпитого раствора сахарозы в сутки.

Регистрируемые параметры. Количество потребляемой жидкости регистрировали ежедневно в двух группах животных – «контроль» и «гипергидратация». Регистрация производилась гравиметрически (Scout Pro SPU601; OHAUS Corporation).

Осмоляльность плазмы крови определяли криоскопическим методом на осмометре ОСКР-1М (КИВИ-осмометрия, РФ).

2. *Влияние артериальной гипертензии на экспрессию гена Aqp4 в гипоталамусе крыс.* Исследование проводилось на самцах крыс нормотензивной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) ($n = 10$) и линии с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) ($n = 10$). Возраст животных 4–6 месяцев, масса тела 300–400 г. Животные содержались группами по 5 особей в клетке (590×380×200 мм) при температуре окружающей среды 22–24°C, с 12-часовым циклом темноты/света, со свободным доступом к корму и воде. Контроль артериального давления осуществлялся по ранее описанной методике [26]. Среднее артериальное давление для крыс НИСАГ и WAG составило 174.5 ± 1.5 и 123.5 ± 2.2 мм рт. ст. ($p < 0.001$) соответственно. Интактные животные были эвтаназированы путем декапитации, после чего забирался биологический материал (гипоталамус – для ПЦР анализа).

Взятие структур мозга для ПЦР анализа. После декапитации мозг крысы быстро извлекали на леду и выделяли гипоталамус, предварительно удалив перекрест зрительных нервов и гипофиз. Область гипоталамуса, включающую *tuber cinereum* с преоптической частью и маммилярными телами, изолировали вертикальным сечением до глубины ≈ 1.5 мм. Гипоталамус разделяли на переднюю и заднюю части путем сечения посередине образца. Пробы, помещенные в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до выделения суммарной РНК.

Определение экспрессии генов. Экспрессию генов определяли количественным методом ОТ-ПЦР, подробно описанным ранее [27–29]. Выделение РНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции [30] с использованием «TRIzol Reagent» (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) согласно протоколу производителя. Возможные следы геномной ДНК удаляли путем обработки ДНКазой «RQ1 RNase-Free DNase» (Promega, Madison, WI, США) в соответствии с протоколом производителя. Для проверки наличия геномной ДНК в пробах проводили ПЦР с праймерами к гену триптофангидроксилазы 1 (*Tph1*), который не экспрессируется в головном мозге [31, 32].

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров, использованных для определения уровня мРНК *Aqp4* в гипоталамусе крыс

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С	Количество циклов амплификации	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)
<i>Aqp4</i>	F 5'-ATCAGCATCGCCAAGTCCGT R 5'-GCCAGCAGTGAGGTTCCA	66	42	144
<i>Ppia</i>	F 5'-TTCCAGGATTCATGTGCCAG R 5'-CTTGCCATCCAGCCACTC	64	40	206
<i>Polr2a</i>	F 5'-GCCTGACTTTGATGTAGCCC R 5'-ATCCACCACCTCTTCCTCCT	64	40	235
<i>Tph1</i>	F 5'-GAAAGTATTTTCGCAGAGCTGG R 5'-GGCGTGGGTGGGTAGAGTTTGTT	66	36	283 с интроном 134 без интрона
<i>Внутриэкзонные праймеры</i>				
<i>Aqp4</i>	F 5'-CAGAGAACCCCTACCTGTG R 5'-CGCAGTGATGTAGAAGACGGA	66	28	179
<i>Polr2a</i>	F 5'-TTGTCGGGCAGCAGAACGTG R 5'-CAATGAGACCTTCTCGTCCCTCCC	64	29	186
<i>Ppia</i>	F 5'-CCGACTGTGGACAACCTCTAAT R 5'-ACTTGAAGGGGAATGAGGAAA	61.5	26	168

Примесей геномной ДНК в пробах обнаружено не было. Все праймеры, использованные в настоящем анализе, были разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных European Molecular Biology Laboratory (EMBL) и синтезированы в компании «БИОСЦЕТ» (Новосибирск, Россия). Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров представлены в табл. 1.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе LightCycler-480 II (Roche, Швейцария). Реакционная смесь содержала мастер-микс с SYBR Green (BioMaster HS-qPCR SYBR Blue(2x), Биолабмикс, Новосибирск), прямой и обратный праймеры и матрицу кДНК. Применяли метод количественного определения стандартных кривых [33]: относительное количество кДНК определяли с использованием калибровочных кривых, полученных по разведениям стандартной кДНК (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 и 1:128). Стандартный раствор кДНК для построения калибровочных кривых готовили путем смешивания аликвот каждого образца синтезированной кДНК. Программное обеспечение LightCycler-480 (Roche, Швейцария) использовали для построения калибровочных кривых и расчета относительного количества кДНК в образцах. Для получения результата в «количестве копий исследуемого гена на 100 копий гена домашнего хозяйства» мы провели количественную оценку количества копий исследуемого гена и гена домашнего хозяйства в стандартном растворе кДНК, используя геномную ДНК известной концентрации в качестве внешнего стандарта [34, 35] и внутриэкзонные праймеры. Каждое значение, необходимое для характеристики экспрессии

Таблица 2. Уровень мРНК гена *Polr2a* (ng/μl) в переднем и заднем гипоталамусе крыс при разных режимах водной нагрузки

Экспериментальные группы	Передний гипоталамус	Задний гипоталамус
Контроль (<i>n</i> = 10)	2.43 ± 0.73	3.14 ± 0.29
Водная депривация (<i>n</i> = 10)	1.48 ± 0.45	3.35 ± 0.17
Гипергидратация (<i>n</i> = 10)	2.84 ± 0.79	3.67 ± 0.39

Для переднего гипоталамуса $F_{1,27} = 1.07, p = 0.35$.

Для заднего гипоталамуса $F_{1,27} = 0.81, p = 0.45$.

генов, получали в трех повторах. Уровень экспрессии гена водного канала AQP4 представлен как количество копий мРНК гена *Aqp4* на 100 копий мРНК гена домашнего хозяйства (ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*) или ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*)).

Статистика. Для статистического анализа использовали пакет программ Statistica 8 (StatSoft, Россия) и программу Microsoft Excel. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента, однофакторного и многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением критерия Фишера при сравнении показателей нескольких экспериментальных групп. Различие считали достоверным при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние водной депривации и гипергидратации на экспрессию гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс

Количество потребляемой жидкости. В контрольной группе среднее количество потребляемой жидкости в сутки составляло 35.0 ± 1.3 мл. В группе гипергидратации этот показатель был выше в 4 раза ($p = 0.00002, t = -14.24$) и составил 138.5 ± 7.2 мл. Животные с водной депривацией не получали воду в течение последних 3 дней.

Осмоляльность плазмы крови. Осмоляльность плазмы крови составила $258.5 \pm 10.2, 276.9 \pm 7.3, 231.9 \pm 12.3$ мОсм/кг H_2O для групп контроля, водной депривации и гипергидратации соответственно. Этот показатель у животных экспериментальных групп достоверно не отличался от показателя у животных контрольной группы. Однако у гипергидратированных животных осмоляльность плазмы была достоверно ниже, чем у животных с водной депривацией ($F_{2,24} = 4.85, p = 0.005$).

Экспрессия гена водного канала AQP4. В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*). Различий в уровне мРНК *Polr2a* между экспериментальными группами обнаружено не было (табл. 2).

В обоих отделах гипоталамуса отмечается довольно высокий уровень экспрессии гена *Aqp4*, превышающий уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства». Уровень мРНК *Aqp4* в группах водной депривации и гипергидратации не отличался от контроля и составил: 1) для переднего отдела гипоталамуса $3996.2 \pm 838.0, 4422.5 \pm 823.9$ и 2461.8 ± 449.3 копий/100 копий *Polr2a* ($F_{1,27} = 2.02, p = 0.68, p = 0.15$) для групп контроля, водной депривации и гипергидратации соответственно. При сравнении уровня мРНК *Aqp4* у животных контрастных групп достоверных различий обнаружено не было ($F_{1,27} = 2.02, p = 0.067$); 2) для заднего отдела гипоталамуса – $1384.5 \pm 209.6, 1600.3 \pm 155.1, 943.9 \pm 131.5$ копий/100 копий *Polr2a* ($F_{1,26} = 3.86, p = 0.38, p = 0.07$) для групп контроля, водной депривации и гипергидратации соответственно. Однако при

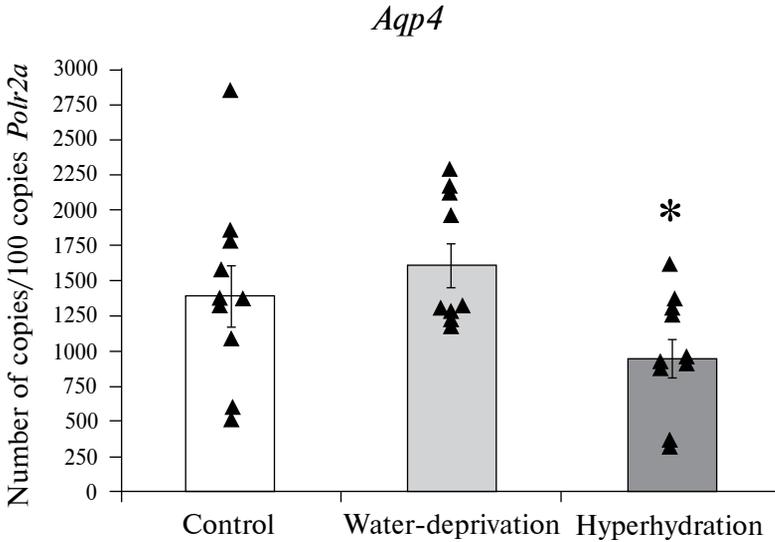


Рис. 1. Влияние питьевого режима (водной депривации и гипергидратации) на экспрессию гена *Aqp4* в заднем гипоталамусе крыс. * – достоверные различия между группами водной депривации и гипергидратации, $p < 0.05$. Индивидуальные значения представлены на рисунке треугольниками.

Таблица 3. Уровень мРНК гена *Ppia* (ng/μl) в переднем и заднем гипоталамусе нормотензивных (WAG) и гипертензивных (НИСАГ) крыс

Линия животных	Передний гипоталамус	Задний гипоталамус
WAG ($n = 10$)	0.62 ± 0.08	0.58 ± 0.08
НИСАГ ($n = 10$)	0.49 ± 0.08	0.55 ± 0.08

Фактор «линия животных» $F_{1,35} = 1.25$, $p = 0.27$.

Фактор «отдел гипоталамуса» $F_{1,35} = 0.03$, $p = 0.86$.

Взаимодействие факторов «линия животных» и «отдел гипоталамуса» $F_{1,35} = 0.36$, $p = 0.55$.

сравнении уровня мРНК *Aqp4* у животных контрастных групп обнаружено, что этот показатель в заднем отделе гипоталамуса у гипергидратированных животных более чем в 1.5 раза ниже ($F_{1,26} = 3.86$, $p = 0.012$), чем у животных с водной депривацией (рис. 1).

2. Влияние артериальной гипертензии на экспрессию гена *Aqp4* в гипоталамусе крыс

В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Различий в уровне мРНК *Ppia* не было обнаружено ни между линиями животных, ни между отделами гипоталамуса (табл. 3).

У крыс нормотензивной линии WAG обнаружены различия в уровне мРНК *Aqp4* между отделами гипоталамуса ($p = 0.022$, $t = -2.53$). Уровень мРНК *Aqp4* в переднем отделе гипоталамуса оказался ниже, чем в заднем, и составил соответственно: 222.7 ± 7.6 и 256.1 ± 11.1 копий/100 копий *Ppia* (рис. 2).

У крыс с артериальной гипертензией не обнаружено различий в уровне мРНК *Aqp4* между передним и задним отделами гипоталамуса ($p = 0.14$, $t = -1.56$). Уровень мРНК

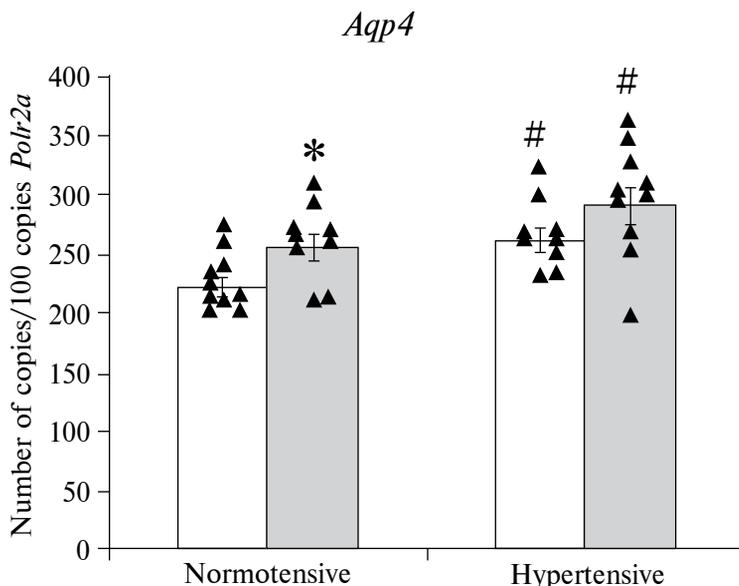


Рис. 2. Экспрессия гена *Aqp4* в переднем (белые столбцы) и заднем (серые столбцы) гипоталамусе нормо- и гипертензивных крыс. * – достоверные различия между отделами гипоталамуса; # – достоверные различия между нормо- и гипертензивными животными, $p < 0.05$. Индивидуальные значения представлены на рисунке треугольниками.

Aqp4 составил 261.9 ± 9.9 и 291.5 ± 15.5 копий/100 копий *Ppia* для переднего и заднего отделов соответственно.

Сравнение уровня мРНК водного канала AQP4 в гипоталамусе у нормо- и гипертензивных животных показало, что у крыс линии НИСАГ этот показатель выше, чем у крыс линии WAG как в переднем, так и в заднем отделах гипоталамуса ($F_{1,34} = 10.48$, $p = 0.022$, $p = 0.037$ для переднего и заднего отделов соответственно) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время AQP4 рассматривается в качестве основного канала, регулирующего водный гомеостаз головного мозга. Показано, что он является также важной частью гематоэнцефалического барьера [13–15] и глимфатической системы мозга [12, 18, 36]. Это подтверждается в том числе его высокой экспрессией на астроцитах, которые окружают кровеносные сосуды, и в эндимальных клетках, выстилающих желудочки мозга [10, 11]. В настоящем исследовании мы обнаружили очень высокий уровень экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе, превышающий уровень гена «домашнего хозяйства», что также указывает на важную роль этого водного канала в мозге.

При исследовании влияния изменения питьевого режима на экспрессию гена *Aqp4* было показано, что у гипергидратированных животных уровень мРНК *Aqp4* в гипоталамусе более чем в 1.5 раза ниже, чем у животных с водной депривацией. Животные, подверженные изменению питьевого режима, действительно находились в контрастных физиологических состояниях по уровню гидратированности организма. Это подтверждается как уровнем потребления воды (гипергидратированные животные потребляли жидкости в 4 раза больше, чем контрольные), так и осмоляльностью плазмы крови (у гипергидратированных животных она была достоверно ниже, чем у животных с водной депривацией). Известно, что одним из видов гипергидратации являет-

ся гипоосмолярная гипергидратация, характеризующаяся снижением осмоляльности плазмы крови. При этом избыточная вода обычно перемещается из внеклеточного пространства в клетку, что может приводить к цитотоксическому отеку [37, 38]. Не исключено, что обнаруженное в наших экспериментах снижение экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе необходимо для предотвращения возможного цитотоксического отека при гипергидратации.

Исследование роли аквапоринов существенно осложняется отсутствием специфических лигандов к ним [11, 16]. Поэтому при изучении роли AQP4 в мозге преимущественно применяют генетические модели: мышей с нокаутом по гену этого водного канала [19, 37, 39–41] или, напротив, с его повышенной экспрессией [42]. Manley и соавт. [37, 43], исследуя роль AQP4 в патогенезе отека головного мозга на модели водной интоксикации (быстрое внутривенное введение воды в объеме 20% от массы тела), обнаружили, что у мышей с нокаутом по гену аквапорина-4 (*Aqp4*^{-/-}) цитотоксический отек не развивается в отличие от мышей дикого типа (*Aqp4*^{+/+}). Еще в одной модели цитотоксического отека – при остром бактериальном менингите у мышей с дефицитом *Aqp4* наблюдалось пониженное содержание воды в мозге [44]. При повышенной экспрессии *Aqp4* у животных было отмечено ускоренное прогрессирование цитотоксического отека головного мозга после острой водной интоксикации [42]. Таким образом, изменение количества AQP4 в различных моделях цитотоксического отека может быть функционально значимо за счет изменения направления транспорта воды в тканях мозга. Возможно, что показанное нами снижение экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе у животных, подверженных гипергидратации, направлено именно на предотвращение возникновения цитотоксического отека, замедляя поступление воды в клетки мозга.

Необходимо отметить, что уровень мРНК *Aqp4* у животных с водной депривацией сопоставим по этому показателю с животными контрольной группы. Аквапорин-4 играет ключевую роль в транспорте воды, в связи с этим он рассматривается как основной водный канал, участвующий в развитии и устранении отеков головного мозга. Работ, посвященных изменению AQP4 в условиях водной депривации, крайне мало. Нами была найдена лишь одна работа [45], в которой было показано, что 2-дневная водная депривация у цыплят приводила к достоверному увеличению мРНК *Aqp4* в гипоталамусе относительно контрольной группы. В наших исследованиях на взрослых крысах не было обнаружено подобных изменений экспрессии гена *Aqp4*. Возможно, имеются видовые и возрастные различия в чувствительности гена *Aqp4* к недостатку потребления воды.

При исследовании влияния артериальной гипертензии на экспрессию гена *Aqp4* было обнаружено, что крысы с наследственной артериальной гипертензией характеризуются повышенным уровнем мРНК *Aqp4* в гипоталамусе в сравнении с нормотензивными крысами. Известно, что артериальная гипертензия сопровождается изменениями водно-электролитного гомеостаза. У крыс линии НИСАГ показано нарушение функции почек – органа, который, как известно, контролирует баланс натрия, объем циркулирующей крови и внеклеточной жидкости и т. д., в целом обеспечивая водно-солевой баланс организма. При этом в почке у животных линии НИСАГ отмечаются как морфологические изменения, например, уплощение эпителия, гипертрофия подоцитов и гиперплазия их мембранных структур, утолщение базальных мембран и т. д. [46, 47], так и изменения уровня мРНК генов *Mlr* и β -*ENaC*, белки которых участвуют в контроле водно-электролитного баланса организма [22]. Согласно литературным данным, у взрослых крыс линии НИСАГ содержание воды в некоторых органах повышено по сравнению с крысами Wistar. Это повышение отмечено в печени, почках, сердце, мышцах, а также в головном мозге [20].

Помимо этого, существуют данные, что выраженная артериальная гипертензия может способствовать развитию отека мозга, в том числе вазогенного [15, 48]. Вазоген-

ный отек характеризуется повышенной проницаемостью капилляров головного мозга, в результате происходит повышение в ткани уровня внеклеточной жидкости [49]. Не исключено, что повышенный уровень экспрессии гена *Aqp4* в гипоталамусе гипертензивных крыс НИСАГ необходим для поддержания водного баланса головного мозга в состоянии повышенного уровня воды и предотвращения опасности вазогенного отека тканей мозга. Подтверждением этого предположения могут быть данные литературы, свидетельствующие о существенном повышении реабсорбции воды из ткани в кровеносное русло при увеличении уровня AQP4 [39]. Авторы данного исследования обнаружили, что нокаут по гену *Aqp4* у мышей может приводить к увеличению воды в паренхиме мозга в различных моделях вазогенного отека мозга (интрапаренхиматозной инфузии жидкости, повреждения гематоэнцефалического барьера и опухоли мозга) в сравнении с мышами дикого типа. Большее накопление воды в мозге у мышей *Aqp4^{-/-}* является следствием снижения переноса воды из паренхимы головного мозга в сосудистое, внутрижелудочковое и субарахноидальное пространство [39].

Интересно, что у крыс со спонтанной гипертензией SHR в структурах мозга (лобная кора, стриатум и гиппокамп) также был обнаружен повышенный уровень AQP4 в сравнении с нормотензивными крысами WKY [14, 15]. Гипоталамус в этих работах не исследовался. Линия SHR, как и линия НИСАГ (объект настоящего исследования), характеризуется повышенным содержанием воды в мозге [50]. На основе наших и литературных данных можно высказать предположение, что повышенный уровень AQP4 в структурах мозга, как и повышенная экспрессия гена этого белка, являются одним из характерных признаков артериальной гипертензии и необходимы, по-видимому, для предотвращения вазогенного отека клеток мозга.

Таким образом, водный канал AQP4 играет важную роль в функционировании мозга, а разнонаправленный характер транспорта воды, обеспечиваемого AQP4, может быть связан с клинически значимыми механизмами формирования и устранения отека мозга. Представительство водного канала AQP4 в мозге, связанное с защитой нервных клеток, функционально обусловлено состоянием организма, о чем могут свидетельствовать показанные в настоящем исследовании разнонаправленные изменения экспрессии гена *Aqp4* при гипергидратации и артериальной гипертензии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента, окончательное утверждение версии манускрипта для публикации (Т. В. К.), сбор и обработка данных (А. А. Е., И. В. О., И. П. В.), написание и редактирование манускрипта (А. А. Е., И. П. В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований Научно-исследовательского института нейронаук и медицины (тема № 122042700001-9). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Научно-исследовательского института нейронаук и медицины. Протокол № 3-О от 18 марта 2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Koefoed-Johnsen V, Ussing HH* (1958) The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42: 298–308.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1958.tb01563.x>
2. *Macey RI, Farmer REL* (1970) Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 211: 104–106.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(70\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(70)90130-6)
3. *Preston GM, Agre P* (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11110–11114.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11110>
4. *Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S* (1993) Aquaporin CHIP: The archetypal molecular water channel. *Am J Physiol Physiol* 265: 463–476.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463>
5. *Trillo-Contreras JL, Ramírez-Lorca R, Villadiego J, Echevarría M* (2022) Cellular Distribution of Brain Aquaporins and Their Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis and Hydrocephalus. *Biomolecules* 12(4): 530.
<https://doi.org/10.3390/biom12040530>
6. *Verkman AS, Mitra AK* (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol* 278: 13–28.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.1.F13>
7. *Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P* (2006) Aquaporin-11: A channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem* 7: 14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-7-14>
8. *Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S* (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11981–11986.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11981>
9. *Carbrey JM, Agre P* (2009) Discovery of the Aquaporins and Development of the Field. *Anxiety Anxiolytic Drugs* 190: 3–28.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_1
10. *Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP* (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4(12): 991–1001.
<https://doi.org/10.1038/nrn1252>. PMID: 14682361
11. *Verkman AS, Smith AJ, Phuan PW, Tradtrantip L, Anderson MO* (2017) The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. *Expert Opin Ther Targets* 21 (12): 1161–1170.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1398236>
12. *Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M* (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med* 4: 147ra111–147ra111.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
13. *Benfenati V, Ferroni S* (2010) Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168: 926–940.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.017>
14. *Tomassoni D, Bramanti V, Amenta F* (2010) Expression of aquaporins 1 and 4 in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1325: 155–163.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.023>
15. *González-Marrero I, Hernández-Abad LG, González-Gómez M, Soto-Viera M, Carmona-Calero EM, Castañeyra-Ruiz L, Castañeyra-Perdomo A* (2022) Altered Expression of AQP1 and AQP4 in Brain Barriers and Cerebrospinal Fluid May Affect Cerebral Water Balance during Chronic Hypertension. *Int J Mol Sci* 23(20): 12277.
<https://doi.org/10.3390/ijms232012277>
16. *Chu H, Huang C, Ding H, Dong J, Gao Z, Yang X, Tang Y, Dong Q* (2016) Aquaporin-4 and Cerebrovascular Diseases. *Int J Mol Sci* 17(8): 1249.
<https://doi.org/10.3390/ijms17081249>
17. *Peng S, Liu J, Liang C, Yang L, Wang G* (2023) Aquaporin-4 in glymphatic system, and its implication for central nervous system disorders. *Neurobiol Dis* 179: 106035.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106035>
18. *Silva I, Silva J, Ferreira R, Trigo D* (2021) Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease. *Neurol Res Pract* 3(1): 5.
<https://doi.org/10.1186/s42466-021-00102-7>

19. *Simon M, Wang MX, Ismail O, Braun M, Schindler AG, Reemmer J, Wang Z, Haveliwala MA, O'Boyle RP, Han WY, Roese N, Grafe M, Woltjer R, Boison D, Iliff JJ* (2022) Loss of perivascular aquaporin-4 localization impairs glymphatic exchange and promotes amyloid β plaque formation in mice. *Alzheimers Res Ther* 14(1): 59.
<https://doi.org/10.1186/s13195-022-00999-5>
20. *Кушнер СР, Иглина НГ, Маркель АЛ, Маханова НА, Айзман РИ* (2001) Водно-солевой состав органов и тканей крыс с наследственной, индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ). *Нефрология* 3: 104 [*Kushner SR, Iglina NG, Markel AL, Makhanova NA, Aizman RI* (2001) The water-salt composition of organs and tissues of rats with hereditary, stress-induced arterial hypertension (ISIAH). *Nephrology* 3: 104. (In Russ)].
21. *Fedoseeva LA, Ryazanova MA, Antonov EV, Dymshits GM, Markel AL* (2011) Renin-angiotensin system gene expression in the kidney and in the heart in hypertensive ISIAH rats. *Biomed Chem* 57(4): 410–419.
<https://doi.org/10.18097/pbmc20115704410>
22. *Abramova TO, Smolenskaya SE, Antonov EV, Redina OE, Markel AL* (2016) Expression of catechol-o-methyltransferase (Comt), mineralocorticoid receptor (Mlr), and epithelial sodium channel (ENaC) genes in kidneys of hypertensive ISIAH rats at rest and during response to stress. *Russ J Genet* 52(2): 180–187.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415120029>
23. *Rapp JP* (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80: 135–172.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.135>
24. *Ryazanova MA, Plekanchuk VS, Prokudina OI, Makovka YV, Alekhina TA, Redina OE, Markel AL* (2023) Animal Models of Hypertension (ISIAH Rats), Catatonia (GC Rats), and Audiogenic Epilepsy (PM Rats) Developed by Breeding. *Biomedicines* 11(7): 1814.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11071814>
25. *Markel AL* (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: *Sassard J* (ed) *Genetic Hypertension*. Colloque INSERM John Libbey Eurotext. London 405–407.
26. *Markel AL, Redina OE, Gilinsky MA, Dymshits GM, KalashnikovaEV, Khvorostova YuV, Fedoseeva LA, Jacobson GS* (2007) Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J Endocrinol* 195: 439–450.
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0254>
27. *Voronova IP, Tuzhikova AA, Kozyreva TV* (2013) Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold. *J Therm Biol* 38: 300–304.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2013.03.009>
28. *Voronova IP, Tuzhikova AA, Markel AL, Kozyreva TV* (2015) Inherited stress-induced hypertension associates with altered gene expression of thermosensitive TRP ion channels in hypothalamus. *J Exp Integr Med* 5: 149–156.
<https://doi.org/10.5455/jeim.021015.or.136>
29. *Evtushenko AA, Voronova IP, Kozyreva TV* (2023) Effect of Long-Term Adaptation to Cold and Short-Term Cooling on the Expression of the TRPM2 Ion Channel Gene in the Hypothalamus of Rats. *Current Issues Mol Biol* 45(2): 1002–1011.
<https://doi.org/10.3390/cimb45020065>
30. *Chomczynski P, Sacchi N* (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 162: 156–159.
<https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
31. *Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Horyangl H, Voits M, Fink H, Bader M* (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299: 76–84.
<https://doi.org/10.1126/science.1078197>
32. *Naumenko VS, Kulikov AV* (2006) Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain. *Mol Biol* 40: 37–44.
<https://doi.org/10.1134/s0026893306010079>
33. *Ginzinger DG* (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30: 503–512.
[https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
34. *Kulikov AV, Naumenko VS, Voronova IP, Tikhonova MA, Popova NK* (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J Neurosci Methods* 141: 97–101.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.06.005>
35. *Naumenko VS, Osipova DV, Kostina EV, Kulikov AV* (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. *J Neurosci Methods* 170: 197–203.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>

36. *Hubbard JA, Szu JI, Binder DK* (2018) The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull* 136: 118–129.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.011>
37. *Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS* (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6(2): 159–163.
<https://doi.org/10.1038/72256>
38. *Thiagarajah JR, Papadopoulos MC, Verkman AS* (2005) Non-invasive early detection of brain edema in mice by near-infrared light scattering. *J Neurosci Res* 80: 293–299.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20439>
39. *Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS* (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 18(11): 1291–1293.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-1723fje>
40. *Verkman AS* (2009) Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol* (190): 359–381.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_18
41. *Gomolka RS, Hablitz LM, Mestre H, Giannetto M, Du T, Hauglund NL, Xie L, Peng W, Martinez PM, Nedergaard M, Mori Y* (2023) Loss of aquaporin-4 results in glymphatic system dysfunction via brain-wide interstitial fluid stagnation. *Elife* 12: e82232.
<https://doi.org/10.7554/eLife.82232>
42. *Yang B, Zador Z, Verkman AS* (2008) Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem* 283: 15280–15286.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801425200>
43. *Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS* (2004) New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129(4): 983–991.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.088>
44. *Papadopoulos MC, Verkman AS* (2005) Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 280: 13906–13912.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413627200>
45. *Saito N, Ikegami H, Shimada K* (2005) Effect of water deprivation on aquaporin 4 (AQP4) mRNA expression in chickens (*Gallus domesticus*). *Mol Brain Res* 141(2): 193–197.
<https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.09>
46. *Шмерлинг МД, Филыушина ЕЕ, Лазарев ВА, Бузюева ИИ, Маркель АЛ, Якобсон ГС* (2001) Ультраструктурные особенности почечных телец у крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. *Морфология* 120 (6): 70–74. [*Shmerling MD, Filyushina EE, Lazarev VA, Buzueva II, Markel AL, Yakobson GS* (2001) Ultrastructural characteristics of renal corpuscles in rats with hereditary stress-induced arterial hypertension. *Morphology* 120 (6): 70–74. (In Russ)].
47. *Filyushina EE, Shmerling MD, Buzueva II, Lazarev VA, Yakobson GS, Markel AL* (2013) Structural characteristics of renomedullary interstitial cells of hypertensive ISIAH rats. *Bull Exp Biol Med* 155(3): 408–412.
48. *Hatashita S, Hoff JT, Ishii S* (1986) Focal brain edema associated with acute arterial hypertension. *J Neurosurg* 64(4): 643–649.
<https://doi.org/10.3171/jns.1986.64.4.0643>
49. *Michinaga S, Koyama Y* (2015) Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci* 16(5): 9949–9975.
<https://doi.org/10.3390/ijms16059949>
50. *Naessens DMP, Coolen BF, de Vos J, VanBavel E, Strijkers GJ, Bakker ENTP* (2020) Altered brain fluid management in a rat model of arterial hypertension. *Fluids Barriers CNS* 17(1): 41.
<https://doi.org/10.1186/s12987-020-00203-6>

Functional Changes in the Expression of the *Aqp4* Gene in the Hypothalamus Under the Influence of Drinking Regimen and Arterial Hypertension in Rats**A. A. Evtushenko^{a,*}, I. V. Orlov^{a,b}, I. P. Voronova^a, and T. V. Kozyreva^{a,b}**^a*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;*** e-mail: evtushenkoaa@neuronm.ru*

Aquaporin-4 (AQP4) is the main water channel in the central nervous system. AQP4 is densely expressed in brain structures suggesting a crucial role in water transport in normal conditions and in disease. The effect of changes in drinking regime (water-deprivation and hyperhydration) and inherited arterial hypertension on the expression of the AQP4 water channel gene in the hypothalamus, the center of regulation of visceral functions, was studied. It was shown that the level of the *Aqp4* mRNA in hyperhydrated animals more than 1.5 times lower than in animals with water-deprivation. This decrease in the *Aqp4* gene expression in the hypothalamus may be associated with the ability to prevent cytotoxic edema during increased fluid intake. Rats with inherited stress induced arterial hypertension (ISIAH) are characterized by an increased level of *Aqp4* mRNA in the hypothalamus, which suggests the involvement of this channel in processes associated with the regulation of brain water balance during arterial hypertension and the prevention of vasogenic cerebral edema. Thus, the presence of the AQP4 water channel in the brain, associated with the protection of brain cells, is functionally determined by the state of the body. This may be evidenced by bidirectional changes in the *Aqp4* gene expression during hyperhydration and arterial hypertension.

Keywords: AQP4, gene expression, hypothalamus, water-deprivation, hyperhydration, hypertension