

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 1
январь
2024



НАУКА
— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Роль активации тромбоцитов в развитии и метастазировании солидных опухолей
А. Н. Свешникова, И. П. Тесаков, С. А. Кузнецова, Е. В. Шамова 3
- Роль металлопротеиназ в развитии индуцированных ишемией патологий гематоэнцефалического барьера
Л. Ю. Коляскин, А. М. Шибeko 25

Экспериментальные статьи

- Влияние внеклеточного ацидоза на функциональный вклад K_{ATP} и TASK-1 калиевых каналов в регуляцию сосудистого тонуса в раннем постнатальном онтогенезе
А. А. Швецова, А. А. Борзых, Д. К. Гайнуллина 47
- Морфологические изменения надпочечников у крыс с различными индивидуально-типологическими особенностями поведения в модели ПТСР после введения даларгина
О. Г. Семенова, А. В. Вьюшина, А. В. Притворова, В. В. Ракицкая, Н. Э. Ордян 58
- Изменение барорефлекторной регуляции ритма сердца после “сухой” иммерсии проявляется при ортостазе, но не при отрицательном давлении на нижнюю часть тела
Р. Ю. Жедяев, О. С. Тарасова, Ю. С. Семенов, А. С. Боровик, О. Л. Виноградова 79
- Влияние живых и инактивированных пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* на размер инфаркта миокарда у крыс с синдромом системного воспалительного ответа
Ю. Ю. Борцев, Д. Л. Сонин, И. Ю. Буровенко, Е. С. Процак, В. Ю. Борцев, О. В. Борцева, М. М. Галагудза 94
- Низкомолекулярный инверсионный агонист рецептора тиреотропина активен как при внутрибрюшинном, так и при пероральном введении
К. В. Деркач, А. А. Бахтюков, В. Н. Сорокоумов, И. А. Лебедев, Е. А. Диденко, А. О. Шпаков 108
- Влияние интервальных гипоксических тренировок в разных режимах на показатели крови крыс
К. А. Баранова, М. Ю. Зенько, Е. А. Рыбникова 122
- Действие кардарина на формирование гистопатологических и поведенческих нарушений в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии у крыс
М. Р. Субханкулов, Д. С. Синяк, В. А. Гук, Т. Ю. Постникова, А. И. Рогинская, О. Е. Зубарева 136
-

CONTENTS

Reviews

- The Role of Platelet Activation in the Development and Metastasis of Solid Tumors
A. N. Sveshnikova, I. P. Tesakov, S. A. Kuznetsova, and E. M. Shamova 3
- The role of metalloproteinases in the development of ischemia-induced pathologies of the blood-brain barrier
L. Yu. Koliaskin, and A. M. Shibeko 25
-

Experimental articles

- Influence of Extracellular Acidosis on the Functional Contribution of K_{ATP} and TASK-1 Potassium Channels to the Regulation of Vascular Tone in Early Postnatal Ontogenesis
A. A. Shvetsova, A. A. Borzykh, and D. K. Gaynullina 47
- Morphological Adrenal Glands Changes in Rats with Different Individual-Typological Behavior Features in the Ptsd Model after Dalargin Injections
O. G. Semenova, A. V. Vyushina, A. V. Pritvorova, V. V. Rakitskaya, and N. E. Ordyan 58
- The change in Baroreflex Regulation of Heart Rhythm after “Dry” Immersion Appears during Orthostasis, but not Lower Body Negative Pressure Test
R. Yu. Zhedyaev, O.S. Tarasova, Yu. S. Semenov, A. S. Borovik, and O. L. Vinogradova 79
- Effect of Live and Inactivated Probiotic Strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* on Myocardial Infarction Size in Rats with Systemic Inflammatory Response Syndrome
Y. Y. Borshchev, c, D. L. Sonin, I. Y. Burovenko, E. S. Protsak, V. Y. Borshchev, O.V. Borshcheva, and M. M. Galagudza 94
- Low Molecular Inverse Agonist of the Thyrotropin Receptor is Active Both Intraperitoneal and Oral Administration
K. V. Derkach, A. A. Bakhtyukov, V. N. Sorokoumov, I. A. Lebedev, E. A. Didenko, and A. O. Shpakov 108
- Influence of Interval Hypoxic Training in Different Regimes on the Blood Parameters of Rats
K. A. Baranova, M. Y. Zenko, and E. A. Rybnikova 122
- Cardarin Effect on the Formation of Histopathological and Behavioral Abnormalities in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats
M. R Subkhankulov, D. S. Sinyak, V. A. Guk, T. Yu. Postnikova, A. I Roginskaya, and O.E. Zubareva 136
-
-

ОБЗОРЫ

**РОЛЬ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В РАЗВИТИИ
И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

© 2024 г. А. Н. Свешникова^{1, 2, 3, *}, И. П. Тесаков², С. А. Кузнецова^{1, 2}, Е. В. Шамова⁴

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 25.10.2023 г.

После доработки 22.11.2023 г.

Принята к публикации 24.11.2023 г.

Система свертывания крови, состоящая из плазменного звена – активации тромбина и полимеризации фибрина, и сосудисто-тромбоцитарного звена, активно участвует в развитии онкологических заболеваний. Известно, что многие солидные опухоли экспрессируют тканевый фактор – “спусковой крючок” каскада реакций свертывания плазмы крови, что приводит к повышенному риску рак-ассоциированного тромбоза и венозного тромбоза у онкологических больных. Также давно известно, что тромбоциты – небольшие клеточные фрагменты, являющиеся основой тромбов, играют критическую роль в метастазировании, связываясь с опухолевой клеткой после ее выхода в кровеносный сосуд, “экранируя” ее от иммунной системы и способствуя адгезии и экстравазации опухолевой клетки в ткани и формированию метастаза. Кроме того, тромбоциты, будучи мобильными “складами” факторов роста, активно привлекаются и в некоторых случаях поглощаются опухолью, что способствует ее развитию и васкуляризации. Привлечение тромбоцитов происходит как через активацию системы свертывания крови в районе опухоли, так и путем экспонирования опухолью адгезионной поверхности. Активированные в окрестности опухоли тромбоциты привлекают и вызывают активацию нейтрофилов и образование ДНК-ловушек нейтрофилов (NETs), модулируя таким образом микроокружение опухоли. Кроме непосредственного взаимодействия тромбоциты и опухолевые клетки обмениваются мРНК, микро-РНК и другими регуляторными молекулами через микровезикулы, при этом тромбоциты являются контейнерами для распространения по организму опухолевого генетического материала (циркулирующие нуклеиновые кислоты). В настоящем обзоре мы рассматриваем молекулярные механизмы участия тромбоцитов в развитии и метастазировании солидных опухолей, а также обсуждаем возможные варианты фармакологического прерывания этого взаимодействия.

Ключевые слова: тромбоцит, гранулоцит, клеточная адгезия, солидная опухоль, метастазирование, микровезикулы, ДНК-ловушки нейтрофилов

DOI: 10.31857/S0869813924010015, EDN: WUWMEL

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении нескольких последних десятилетий онкологические заболевания “набирают обороты”, при этом наиболее распространенные – рак легкого и рак предстательной железы у мужчин и рак молочной железы у женщин [1] развиваются до достижения пожилого возраста [2]. Система остановки кровотечения – система гемостаза – оказывается задействована в развитии солидных онкологических заболеваний. У пациентов с установленными злокачественными новообразованиями клинически выраженные осложнения со стороны системы гемостаза наблюдаются значительно чаще, чем в общей популяции [3]. Так, по данным крупных ретроспективных и проспективных исследований частота тромбоэмболии легочной артерии у пациентов с онкологическими заболеваниями составляет от 0.6 до 7.8%, в то время как в общей популяции она не превышает 0.1% [4]. В настоящее время установлено, что тромбозы являются ведущей причиной смерти онкологических больных [5, 6]. Тем не менее ни одна из существующих прогностических шкал, используемых сегодня в клинической практике, не позволяет точно предсказать развитие осложнений со стороны системы гемостаза у конкретного пациента. Это может быть связано с недостаточным пониманием сложных механизмов взаимодействия между клетками злокачественной опухоли и ключевыми компонентами системы гемостаза: системой плазменного свертывания и тромбоцитами [7]. Вопросам роли плазменного свертывания был посвящен наш предыдущий обзор [8], а в настоящем обзоре мы фокусируемся на роли тромбоцитов в развитии солидных онкологических заболеваний.

ТРОМБОЦИТЫ И ПЛАЗМЕННЫЙ ГЕМОСТАЗ

Тромбоциты представляют собой форменные элементы крови, которые циркулируют в кровотоке в концентрации 200–400 тыс./мкл. Они лишены клеточного ядра и представляют собой фрагменты цитоплазмы, образующиеся из мегакариоцитов костного мозга и поступающие в системный кровоток [9]. В случае повреждения сосуда тромбоциты способны адгезировать к поврежденным тканям, активироваться и агрегировать с образованием гемостатической пробки, которая может перекрыть повреждение и предотвратить кровопотерю [10, 11]. Активация тромбоцитов может происходить по разнообразным путям трансдукции сигнала, чувствительным к растворимым и нерастворимым маркерам нарушения целостности сосуда. Тромбоциты могут реализовать несколько функциональных ответов: активация тромбоцитарных β_3 интегринов, изменение формы, секреция гранул и инициация плазменного звена свертывания крови [12]. В контексте рассмотрения онкологических заболеваний представляется наиболее значимым тот факт, что тромбоциты “набиты” гранулами, содержащими различные медиаторы и факторы роста [13], которые они секретируют даже при небольшой активации. Также в последние годы развивается представление о тромбоцитах как о “дозорных” иммунной системы, так как они играют важную роль в обнаружении бактерий в циркулирующей крови и регулируют экстравазацию иммунных клеток в ответ на внешние и внутренние стимулы [14–16].

Начальным этапом тромбообразования является адгезия тромбоцита к субэндотелиальным белкам – коллагену и фактору Виллебранда, которые становятся доступными после повреждения сосуда. Активация приводит к перестройке цитоскелета и изменению формы тромбоцита, а также к секреции тромбоцитом вторичных активаторов, таких как тромбоксан A_2 и аденозиндифосфат (АДФ). Также вследствие активации тромбоцита происходит активация гликопротеина $Pb/IIIa$, последующее связывание его с фибриногеном и образование своеобразного “мостика” между двумя активированными тромбоцитами. Описанные процессы называются агрегацией и лежат в основе формирования тромбов [17]. Кроме коллагена среди физиологических активаторов

тромбоцитов наиболее известными являются АДФ и тромбин – сериновая протеаза, один из основных ферментов системы свертывания. Стимуляция рецептора приводит к активации сложной системы внутриклеточной сигнализации, которая может привести к активации тромбоцита и последующей агрегации [12, 18].

Одновременно с активацией тромбоцитов в месте повреждения сосуда происходит активация системы свертывания крови – сети ферментативных реакций, управляющей образованием фибринового сгустка, запечатывающего место повреждения [19]. Традиционно принято рассматривать механизм свертывания крови как каскад, а вернее, сеть протеолитических реакций [20], в которой фермент, образующийся в результате предыдущей реакции, катализирует следующую [19]. Несмотря на то, что в каскадной модели свертывания крови некоторые реакции все еще обсуждаются [21, 22], все основные компоненты этой модели и связи между ними остаются неизменными на протяжении последних тридцати лет [19]. В классической модели выделяют два основных механизма инициации свертывания: внешний путь (путь тканевого фактора) и внутренний (контактный) путь [19].

Клетки почти всех тканей организма экспрессируют тканевый фактор, являющийся трансмембранным гликопротеином. При повреждении сосуда происходит связывание активного фактора VII (VIIa) с тканевым фактором и образование внешней теназы – комплекса VIIa/TF [8], обладающего мощной ферментативной активностью и способного активировать факторы IX и X [23]. Эти события и запускают процесс свертывания крови. Фактор IXa может напрямую активировать фактор X, а тот, в свою очередь, – катализировать превращение протромбина в активный тромбин [23]. Тромбин превращает растворимый фибриноген в фибрин с последующей полимеризацией последнего и образованием сгустка [19]. Интересно, что все перечисленные реакции протекают на поверхности богатых фосфатидилсерином мембран погибших клеток, причем в первую очередь эти мембраны предоставляют гиперактивированные тромбоциты [24].

Кроме своей роли в полимеризации фибрина тромбин является активатором клеточных рецепторов протеаз – PAR-рецепторов. Именно благодаря наличию на тромбоцитах PAR1 и PAR4 рецепторов и происходит их активация тромбином [25]. Далее мы подробно обсудим значение того факта, что клетки сосудистого эндотелия, клетки иммунной системы и большинство опухолевых клеток также содержат PAR1-рецепторы.

РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ОПУХОЛЕЙ

Участие тромбоцитов крови человека в процессе развития онкологических заболеваний было продемонстрировано еще в 1968 г. [26], и далее исследования велись по трем основным направлениям: 1) тромбоцитоз как признак развития опухоли и/или неблагоприятного прогноза [27]; 2) участие тромбоцитов в пролиферации опухолевых клеток и васкуляризации опухоли; 3) участие тромбоцитов в метастазировании опухоли и экстрavasации циркулирующих опухолевых клеток [28, 29]. Можно заметить, что первое направление на самом деле является следствием либо второго, либо третьего и свидетельствует о важности тромбоцитов для прогресса онкологического процесса, при этом многие детали механизмов взаимодействия клеток опухолей и тромбоцитов до сих пор не уточнены.

Изменение количества тромбоцитов в общем анализе крови при онкологических заболеваниях известно давно, и в 2013 г. было продемонстрировано, что многие опухоли, синтезируя цитокин интерлейкин-6, индуцируют синтез тромбопоэтина, который, в свою очередь, приводит к повышенному производству тромбоцитов мегакариоцитами – паранеопластическому тромбоцитозу [30]. Паранеопластический тромбоцитоз является одним из факторов, способствующих негативному прогнозу при терапии он-

кологических заболеваний [31, 32]. Так, при раке яичников наблюдается увеличение количества тромбоцитов, связанное с курсом лечения и прогрессированием заболевания, а снижение количества тромбоцитов менее чем на 25% после химиотерапии было неблагоприятным прогностическим фактором и ассоциировалось с риском рецидива [33]. В недавнем исследовании 112 тысяч онкологических пациентов, для которых был проведен анализ крови с подсчетом количества тромбоцитов за месяц до постановки диагноза, было показано, что уровень смертности от рака был выше среди лиц с высоким количеством тромбоцитов и ниже среди лиц с низким количеством тромбоцитов [34]. Таким образом, количество тромбоцитов однозначно важно для прогресса многих онкологических заболеваний.

Вопрос о влиянии тромбоцитов непосредственно на канцерогенез в настоящее время остается открытым [35]. Непосредственное “потребление” тромбоцитов опухолью было показано только для таких сосудистых опухолей, как гемангиомы [36]. При активации тромбоциты секретируют большое количество про-ангиогенных факторов – VEGF, PDGF, EGF [13]. Данные факторы способствуют пролиферации эндотелия, что приводит к образованию новых сосудов и васкуляризации опухолей [37, 38], а также ускорению пролиферации клеток самой опухоли [39, 40]. В частности, тромбоциты секретируют трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- β 1) [41, 42]. Labelle и соавт. на мышинных моделях рака толстой кишки и молочной железы показали, что TGF- β 1, секретируемый тромбоцитами, способствует запуску в опухолевых клетках сигнальных путей TGF β /Smad и NF- κ B, что, в свою очередь, приводит к изменению их фенотипа и увеличению метастатического потенциала [43]. Вопросам активации тромбоцитов в окрестности опухоли посвящен второй раздел настоящего обзора, а вопросам васкуляризации опухоли под действием тромбоцитов и плазменного звена свертывания крови – четвертый раздел.

Секретируемые тромбоцитами факторы роста также приводят к эпителиально-мезенхимальному переходу [44]. Radziwon-Balicka и соавт. продемонстрировали, что во время инкубации тромбоцитов с клетками колоректального рака линий Caco-2 и HT29 происходит секреция тромбоцитами тромбоспондина-1 и кластерина, которые приводят к увеличению инвазивного потенциала опухолевых клеток за счет повышения активности MMP-9 через сигнальный путь p38 MAPK [45]. Участие тромбоцитов в метастазировании показано во множестве работ [46, 47]. Так, у SCID мышей, нокаутных по ядерному фактору эритроидного происхождения 2 (Nf-E2), у которых вследствие дефекта созревания мегакариоцитов тромбоциты практически отсутствуют, а также у нокаутных по PAR-4 (рецептор к тромбину) или фибриногену мышей при внутривенном введении клеток меланомы значительно снижена вероятность образования метастаз [48]. Многократно было продемонстрировано, что антитромбоцитарная терапия аспирином или двойная антитромбоцитарная терапия аспирином и антагонистами P2Y₁₂-рецепторов (клопидогрел, тиклопидин и др.) подавляет метастазирование [49, 50]. Вопросам участия тромбоцитов и антитромбоцитарной терапии в метастазировании посвящены последние разделы настоящего обзора.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ КЛЕТКАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

На сегодняшний день описан ряд молекулярных механизмов взаимодействия тромбоцитов с клетками злокачественных опухолей, которые могут приводить к активации и агрегации тромбоцитов.

Известно, что некоторые клеточные линии меланомы, нейробластомы, рака яичников и молочной железы в разной степени способны секретировать АДФ [51]. Boukerche и соавт. показали, что клетки меланомы линии M₃Da. вызывают необратимую агрега-

цию тромбоцитов *in vitro* за счет присутствующего в среде (возможно, секретируемого клетками) АДФ [52]. Авторы сделали предположение о том, что АДФ, высвобождаемая опухолевыми клетками, может играть ведущую роль в агрегации тромбоцитов *in vitro* в присутствии опухолевых клеток некоторых клеточных линий [52]. Hainmüller и соавт. [53] установили, что для клеток различных линий рака легкого характерны разные механизмы взаимодействия с тромбоцитами.

В клетках колоректального рака [54], рака легкого [55], папиллярного рака щитовидной железы [56] и остеосаркомы [57] наблюдается высокая экспрессия гена тромбосан-синтазы, синтезирующей активатор тромбоцитов тромбосан A_2 [58]. Установлено, что в клетках колоректального рака продукция тромбосана A_2 необходима для пролиферации [54]. De Leval и соавт. показали, что фармакологическое ингибирование как тромбосан-синтазы, так и рецепторов к тромбосану полностью подавляет агрегацию тромбоцитов в присутствии клеток остеосаркомы линии MG-63 [57]. В исследовании *in vivo* было показано, что ингибирование синтеза тромбосана A_2 приводит к снижению метастазирования рака легкого [58].

Как говорилось выше, в присутствии опухолевых клеток происходит генерация тромбина [53], вероятно, благодаря экспрессии на их поверхности тканевого фактора [59]. Тканевый фактор является кофактором внешней теназы – протеазы плазмы крови, катализирующей образование активного фактора X, который и катализирует образование тромбина [60]. Тромбин является наиболее сильным индуктором активации и агрегации тромбоцитов [61]. Для некоторых типов злокачественных опухолей характерна избыточная экспрессия тканевого фактора [51, 61]. В исследовании Zaga и др. было продемонстрировано, что тканевый фактор, экспрессируемый на поверхности клеток рака молочной железы, вызывает генерацию тромбина, активацию и агрегацию тромбоцитов в буфере в присутствии минимального (< 1%) количества плазмы крови [62]. Кроме того, установлено, что тканевый фактор, экспрессируемый на поверхности опухолевых клеток, является триггером локальной и системной активации каскада свертывания крови и возможной причиной тромбозов у онкологических больных [61]. Liu и др. установили на мышиной модели рака молочной железы, что повышение экспрессии тканевого фактора опухолевыми клетками является критически важным для прогрессирования опухоли [63]. Авторы продемонстрировали, что введение мышам высокоаффинного ингибитора активированного фактора VII значительно тормозит рост первичной опухоли [63].

Агрегация тромбоцитов как в норме, так и при патологии происходит через специфические тромбоцитарные интегрины $\alpha_{IIb}\beta_3$, связывающиеся с белком плазмы фибриногеном [64]. *In vitro* было показано, что блокирование интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ снижает адгезию тромбоцитов к клеткам колоректального рака линий CT26 и HCT8 [65]. Эксперименты *in vivo* на мышиных моделях колоректального рака и меланомы показали, что антитела против фактора фон Виллебранда (лиганда тромбоцитарного рецептора GPIIb и интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$) предотвращают развитие легочных метастазов на 53–64% и 45%, соответственно [65].

Особый интерес в последние годы вызывает еще один тромбоцитарный белок адгезии – подоплатин [66]. Подоплатин способен напрямую связываться с лектин-подобным рецептором C-типа 2 (CLEC-2), который экспрессируется на поверхности миелоидных клеток, НК-клеток, а также тромбоцитов [67]. Takagi и др. установили, что взаимодействие между подоплатином, экспрессируемым на поверхности клеток рака легкого, и CLEC-2 тромбоцитов обеспечивает пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*, а также способствует метастазированию *in vivo* в мышиной модели [68]. Подоплатин экспрессируется почти во всех типах опухолей мягких тканей, особенно в веретенноклеточной саркоме и миксоидных опухолях. Хи и др. с помощью ПЦР в реальном времени продемонстрировали высокую экспрессию мРНК подоплатина при миксоидной липосаркоме, недифференцированной липосаркоме, злокачественных опухолях из оболочки периферических нервов, рабдомиосаркоме, лейомиосаркоме, фибросаркоме,

хондросаркоме [69]. Экспрессия подопланина в опухолевых клетках обычно ассоциирована с плохим прогнозом, особенно при глиобластоме и плоскоклеточных карциномах кожи, пищевода, головы и шеи [70, 71]. Примечательно, что при раке шейки матки [72] и плоскоклеточном раке легкого [73–75] высокая экспрессия подопланина, напротив, связана с благоприятным прогнозом. Функция подопланина в опухолевых клетках до конца не ясна. Тем не менее есть данные о его роли в эпителиально-мезенхимальном переходе и метастазировании [76, 77]. В нескольких исследованиях была продемонстрирована связь между неблагоприятным клиническим прогнозом у пациентов с солидными опухолями и повышенной концентрацией растворимого подопланина в крови [78, 79].

УЧАСТИЕ НЕЙТРОФИЛОВ В РАЗВИТИИ ОПУХОЛИ

Значительную часть опухолевого микроокружения составляют клетки иммунной системы, среди которых наиболее многочисленной группой являются нейтрофилы, ответственные за развитие процесса воспаления и во многом влияющие на опухолевый иммунитет [80]. В свете микроокружения опухоли известна особая патологическая роль гибели нейтрофилов в результате гиперактивации, сопровождаемая “высвобождением” ДНК нейтрофилов – NET-оз (neutrophil extracellular traps, NETs - внеклеточные ДНК-ловушки нейтрофилов) [81]. Тромбоциты в целом модулируют микроокружение опухоли, хотя их роль здесь разнообразна и во многом еще не исследована [82], однако не вызывает сомнений, что тромбоциты индуцируют образование ДНК-ловушек нейтрофилов [83]. NET-ы в свою очередь индуцируют свертывание крови [84], а также приводят к васкуляризации опухоли и ее развитию [85].

Показано повышение уровня NET-ов в тканях и периферической крови у пациентов с солидными опухолями [86, 87]. NET-ы, образуя своеобразную разветвленную сеть, с одной стороны маскируют опухолевые клетки от иммунной защиты организма, а с другой стороны способствуют тромбозам, что приводит к неблагоприятным исходам [88]. Одним из механизмов стимуляции NET-ы является активация нейтрофилов цитокинами G-CSF и IL-8, секретируемыми опухолевыми клетками [89], а также в результате взаимодействия с активированными тромбоцитами [90].

Следует отметить, что существует два основных механизма образования NET-ов: прижизненный и “суицидальный”. Главное отличие данных механизмов заключается в том, что при прижизненном NET-озе нейтрофилы сохраняют свои фагоцитарные функции и целостность плазматической мембраны [91]. Показано, что прижизненный NET-оз индуцируют активированные липополисахаридами тромбоциты через активацию рецептора тромбоцитов TLR4 [92]. Данный процесс протекает быстрее классического “суицидального” NET-оза, и занимает от 5 до 60 минут. Однако точные механизмы, приводящие к данному типу NET-оза, изучены недостаточно. Классический “суицидальный” NET-оз сопровождается деконденсацией хроматина и активацией эластазы и миелопероксидазы. Данный механизм в основном является зависимым от активных форм кислорода и инициируется при активации НАДФН-оксидазы [93]. Прижизненный NET-оз не зависит от активных форм кислорода, однако зависит от деминазы PAD4, участвующей в цитрулировании гистонов, но при этом не происходит активации НАДФН-оксидазы [94, 95]. Механизмы NET-оза, индуцированного тромбоцитами и тромбоцитарными микровезикулами в микроокружении опухоли, а также влияние данного процесса на опухолевый рост, изучены недостаточно и требуют исследования зависимости от таких факторов как степень активации тромбоцитов, тип и стадия опухоли и других. Также остается невыясненным вопрос, как нейтрофилы и NET-ы, образованные в результате взаимодействия с активированными тромбоцитами и тромбоцитарными микровезикулами, влияют на процессы пролиферации опухолевых клеток различного типа.

РЕГУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА СО СТОРОНЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Одним из ключевых элементов прогрессии опухоли является ее васкуляризация – образование новых сосудов, по которым опухоль может получать питательные вещества из крови. Баланс про- и анти-ангиогенных факторов управляет местом и временем образования новых сосудов, при этом ключевым проангиогенным фактором является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [96]. α -гранулы активированных тромбоцитов содержат множество про-ангиогенных факторов роста, в том числе VEGF [97, 98], однако, для его использования необходимо инициировать секрецию тромбоцитами их гранул в окрестности опухоли. При этом необходимо создать направляющий неоангиогенез градиент, роль которого, как предполагают многие авторы, играет фибрин/фибриноген [37, 99], а градиент фибрина “считывают” именно тромбоциты [100]. Отсюда следует, что в точке роста новых сосудов может быть достаточно инициировать генерацию тромбина, которая приведет к активации тромбоцитов и созданию необходимого градиента фибрина.

Тромбин играет особую роль в активации опухолевых клеток [101], так как он не только обеспечивает превращение фибриногена в фибрин, но и активирует через PAR-рецепторы тромбоциты, эндотелиоциты и опухолевые клетки [25]. Известно, что опухолевые клетки способны синтезировать эндогенный тромбин [102], однако, основной путь – это генерация тромбина по пути тканевого фактора, экспрессирующегося большинством опухолевых клеток, эндотелием сосудов опухоли, различными клетками микроокружения опухоли, на мембранах продуцируемых опухолевыми клетками везикул, таких как экзосомы [8]. Тромбин вызывает пролиферацию самих опухолевых клеток и рост опухоли через PAR-1, что приводит к переходу покоящихся клеток в S фазу за счет снижения активности $p27^{Kip1}$ и стимуляции Skp2 и циклинов D и A [103], однако, пролиферация подавляется при высоких концентрациях тромбина [104, 105]. Кроме воздействия на клеточный цикл PAR-1 также стимулирует подвижность опухолевых клеток и их защиту от апоптоза [106].

Во множестве исследований было показано, что высокая экспрессия тканевого фактора клетками опухоли коррелирует с высокой плотностью сосудов в опухоли [8]. Было показано [107], что фибробласты человека экспрессируют повышенный уровень VEGF при активации клеток тромбином или FXa через PAR-рецепторы, инициирующие кальциевую сигнализацию и активацию пути протеинкиназы C [108]. Этот путь зависит также от присутствия фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), также секретируемого из α -гранул тромбоцитов [109]. Клетки опухоли экспрессируют VEGF по аналогичному механизму через PAR-зависимую и PDGF-зависимую сигнализацию [110]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали взаимосвязь между повышенной экспрессией PAR-1 опухолевыми клетками и их инвазивным и метастатическим потенциалом, а в клинических исследованиях для некоторых опухолей экспрессия PAR-1 служила независимым неблагоприятным прогностическим маркером общей выживаемости и местного рецидивирования опухоли [111–113]. В частности, при прививании нокаутным по PAR-1 мышам опухоли у трансгенных животных рост опухоли происходил медленнее, чем у животных дикого типа, хотя пальпируемые новообразования появлялись в одно и то же время [114].

Кроме проангиогенного тромбин может оказывать также и анти-ангиогенное действие: при активации тромбин отщепляет от тромбоцитарного рецептора PAR-1 пептид парстатин, а от коллагена межклеточного матрикса – эндостатин, которые подавляют рост опухоли и васкуляризацию [115, 116]. Кроме того, тромбоцитарные гранулы содержат и антиангиогенные факторы и пептиды [117], в том числе эндостатин, подавляющие рост сосудов [118]. Таким образом, вопрос, как опухолевые клетки используют тромбоциты для стимуляции неоангиогенеза, остается открытым.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И ТРОМБОЦИТЫ

Выживание циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в кровотоке имеет решающее значение для метастазирования [119]. Не более 0.1% ЦОК выживает в кровотоке более 24 часов, а время полужизни одиночных циркулирующих опухолевых клеток составляет примерно 1 час [120]. Комплексы циркулирующих опухолевых клеток с тромбоцитами, обнаруживаемые как в мышинных моделях [121–123], так и *in vivo* [124], как предполагается, могут играть роль в защите ЦОК от клеток иммунной системы [121, 125].

Кроме того, известно, что на поверхности многих опухолевых клеток снижена экспрессия главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса [126], что позволяет им избежать уничтожения цитотоксическими Т-лимфоцитами [123]. Placke и др. установили *in vitro*, что при со-инкубации тромбоцитов с клетками различных опухолей происходит перенос молекул МНС I класса на поверхность опухолевых клеток, что было подтверждено электронной микроскопией [127]. Таким образом было установлено, что благодаря взаимодействию с тромбоцитами опухолевые клетки способны приобретать “псевдонормальный” фенотип, экспрессировать на своей поверхности МНС I класса и тем самым “ускользать” от распознавания NK-клетками.

Кроме того, установлена роль секретируемого тромбоцитами TGF- β в ингибировании противоопухолевой активности NK-клеток [128]. Корр и др. продемонстрировали, что инкубация NK-клеток с TGF- β , секретируемым тромбоцитами как после взаимодействия с опухолевыми клетками линии НСТ116 (колоректальный рак), так и после стимуляции тромбоцитов “классическими” активаторами (коллагеном и тромбином), способствует снижению цитотоксичности NK-клеток, уменьшению продукции интерферона альфа и мобилизации гранул [128]. Полученные результаты подтверждают способность тромбоцитов способствовать метастазированию опухолевых клеток путем подавления иммунного ответа.

Таким образом, данные, полученные *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что взаимодействия тромбоцитов с опухолевыми клетками играют важную роль в развитии и прогрессировании онкологических заболеваний.

УЧАСТИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ В РАЗВИТИИ ОПУХОЛИ

Внеклеточные везикулы – общий термин, используемый для обозначения трех типов везикул: микрочастиц, экзосом и апоптотических телец [51]. Микровезикулы представляют собой небольшие (диаметром от 50 до 1000 нм) мембранные пузырьки, которые отделяются от клеток под действием различных стимулов, во время апоптоза или вследствие опухолевой трансформации [51]. Одной из главных функций микровезикул является обеспечение межклеточной коммуникации [129].

Nillson и соавт. [130] описали прямой захват РНК тромбоцитами, коинкубированными с микровезикулами опухолевых клеток. Показано, что в тромбоцитах здоровых доноров после инкубации с микровезикулами клеток глиобластомы была обнаружена мРНК мутантного EGFRvIII (мутантного варианта гена мембранного рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), который наблюдается при глиобластоме [131]).

Показано увеличение содержания тромбоцитарных микровезикул в плазме крови при онкологических заболеваниях, однако, их роль в прогрессировании опухоли противоречива и остается до конца неизученной [132, 133]. С одной стороны, тромбоцитарные микровезикулы содержат адгезионные молекулы и рецепторный аппарат тромбоцитов, а также ряд цитокинов (PDGF, bFGF и VEGF), участвующих в ангиогенезе и метастазировании опухоли [132, 134]. С другой стороны, микровезикулы тромбоцитов содержат малые интерферирующие РНК (микроРНК), участвующие в регуляции онкогенов и опухолевых супрессоров. Показано, что тромбоцитарные микровезикулы

проникают в опухоль, перенося содержащиеся в них микроРНК в опухолевые клетки [135–137]. В зависимости от типа опухоли микроРНК, содержащиеся в тромбоцитарных микровезикулах (микроРНК-155, микроРНК-233, микроРНК-195, микроРНК-24, микроРНК-27 и др.), могут оказывать как позитивное, так и негативное действие на прогрессирование опухоли и рассматриваться в качестве диагностических и прогностических маркеров онкологических заболеваний [138, 139]. Так, показано, что микроРНК-24, переносимая с помощью тромбоцитарных микровезикул в опухолевые клетки карциномы легкого, индуцирует апоптоз за счет супрессии гена *mt-ND2* (НАДФН-дегидрогеназа) и малой РНК *Snora-75* [135], а микроРНК-223 способствует опухолевой инвазии за счет супрессии гена *EPB41L3* при данной патологии [137].

Таким образом, можно считать, что микровезикулы являются универсальным механизмом “общения” между клетками крови. Так как тромбоциты являются безъядерными клетками, *de novo* синтез белков в них зависит от мРНК состава, унаследованного от мегакариоцитов – с течением времени количество мРНК в тромбоцитах уменьшается, что является одним из признаков их старения [140]. Было продемонстрировано, что полученные из микровезикул мРНК также могут приводить к синтезу белков в тромбоцитах, которые не присутствуют в тромбоцитах здоровых доноров [141]. Данный механизм используется клетками опухолей для “обучения” тромбоцитов [142]. Также клетки опухолей способны индуцировать альтернативный сплайсинг пре-мРНК в тромбоцитах, что аналогично приводит к изменению белкового состава тромбоцитов [143]. “Обучение” тромбоцитов не зависит от непосредственного контакта тромбоцитов с клетками опухолей, что было продемонстрировано путем ингибирования активации основных адгезионных рецепторов тромбоцитов – Р-селектина, $\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIIb [144].

“Обученные” опухолями тромбоциты дополнительно способствуют росту опухолей за счет секреции VEGF, PDGF и bFGF и индукции секреции данных факторов другими клетками [142]. При увеличении концентрации данных факторов в области локализации опухоли создается среда, благоприятная для роста опухоли [145].

“Обученные” опухолями тромбоциты являются перспективным биомаркером в контексте онкологических заболеваний [142, 146]. Показано, что анализ транскриптома тромбоцитов может с вероятностью в 96% указать на наличие, а с вероятностью 71% – местоположение опухоли, а также на степень ее развития [143]. В настоящее время предложен первый протокол по исследованию тромбоцитарного транскриптома в целях диагностики онкологических заболеваний. “Обученные” опухолями тромбоциты могут быть использованы для мониторинга эффективности терапии рака – при терапии пациента кризотинибом было показано снижение EML4-ALK транскриптов в циркулирующих тромбоцитах [144]. Так как средний срок жизни тромбоцитов составляет 7–10 дней, транскрипты онкологического происхождения могут накапливаться в тромбоцитах, будучи защищенными от присутствующих в плазме крови РНК-аз [142–144]. Таким образом, анализ транскриптома тромбоцитов может быть использован в качестве теста, отражающего динамику развития опухоли наиболее точно [147].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ТРОМБОЦИТЫ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Таким образом, тромбоциты являются потенциальной мишенью при противоопухолевой терапии, что, естественно, привело к множеству клинических и доклинических исследований применения антитромбоцитарных препаратов при онкологических заболеваниях [148]. Ретроспективный анализ 539 онкологических больных, перенесших установку порта, показал, что у 19% наблюдалось по крайней мере одно осложнение, при этом более низкая частота осложнений наблюдалась у пациентов, получавших

терапевтические антикоагулянты или антиагреганты [149]. Антиагрегантная терапия может предотвратить микрометастазы внутрипеченочных клеток холангиокарциномы путем ингибирования активации тромбоцитов и образования внеклеточных ловушек нейтрофилов [150]. Сочетание антитромбоцитарных препаратов, ацетилсалициловой кислоты и АДФ-азы АРТ102 может значительно уменьшить метастазы рака молочной железы и меланомы в кости у мышей с меньшим количеством кровотечений, чем наблюдалось при ингибировании тромбоцитарных интегринов [151]. Сочетание дипиридамола и RA-233 приводило к значительному уменьшению метастазирования у голых мышей [152]. Однако, за исключением аспирина, для которого большинство исследований говорят о положительных результатах, клинические данные о положительном эффекте антитромбоцитарных препаратов при раке все еще в значительной степени недостаточны [153–155].

Одним из важных ограничений антитромбоцитарной, как и антикоагулянтной, терапии у онкологических больных является риск кровотечений, особенно возрастающий в сочетании с тромбоцитопенией, возникающей при некоторых видах онкологии [156]. В свете этого новые мишени для антитромбоцитарной терапии – GPIIb/IIIa [65], GPVI [157] и PAR [112] в перспективе могут быть решением данного вопроса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тромбоциты – клеточные фрагменты мегакариоцитов, образующие агрегат в месте повреждения сосуда, задействованы в прогрессии онкологических заболеваний. В настоящее время роль тромбоцитов в онкологии считается скорее негативной. Опухолевые клетки могут напрямую взаимодействовать с тромбоцитами через пары Р-селектин-PSGL-1, CD40L-CD40, CLEC-2-подопланин, $\alpha_{IIb}\beta_3$ -фибриноген-Mac-1 и др., вызывая их агрегацию и активацию в месте контакта опухоли с кровотоком. Активация тромбоцитов может приводить к рак-ассоциированному тромбозу как напрямую, так и через индукцию образования ДНК-ловушек нейтрофилов микроокружения опухоли. Кроме того, при активации тромбоциты секретируют множество факторов роста, стимулирующих пролиферацию клеток опухоли, а также ключевые проангиогенные факторы – VEGF и PDGF, суммарно сдвигающие онкологический процесс во II–III стадию. Считается, что способность клеток опухоли образовывать гетероагрегаты с тромбоцитами является определяющей для выживания циркулирующих опухолевых клеток в кровотоке и метастазирования через кровь. Кроме непосредственного контакта опухоль индуцирует активацию тромбоцитов как минимум двумя путями: через плазменное звено свертывания, запускаемое тканевым фактором на поверхности опухолевых клеток, и через взаимный обмен микровезикулами, содержащими различные РНК (рис. 1).

Несмотря на то, что ингибирование активации тромбоцитов при онкологических заболеваниях было предложено и апробировано еще полвека назад, до сих пор нет однозначности в использовании антитромбоцитарной терапии при онкологии. В первую очередь это связано с возникновением кровотечений даже при постоянном приеме самого безопасного из существующих антиагрегантов – аспирина на фоне нормального тромбоцитарного гемостаза.

Таким образом, в настоящее время нет сомнений, что опухоль активно “использует” тромбоциты в процессе своего развития, поэтому воздействие на тромбоциты могло бы быть перспективной мишенью при ведении онкологических больных. Однако большое количество “черных пятен” в нашем представлении о ежедневном функционировании тромбоцитов в физиологической ситуации не дает полноценно оценить роль тромбоцитов в онкологических заболеваниях и предложить персонализированные подходы к подбору антитромбоцитарной и/или антикоагулянтной терапии.

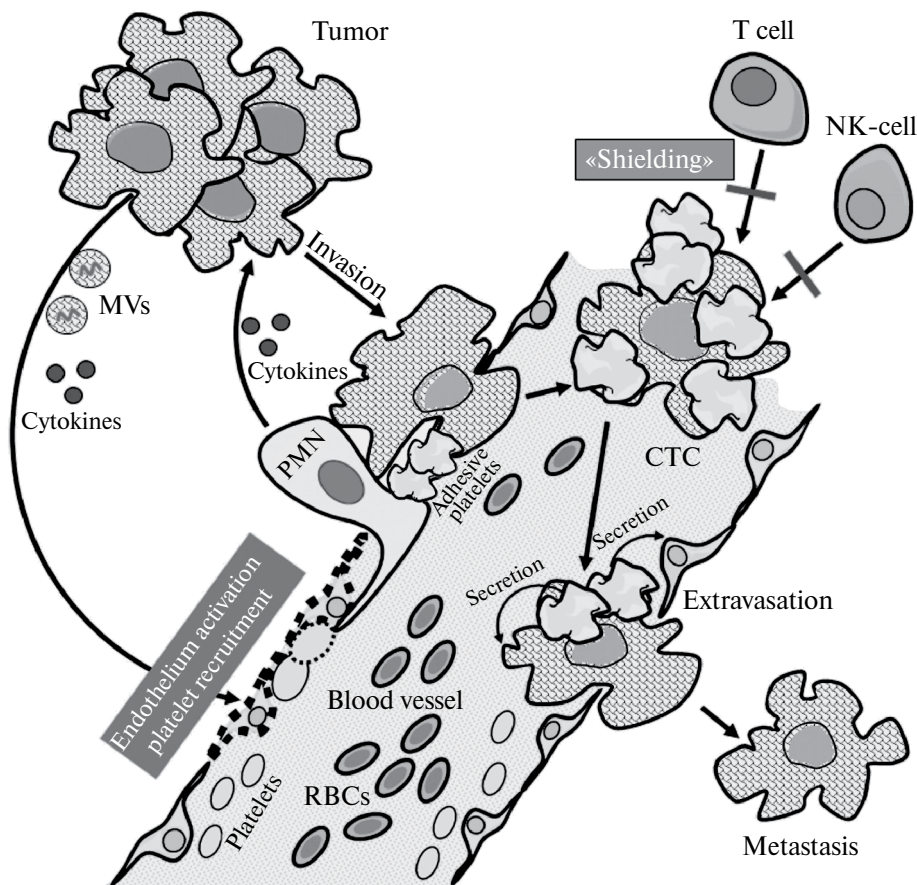


Рис. 1. Схема участия тромбоцитов в метастазировании опухоли. Под действием микроокружения опухоль (Tumor) секретирует цитокины (Cytokines) и микровезикулы (MV), действующие на эндотелий и приводящие к его активации и рекрутированию тромбоцитов (platelets) в окрестность опухоли. Адгезия и активация тромбоцитов и эндотелия (показана пунктирным контуром) приводит к рекрутированию лейкоцитов (PMN), их экстравазации, секреции цитокинов и факторов роста активированными тромбоцитами и лейкоцитами и стимуляции инвазии опухолевой клетки в сосуд. В сосуде к опухолевой клетке адгезируют тромбоциты, и она становится циркулирующей опухолевой клеткой (CTC), защищенной («Shielding») от распознавания иммунной системой (T cell, NK-cell). В месте экстравазации также локализуются тромбоциты, секретирующие содержимое своих гранул (secretion), что способствует экстравазации опухолевой клетки и ее пролиферации на новом месте – образованию метастаза (Metastasis).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № Б23РНФ-162) и Российского научного фонда (проект № 23-45-10039). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и анализ литературы (А.Н.С. и Е.В.Ш.), сбор данных (А.Н.С., И.П.Т., С.А.К., Е.В.Ш.), написание и редактирование манускрипта (А.Н.С., И.П.Т., С.А.К., Е.В.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F* (2019) Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144: 1941–1953.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
2. *Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A* (2016) Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66: 271–289.
<https://doi.org/10.3322/caac.21349>
3. *Fernandes CJ, Morinaga LTK, Alves JL, Castro MA, Calderaro D, Jardim CVP, Souza R* (2019) Cancer-associated thrombosis: The when, how and why. *Eur Respir Rev* 28: 1–11.
<https://doi.org/10.1183/16000617.0119-2018>
4. *Khorana AA* (2009) Cancer and thrombosis: Implications of published guidelines for clinical practice. *Ann Oncol* 20: 1619–1630.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdp068>
5. *Lee AYY, Levine MN* (2003) Venous thromboembolism and cancer: Risks and outcomes. *Circulation* 107: 17–21.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000078466.72504.AC>
6. *Falanga A, Marchetti M* (2023) Cancer-associated thrombosis: enhanced awareness and pathophysiologic complexity. *J Thromb Haemost* 21: 1397–1408.
<https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.02.029>
7. *Sharma D, Brummel-Ziedins KE, Bouchard BA, Holmes CE* (2014) Platelets in tumor progression: A host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. *J Cell Physiol* 229: 1005–1015.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24539>
8. *Коваленко ТА, Пантелеев МА, Свешникова АН* (2019) Роль тканевого фактора в метастазировании, неоангиогенезе и гемостазе при онкологических заболеваниях. *Онкогематология* 14: 70–85. [*Kovalenko TA, Panteleev MA, Sveshnikova AN* (2019) The role of tissue factor in metastasising, neoangiogenesis and hemostasis in cancer. *Oncohematology* 14: 70–85. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2019-14-2-70-85>
9. *Machlus KR, Thon JN, Italiano JE* (2014) Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: A review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol* 165: 227–236.
<https://doi.org/10.1111/bjh.12758>
10. *Laki K* (1972) Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences. *Ann N Y Acad Sci* 202: 297–307.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1972.tb16342.x>
11. *Филькова АА, Пантелеев МА, Свешникова АН* (2019) Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная значимость. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в педиатр* 18: 120–129. [*Filkova AA, Panteleev MA, Sveshnikova AN* (2019) Reversible platelet aggregation in the presence of calcium ions: mechanisms and potential value. *Pediatr Hematol/Oncol Immunopathol* 18(3): 120–129. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24287/1726-1708-2019-18-3-120-129>
12. *Sveshnikova A, Stepanyan M, Panteleev M* (2021) Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: responses. *SBP Reports* 1: 20.
<https://doi.org/10.52455/sbp.01.202101014>
13. *Golebiewska EM, Poole AW* (2015) Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 29: 153–162.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>
14. *Lood C, Amisten S, Gullstrand B, Jönson A, Allhorn M, Truedsson L, Sturfelt G, Erlinge D, Bengtsson AA* (2010) Platelet transcriptional profile and protein expression in patients with systemic lupus erythematosus: Up-regulation of the type I interferon system is strongly associated with vascular disease. *Blood* 116: 1951–1957.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-274605>

15. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327: 580–583.
<https://doi.org/10.1126/science.1181928>
16. Best MG, Vancura A, Wurdinger T (2017) Platelet RNA as a circulating biomarker trove for cancer diagnostics. *J Thromb Haemost* 15: 1295–1306.
<https://doi.org/10.1111/jth.13720>
17. Martyanov A, Pantelev M (2021) Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 2: receptors. *SBP Rep* 1: 13–30.
<https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103013>
18. Sveshnikova A (2021) Hubs and Webs in Platelet IntraCell. Signal. *SBP Rep* 1: 31–32.
<https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103014>
19. Подоплелова НА, Сулимов ВБ, Ташилова АС, Ильин ИС, Пантелеев МА, Леденева ИВ, Шихалиев ХС (2020) Свертывание крови в XXI веке: новые знания, методы и перспективы для терапии. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в педиатр* 19: 139–157. [Podoplelova NA, Sulimov VB, Ilin IS, Tashilova AS, Pantelev MA, Ledeneva IV, Shikhaliev KS (2020) Blood coagulation in the 21st century: existing knowledge, current strategies for treatment and perspective. *Pediatr Hematol/Oncol Immunopathol* 19: 139–157. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157>
20. Shibeko AM, Pantelev MA (2016) Untangling the complexity of blood coagulation network: Use of computational modelling in pharmacology and diagnostics. *Brief Bioinform* 17: 429–439.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbv040>
21. Matafonov A, Cheng Q, Geng Y, Verhamme IM, Umunakwe O, Tucker EI, Sun MF, Serebrov V, Gruber A, Gailani D (2013) Evidence for factor IX-independent roles for factor XIa in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 11: 2118–2127.
<https://doi.org/10.1111/jth.12435>
22. Meijers JCM (2009) Feedback controversy stops here. *Blood* 114: 235.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-217117>
23. Бутылин АА, Пантелеев МА, Атауллаханов ФИ (2007) Пространственная динамика свертывания крови. *Рос хим журн* 51: 45–50. [Butylin AA, Pantelev MA, Ataullakhanov FI (2007) Spatial dynamics of blood coagulation. *Russ Chem J* 51: 45–50. (In Russ)].
24. Podoplelova NA, Nechipurenko DY, Ignatova AA, Sveshnikova AN, Pantelev MA (2021) Procoagulant platelets: mechanisms of generation and action. *Hämostaseologie* 41: 146–153.
<https://doi.org/10.1055/a-1401-2706>
25. Sveshnikova AN, Balatskiy AV, Demianova AS, Shepelyuk TO, Shakhidzhanov SS, Balatskaya MN, Pichugin AV, Ataullakhanov FI, Pantelev MA (2016) Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J Thromb Haemost* 14: 2045–2057.
<https://doi.org/10.1111/jth.13442>
26. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC (1968) Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 46–52.
<https://doi.org/10.1073/pnas.61.1.46>
27. Sylman JL, Boyce HB, Mitrugno A, Tormoen GW, Thomas I-C, Wagner TH, Lee JS, Leppert JT, McCarty OJT, Mallick P (2018) A Temporal Examination of Platelet Counts as a Predictor of Prognosis in Lung, Prostate, and Colon Cancer Patients. *Sci Rep* 8: 6564.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25019-1>
28. Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K (2017) C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost* 15: 513–525.
<https://doi.org/10.1111/jth.13604>
29. Borsig L (2008) The role of platelet activation in tumor metastasis. *Exp Rev Anticancer Ther* 8: 1247–1255.
<https://doi.org/10.1586/14737140.8.8.1247>
30. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H (2001) Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 98: 2720–2725
<https://doi.org/10.1182/blood.v98.9.2720>
31. Wan S, Lai Y, Myers RE, Li B, Hyslop T, London J, Chatterjee D, Palazzo JP, Burkart AL, Zhang K, Xing J, Yang H (2013) Preoperative platelet count associates with survival and distant metastasis in surgically resected colorectal cancer patients. *J Gastrointest Cancer* 44: 293–304.
<https://doi.org/10.1007/s12029-013-9491-9>

32. Shimada H, Oohira G, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Hayashi H, Takeda A, Gunji Y, Ochiai T (2004) Thrombocytosis associated with poor prognosis in patients with esophageal carcinoma. *J Am Coll Surg* 198: 737–741.
<https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.01.022>
33. Eggemann H, Ehrlicke J, Ignatov T, Fettke F, Semczuk A, Costa SD, Ignatov A (2015) Platelet count after chemotherapy is a predictor for outcome for ovarian cancer patients. *Cancer Invest* 33: 193–196.
<https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1020384>
34. Giannakeas V, Kotsopoulos J, Brooks JD, Cheung MC, Rosella L, Lipscombe L, Akbari MR, Austin PC, Narod SA (2022) Platelet count and survival after cancer. *Cancers* 14: 549.
<https://doi.org/10.3390/cancers14030549>
35. Dovizio M, Ballerini P, Fullone R, Tacconelli S, Contursi A, Patrignani P (2020) Multifaceted functions of platelets in cancer: from tumorigenesis to liquid biopsy tool and drug delivery system. *Int J Mol Sci* 21: 9585.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249585>
36. Jin DK, Shido K, Kopp H-G, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avecilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D, Rafii S (2006) Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med* 12: 557–567.
<https://doi.org/10.1038/nm1400>
37. Kaiser R, Escaig R, Nicolai L (2023) Hemostasis without clot formation – how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy. *Blood* 142: 1413–1425.
<https://doi.org/10.1182/blood.2023020535>
38. Chater C, Bauters A, Beugnet C, M’Ba L, Rogosnitzky M, Zerbib P (2018) Intraplatelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor: new biomarkers in carcinoembryonic antigen-negative colorectal cancer? *Gastrointest Tumors* 5: 32–37.
<https://doi.org/10.1159/000486894>
39. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O’Reilly T, Persohn E, Rosel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreys J, Martiny-Baron G, Totzke F (2000) PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 60: 2178–2189.
40. Kim SJ, Uehara H, Yazici S, Langley RR, He J, Tsan R, Fan D, Killion JJ, Fidler IJ (2004) Simultaneous blockade of platelet-derived growth factor-receptor and epidermal growth factor-receptor signaling and systemic administration of paclitaxel as therapy for human prostate cancer metastasis in bone of nude mice. *Cancer Res* 64: 4201–4208.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3763>
41. Hu Q, Hisamatsu T, Haemmerle M, Cho MS, Pradeep S, Rupaimoole R, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Wong STC, Sood AK, Afshar-Kharghan V (2017) Role of platelet-derived Tgfβ1 in the progression of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 23: 5611– 5621.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3272>
42. Assoian RK, Sporn MB (1986) Type B transforming growth factor in human platelets. *J Cell Biol* 102: 1217–1223
43. Labelle M, Begum S, Hynes RO (2011) Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20: 576–590.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>
44. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428.
<https://doi.org/10.1172/JCI39104>
45. Radziwon-Balicka A, Santos-Martinez MJ, Corbalan JJ, O’Sullivan S, Treumann A, Gilmer JF, Radomski MW, Medina C (2014) Mechanisms of platelet-stimulated colon cancer invasion: Role of clusterin and thrombospondin 1 in regulation of the P38MAPK-MMP-9 pathway. *Carcinogenesis* 35: 324–332.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt332>
46. Labelle M, Begum S, Hynes RO (2014) Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E3053–3061.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1411082111>
47. Tang Y, Qian C, Zhou Y, Yu C, Song M, Zhang T, Min X, Wang A, Zhao Y, Lu Y (2023) Activated platelets facilitate hematogenous metastasis of breast cancer by modulating the PDGFR-β/COX-2 axis. *Science* 26: 107704.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107704>

48. *Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR* (2004) Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 104: 397–401.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0434>
49. *Drew DA, Cao Y, Chan AT* (2016) Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 16: 173–186.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.4>
50. *Rachidi S, Metelli A, Riesenberger B, Wu BX, Nelson MH, Wallace C, Paulos CM, Rubinstein MP, Garrett-Mayer E, Hennig M, Bearden DW, Yang Y, Liu B, Li Z* (2017) Platelets subvert T cell immunity against cancer via GARP-TGFbeta axis. *Sci Immunol* 2: eaai7911.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai7911>
51. *Plantureux L, Mège D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L* (2018) Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Cancers* 10: 1–23.
<https://doi.org/10.3390/cancers10110441>
52. *Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Penin F, Tabone E, Lizard G, Bailly M, McGregor JL* (1994) Human melanoma cell lines differ in their capacity to release ADP and aggregate platelets. *Br J Haematol* 87: 763–772.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1994.tb06736.x>
53. *Heinmöller E, Weinle RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, Müller KM, Zirngibl H* (1996) Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 735–744.
<https://doi.org/10.1007/bf01209121>
54. *Sakai H, Suzuki T, Takahashi Y, Ukai M, Tauchi K, Fujii T, Horikawa N, Minamimura T, Tabuchi Y, Morii M, Tsukada K, Takeguchi N* (2006) Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A2. *FEBS Letters* 580: 3368–3374.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.007>
55. *Cathcart MC, Gately K, Cummins R, Kay E, O'Byrne KJ, Pidgeon GP* (2011) Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 10: 1–14.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-25>
56. *Kajita S, Ruebel KH, Casey MB, Nakamura N, Lloyd RV* (2005) Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I 2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Mod Pathol* 18: 221–227.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800285>
57. *De Leval X, Benoit V, Delarge J, Julémont F, Masereel B, Pirotte B, Merville MP, David JL, Dogné JM* (2003) Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation. *Prostagland Leukot Essent Fatty Acids* 68: 55–59.
[https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00235-1)
58. *Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV* (2000) Thromboxane A2 regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 245–251.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1840>
59. *Carlsson K, Freskgård PO, Persson E, Carlsson U, Svensson M* (2003) Probing the interface between factor Xa and tissue factor in the quaternary complex tissue factor-factor VIIa-factor Xa-tissue factor pathway inhibitor. *Eur J Biochem* 270: 2576–2582.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03625.x>
60. *MacKman N, Taubman M* (2009) Tissue factor: past, present, and future. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1986–1988.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.198929>
61. *Ruf W, Yokota N, Schaffner F* (2010) Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 125: 36–38.
[https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(10\)70010-4](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(10)70010-4)
62. *Zarà M, Canobbio I, Visconte C, Canino J, Torti M, Guidetti GF* (2018) Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells. *Cell Signal* 48: 45–53.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.04.008>
63. *Liu Y, Jiang P, Capkova K, Xue D, Ye L, Sinha SC, Mackman N, Janda KD, Liu C* (2011) Tissue factor-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment is critical for tumor progression and an effective target for therapy. *Cancer Res* 71: 6492–6502.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1145>

64. *Calvete JJ* (1995) On the structure and function of platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 346–360.
<https://doi.org/10.3181/00379727-208-43863A>
65. *Karparkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, Collier BS* (1988) Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest* 81: 1012–1019.
<https://doi.org/10.1172/JCI113411>
66. *Zimmer G, Oeffner F, Von Messling V, Tschernig T, Gröne HJ, Klenk HD, Herrler G* (1999) Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J* 341: 277–284.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021.3410277>
67. *Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y* (2011) Novel platelet activation receptor CLEC-2: From discovery to prospects. *J Thromb Haemost* 9: 44–55.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04335.x>
68. *Takagi S, Sato S, Ohhara T, Takami M, Koike S, Mishima Y, Hatake K, Fujita N* (2013) Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between aggrus/podoplanin and CLEC-2. *PLoS One* 8: 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073609>
69. *Xu Y, Ogose A, Kawashima H, Hotta T, Ariizumi T, Li G, Umezu H, Endo N* (2011) High-level expression of podoplanin in benign and malignant soft tissue tumors: Immunohistochemical and quantitative real-time RT-PCR analysis. *Oncol Rep* 25: 599–607.
<https://doi.org/10.3892/or.2011.1141>
70. *Renart J, Carrasco-Ramírez P, Fernández-Muñoz B, Martín-Villar E, Montero L, Yurrita MM, Quintanilla M* (2015) New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. In: *International review of cell and molecular biology*. Elsevier. 185–239.
71. *Ugorski M, Dziegiel P, Suchanski J* (2016) Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res* 6: 370–386.
72. *Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G* (2005) Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol* 18: 97–104.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800269>
73. *Ito T, Ishii G, Nagai K, Nagano T, Kojika M, Murata Y, Atsumi N, Nishiwaki Y, Miyazaki E, Kumamoto T, Ochiai A* (2009) Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage IB squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lung Cancer* 63: 418–424.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.06.008>
74. *Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A* (2009) Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci* 100: 2054–2059.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01295.x>
75. *Suzuki H, Onimaru M, Koga T, Takeshita M, Yano T, Maehara Y, Nakamura S, Sueishi K* (2011) High podoplanin expression in cancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 207: 111–115.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2010.11.006>
76. *Martin-Villar E, Megías D, Castel S, Yurrita MM, Vilaró S, Quintanilla M* (2006) Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 119: 4541–4553.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03218>
77. *Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G* (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9: 261–272.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.010>
78. *Zhao X, Pan Y, Ren W, Shen F, Xu M, Yu M, Fu J, Xia L, Ruan C, Zhao Y* (2018) Plasma soluble podoplanin is a novel marker for the diagnosis of tumor occurrence and metastasis. *Cancer Sci* 109: 403–411.
<https://doi.org/10.1111/cas.13475>
79. *Sankiewicz A, Guszcz T, Mena-Hortelano R, Zukowski K, Gorodkiewicz E* (2016) Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder cancer. *Cancer Biomark* 16: 343–350.
<https://doi.org/10.3233/CBM-160572>
80. *Yang C, Wang Z, Li L, Zhang Z, Jin X, Wu P, Sun S, Pan J, Su K, Jia F, Zhang L, Wang H, Yu X, Shao X, Wang K, Qiu F, Yan J, Huang J* (2021) Aged neutrophils form mitochondria-dependent vital NETs to promote breast cancer lung metastasis. *J Immunother Cancer* 9: e002875.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002875>

81. Liu S, Wu W, Du Y, Yin H, Chen Q, Yu W, Wang W, Yu J, Liu L, Lou W, Pu N (2023) The evolution and heterogeneity of neutrophils in cancers: origins, subsets, functions, orchestrations and clinical applications. *Mol Cancer* 22: 148.
<https://doi.org/10.1186/s12943-023-01843-6>
82. Huang PT, Nguyen LT, Nguyen X-B, Lee SK, Bach D-H (2019) The role of platelets in the tumor-microenvironment and the drug resistance of cancer cells. *Cancers* 11: 240.
<https://doi.org/10.3390/cancers11020240>
83. Constantinescu-Bercu A, Grassi L, Frontini M, Salles-Crawley II, Woollard K, Crawley JT (2020) Activated $\alpha\text{IIb}\beta_3$ on platelets mediates flow-dependent NETosis via SLC44A2. *eLife* 9: e53353.
<https://doi.org/10.7554/eLife.53353>
84. Thälin C, Hisada Y, Lundström S, Mackman N, Wallén H (2019) Neutrophil extracellular traps: villains and targets in arterial, venous, and cancer-associated thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 1724–1738.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312463>
85. Poto R, Cristinziano L, Modestino L, de Paulis A, Marone G, Loffredo S, Galdiero MR, Varicchi G (2022) Neutrophil extracellular traps, angiogenesis and cancer. *Biomedicines* 10: 431.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10020431>
86. Li Y, Yang Y, Gan T, Zhou J, Hu F, Hao N, Yuan B, Chen Y, Zhang M (2019) Extracellular RNAs from lung cancer cells activate epithelial cells and induce neutrophil extracellular traps. *Int J Oncol* 55: 69–80.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4808>
87. Richardson JJR, Hendrickse C, Gao-Smith F, Thickett DR (2017) Neutrophil Extracellular trap production in patients with colorectal cancer in vitro. *Int J Inflam* 2017: 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2017/4915062>
88. Palacios-Acedo AL, Mège D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L (2019) Platelets, thrombo-inflammation, and cancer: collaborating with the enemy. *Front Immunol* 10: 1805.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01805>
89. Olsson AK, Cedervall J (2018) The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets* 29: 569–573.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1453059>
90. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR (2012) Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 122: 2661–2671.
<https://doi.org/10.1172/JCI61303>
91. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M (2016) New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. *Front Immunol* 7: 302.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00302>
92. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, DeVinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13: 463–469.
<https://doi.org/10.1038/nm1565>
93. Vorobjeva NV, Chernyak BV (2020) NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry* 85: 1178–1190.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920100065>
94. Tatsiy O, McDonald PP (2018) Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front Immunol* 9: 2036.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>
95. Kraaij T, Tengström FC, Kamerling SWA, Pusey CD, Scherer HU, Toes REM, Rabelink TJ, van Kooten C, Teng YKO (2016) A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. *Autoimmun Rev* 15: 577–584.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.018>
96. Dhar S, Sarkar T, Sa G (2022) Neoangiogenesis and immune-regulation: Two armour of VEGF in the tumor microenvironment. *J Breast Cancer Res* 2: 28–39.
<https://doi.org/10.46439/breastcancer.2.015>
97. Deppermann C, Kraft P, Volz J, Schuhmann MK, Beck S, Wolf K, Stegner D, Stoll G, Nieswandt B (2017) Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood* 129: 1702–1706.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-750711>

98. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ (2016) Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest* 20: 2353–2360.
<https://doi.org/10.1007/s00784-016-1719-1>
99. Petersen MA, Ryu JK, Akassoglou K (2018) Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat Rev Neurosci* 19: 283–301.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2018.13>
100. Nicolai L, Schiefelbein K, Lipsky S, Leunig A, Hoffknecht M, Pekayvaz K, Raude B, Marx C, Ehrlich A, Pircher J, Zhang Z, Saleh I, Marel A-K, Löf A, Petzold T, Lorenz M, Stark K, Pick R, Rosenberger G, Weckbach L, Uhl B, Xia S, Reichel CA, Walzog B, Schulz C, Zheden V, Bender M, Li R, Massberg S, Gaertner F (2020) Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun* 11: 5778.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19515-0>
101. Ebrahimi S, Rahmani F, Behnam-Rassouli R, Hoseinkhani F, Parizadeh MR, Keramati MR, Khazaei M, Avan A, Hassanian SM (2017) Proinflammatory signaling functions of thrombin in cancer. *J Cell Physiol* 232: 2323–2329.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25753>
102. Sloan AR, Lee-Potursalski C, Hoffman HC, Harris PL, Elder TE, Richardson B, Kerstetter-Fogle A, Cioffi G, Schroer J, Desai A, Cameron M, Barnholtz-Sloan J, Rich J, Jankowsky E, Sen Gupta A, Sloan AE (2022) Glioma stem cells activate platelets by plasma-independent thrombin production to promote glioblastoma tumorigenesis. *Neuro-Oncol Adv* 4(1): vdac172.
<https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdac172>
103. Green D, Karpatkin S (2010) Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle* 9: 656–661.
<https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10729>
104. Zain J, Huang Y-Q, Feng X, Nierodzik ML, Li J-J, Karpatkin S (2000) Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood* 95: 3133–3138.
<https://doi.org/10.1182/blood.V95.10.3133>
105. Wang T (2012) The activation of protease-activated receptor 1 mediates proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep* 28: 255–261.
<https://doi.org/10.3892/or.2012.1802>
106. Chang L-H, Chen C-H, Huang D-Y, Pai H-C, Pan S-L, Teng C-M (2011) Thrombin induces expression of twist and cell motility via the hypoxia-inducible factor-1 α translational pathway in colorectal cancer cells. *J Cell Physiol* 226: 1060–1068.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22428>
107. Ollivier V, Chabbat J, Herbert JM, Hakim J, de Prost D (2000) Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1374–1381.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1374>
108. Ollivier V, Bentolila S, Chabbat J, Hakim J, de Prost D (1998) Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 91: 2698–2703.
<https://doi.org/10.1182/blood.V91.8.2698.2698>
109. Uusitalo-Jarvinen H, Kurokawa T, Mueller BM, Andrade-Gordon P, Friedlander M, Ruf W (2007) Role of protease activated receptor 1 and 2 signaling in hypoxia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1456–1462.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.142539>
110. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn KV (2017) Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastas Rev* 36: 249–262.
<https://doi.org/10.1007/s10555-017-9673-1>
111. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV (2015) Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastas Rev* 34: 775–796.
<https://doi.org/10.1007/s10555-015-9599-4>
112. Liu X, Yu J, Song S, Yue X, Li Q (2017) Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer. *Oncotarget* 8: 107334–107345.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21015>
113. Adams GN, Sharma BK, Rosenfeldt L, Frederick M, Flick MJ, Witte DP, Mosnier LO, Harmel-Laws E, Steinbrecher KA, Palumbo JS (2018) Protease-activated receptor-1 impedes prostate and intestinal tumor progression in mice. *J Thromb Haemost* 16: 2258–2269.
<https://doi.org/10.1111/jth.14277>

114. Adams GN, Rosenfeldt L, Frederick M, Miller W, Waltz D, Kombrinck K, McElhinney KE, Flick MJ, Monia BP, Revenko AS, Palumbo JS (2015) Colon cancer growth and dissemination relies upon thrombin, stromal PAR-1, and fibrinogen. *Cancer Res* 75: 4235–4243. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0964>
115. Gartaganis PS, Cotsiki M, Anastassiou ED, Tsopanoglou NE, Melachrinou MD (2020) Parstatin inhibits viability of human retinal pigment epithelium cells: an in vitro cytotoxicity study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24: 5111–5117. https://doi.org/10.26355/eurev_202005_21204
116. Zhang Z, Liu X, Shen Z, Quan J, Lin C, Li X, Hu G (2021) Endostatin in fibrosis and as a potential candidate of anti-fibrotic therapy. *Drug Deliv* 28: 2051–2061. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1983071>
117. Parsons MEM, Szklanna PB, Guerrero JA, Wynne K, Dervin F, O'Connell K, Allen S, Egan K, Bennett C, McGuigan C, Gheveart C, Ni Ainle F, Maguire PB (2018) Platelet releasate proteome profiling reveals a core set of proteins with low variance between healthy adults. *Proteomics* 18: e1800219. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800219>
118. Etulain J, Mena HA, Negrotto S, Schattner M (2015) Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets. *Platelets* 26: 799–804. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1051953>
119. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW (2015) Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 15: 73–86. <https://doi.org/10.1038/nri3789>
120. Ward MP, Kane LE, Norris LA, Mohamed BM, Kelly T, Bates M, Clarke A, Brady N, Martin CM, Brooks RD, Brooks DA, Selemidis S, Hanniffy S, Dixon EP, O'Toole SA, O'Leary JJ (2021) Platelets, immune cells and the coagulation cascade; friend or foe of the circulating tumour cell? *Mol Cancer* 20: 59. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01347-1>
121. Gay LJ, Felding-Habermann B (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11: 123–134. <https://doi.org/10.1038/nrc3004>
122. Gruber IV, Landenberger N, Staebler A, Hahn M, Wallwiener D, Fehm T (2013) Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res* 33: 2233–2238
123. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112: 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
124. Jiang X, Wong KHK, Khankhel AH, Zeinali M, Reategui E, Phillips MJ, Luo X, Aceto N, Fakhin F, Hoang AN, Kim W, Jensen AE, Sequist LV, Maheswaran S, Haber DA, Stott SL, Toner M (2017) Microfluidic isolation of platelet-covered circulating tumor cells. *Lab Chip* 17: 3498–3503. <https://doi.org/10.1039/c7lc00654c>
125. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirousková M, Degen JL (2005) Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105: 178–185. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2272>
126. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006) Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6: 715–727. <https://doi.org/10.1038/nri1936>
127. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, Salih HR (2012) Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 72: 440–448. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1872>
128. Kopp HG, Placke T, Salih HR (2009) Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 69: 7775–7783. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2123>
129. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF (2012) Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 3: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00124>
130. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, Van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, Widmark A, Gerritsen WR, Verheul HM, Vandertop WP, Noske DP, Skog J, Würdinger T (2011) Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 118: 3680–3683. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344408>

131. Rutkowska A, Stoczyńska-Fidelus E, Janik K, Włodarczyk A, Rieske P (2019) EGFRvIII: An oncogene with ambiguous role. *J Oncol* 2019: 1092587.
<https://doi.org/10.1155/2019/1092587>
132. Varon D, Shai E (2009) Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression. *Discov Med* 8: 237–241
133. Rao AK, Rao DA (2012) Platelets signal and tumors take off. *Blood* 120: 4667–4668.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457325>
134. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D (2005) Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res* 67: 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.007>
135. Michael JV, Wurtzel JGT, Mao GF, Rao AK, Kolpakov MA, Sabri A, Hoffman NE, Rajan S, Tomar D, Madesh M, Nieman MT, Yu J, Edelstein LC, Rowley JW, Weyrich AS, Goldfinger LE (2017) Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood* 130: 567–580.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-751099>
136. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE (2012) Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* 119: 6288–6295.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396440>
137. Liang H, Yan X, Pan Y, Wang Y, Wang N, Li L, Liu Y, Chen X, Zhang C-Y, Gu H, Zen K (2015) MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer* 14: 58.
<https://doi.org/10.1186/s12943-015-0327-z>
138. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL (2013) miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med* 274: 215–226.
<https://doi.org/10.1111/joim.12099>
139. He J-F, Luo Y-M, Wan X-H, Jiang D (2011) Biogenesis of miRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol* 25: 404–408.
<https://doi.org/10.1002/jbt.20396>
140. Lebois M, Josefsson EC (2016) Regulation of platelet lifespan by apoptosis. *Platelets* 27: 497–504.
<https://doi.org/10.3109/09537104.2016.1161739>
141. Gasecka A, Nieuwland R, Siljander PR-M (2019) 22 - Platelet-derived extracellular vesicles. In: Michelson ADBT-P. Fourth E (ed). Acad Press. 401–416.
142. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, Schellen P, Verschueren H, Post E, Koster J, Ylstra B, Ameiziane N, Dorsman J, Smit EF, Verheul HM, Noske DP, Reijneveld JC, Nilsson RJA, Tannous BA, Wesseling P, Wurdinger T (2015) RNA- seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* 28: 666–676.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.018>
143. Sjors GJG, Wurdinger T (2019) Tumor-educated platelets. *Blood* 133: 2359–2364.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-12-852830>
144. Best MG, Wesseling P, Wurdinger T (2018) Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring. *Cancer Res* 78: 3407–3412.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0887>
145. Cho MS, Bottsford-Miller J, Vasquez HG, Stone R, Zand B, Kroll MH, Sood AK, Afshar-Kharghan V (2012) Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. *Blood* 120: 4869–4872.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-438598>
146. Huber LT, Kraus JM, Ezić J, Wanli A, Groth M, Laban S, Hoffmann TK, Wollenberg B, Kestler HA, Brunner C (2023) Liquid biopsy: an examination of platelet RNA obtained from head and neck squamous cell carcinoma patients for predictive molecular tumor markers. *Explor Target Antitumor Ther* 4: 422.
<https://doi.org/10.37349/etat.2023.00143>
147. Тесаков ИП, Мартыанов АА, Друй АЕ, Свешикова АН (2021) Анализ тромбоцитарной РНК: неинвазивный метод изучения экспрессии опухолевых генов. *Вопр гематол/онкокол и иммунопатол в педиатр* 20: 207–217. [Tesakov IP, Martyanov AA, Drui AE, Sveshnikova AN (2021) Analysis of platelet RNA: a non-invasive method for studying the expression of tumor genes. *Pediatr Hematol/Oncol Immunopathol* 20: 207–217. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24287/1726-1708-2021-20-1-207-217>
148. Gresele P, Momi S, Malvestiti M, Sebastiano M (2017) Platelet-targeted pharmacologic treatments as anti-cancer therapy. *Cancer Metastas Rev* 36: 331–355.
<https://doi.org/10.1007/s10555-017-9679-8>

149. Skelton WP, Franke AJ, Welniak S, Bosse RC, Ayoub F, Murphy M, Starr JS (2019) Investigation of complications following port insertion in a cancer patient population: a retrospective analysis. *Clin Med Insights Oncol* 13: 117955491984477. <https://doi.org/10.1177/1179554919844770>
150. Yoshimoto M, Kagawa S, Kajioka H, Taniguchi A, Kuroda S, Kikuchi S, Kakiuchi Y, Yagi T, Nogi S, Teraishi F, Shigeyasu K, Yoshida R, Umeda Y, Noma K, Tazawa H, Fujiwara T (2023) Dual antiplatelet therapy inhibits neutrophil extracellular traps to reduce liver micrometastases of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 567: 216260. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216260>
151. Uluçkan Ö, Eagleton MC, Floyd DH, Morgan EA, Hirbe AC, Kramer M, Dowland N, Prior JL, Piwnica-Worms D, Jeong SS, Chen R, Weilbaecher K (2008) APT102, a novel ADPase, cooperates with aspirin to disrupt bone metastasis in mice. *J Cell Biochem* 104: 1311–1323. <https://doi.org/10.1002/jcb.21709>
152. Tzanakakis GN, Agarwal KC, Veziridis MP (1993) Prevention of human pancreatic cancer cell-induced hepatic metastasis in nude mice by dipyridamole and its analog RA-233. *Cancer* 71: 2466–2471. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930415\)71:8<2466::AID-CNCR2820710807>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930415)71:8<2466::AID-CNCR2820710807>3.0.CO;2-Q)
153. Guillem-Llobat P, Dovizio M, Bruno A, Ricciotti E, Cufino V, Sacco A, Grande R, Alberti S, Arena V, Cirillo M, Patrono C, FitzGerald GA, Steinhilber D, Sgambato A, Patrignani P (2016) Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget* 7: 32462–32477. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8655>
154. Gasic G, Gasic T, Murphy S (1972) Anti-metastatic effect of aspirin. *Lancet* 300: 932–933. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)92581-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)92581-0)
155. Algra AM, Rothwell PM (2012) Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol* 13: 518–527. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70112-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70112-2)
156. Gresele P (2013) Antiplatelet agents in clinical practice and their haemorrhagic risk. *Blood Transfus* 11: 349–356. <https://doi.org/10.2450/2013.0248-12>
157. Andrews RK, Arthur JF, Gardiner EE (2014) Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy. *J Blood Med* 5: 59–68. <https://doi.org/10.2147/JBM.S39220>

The Role of Platelet Activation in the Development and Metastasis of Solid Tumors

A. N. Sveshnikova^{a, b, c, *}, I. P. Tesakov^b, S. A. Kuznetsova^b, and E. M. Shamova^d

^aCenter for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia

^bDmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^dInstitute of biophysics and cell engineering NAS of Belarus, Minsk, Belarus

*e-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

The blood coagulation system is actively involved in the development of cancer. It is known that many solid tumors express tissue factor, a “trigger” of the cascade of plasma coagulation reactions, which leads to an increased risk of cancer-associated thrombosis and venous thrombosis in cancer patients. It has also long been known that platelets - small cellular fragments that are the basis of blood clots - play a critical role in metastasis by binding to the tumor cell after it enters the blood vessel, “shielding” it from the immune system and promoting the adhesion and extravasation of the tumor cell into tissues and the formation metastasis. In addition, platelets, being mobile “storehouses” of growth factors, are actively attracted and, in some cases, consumed by the tumor, which contributes to its development and vascularization. Platelet attraction occurs both through activation of the blood coagulation system in the tumor area and through exposure of the adhesive surface by the tumor. Activated in the tumor vicinity, platelets attract and induce neutrophil

activation and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), thereby modulating the tumor microenvironment. When activated, platelets are known to secrete a variety of growth factors that promote both tumor development and vascularization. In addition to direct interaction, platelets and tumor cells exchange mRNA, micro-RNA and other regulatory molecules through microvesicles, while platelets are containers for the spread of tumor genetic material (circulating nucleic acids) throughout the body. In this review, we consider the molecular mechanisms of platelet participation in the development and metastasis of solid tumors, and also discuss possible options for pharmacological interruption of this interaction.

Keywords: platelet, granulocyte, cell adhesion, solid tumor, metastasis, microvesicles, neutrophil DNA traps

ОБЗОРЫ

РОЛЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В РАЗВИТИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ИШЕМИЕЙ ПАТОЛОГИЙ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

© 2024 г. Л. Ю. Коляскин¹, А. М. Шибeko^{2, 3, *}

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

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения

Российской Федерации, Москва, Россия

*E-mail: alshibeko@gmail.com

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 19.12.2023 г.

Гематоэнцефалический барьер поддерживает гомеостаз головного мозга, обеспечивая регулируемый транспорт питательных веществ и макромолекул из кровотока. Его целостность нарушается при ряде патологических процессов, таких как ишемический инсульт, нейродегенеративные заболевания или воспаление. Это приводит к потере контроля над транспортными процессами из кровотока в головной мозг, что вызывает кровоизлияния, отеки и гибель тканей. Изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера в значительной степени осуществляется и регулируется семейством ферментов, отвечающим за перестраивание существующих сосудов, ангиогенез и ряд других физиологических и патологических процессов, – матриксными металлопротеиназами. В данном обзоре представлены данные о структуре гематоэнцефалического барьера, о патологических изменениях, происходящих в нем под действием металлопротеиназ, о механизмах, регулирующих их активность, и о трудностях, сопряженных с исследованиями данных процессов.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, матриксная металлопротеиназа, ишемический инсульт

DOI: 10.31857/S0869813924010021, **EDN:** WUKFOS

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Всемирной Организации по борьбе с инсультом, к 2019 г. инсульты стали второй по распространенности причиной смерти и третьей причиной инвалидизации населения в мире [1]. Инсульты разделяют на две группы на основе характера протекающих патологических процессов. Инсульт может быть ишемическим, при котором возникает тромбоз сосуда, питающего головной мозг, или геморрагическим, при котором происходит разрыв кровеносного сосуда, приводящий к внутримозговому или субарахноидальному кровоизлиянию [2]. Согласно статистике, собранной с 1990 по 2019 гг., ишемический инсульт случается примерно в 2 раза чаще, чем геморрагический [1].

Ишемический инсульт посредством блокады кровеносного сосуда приводит к возникновению кислородного голодания и дефицита глюкозы в тканях головного мозга,

вызывая их гибель. Помимо этого, под действием каскада металлопротеиназ матрикса (МП) запускается ряд процессов, приводящих к нарушению целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), возникновению отека, воспаления и внутримозгового кровотечения, что усиливает гибель нейронов [3]. Стандартными средствами терапии ишемического инсульта являются тромболитическая терапия тканевым активатором плазминогена (ТПА) и тромбэктомия [4]. Они нацелены на экстренное удаление тромба, блокирующего кровеносный сосуд, и восстановление кровотока (реканализацию). При этом временной интервал эффективной применимости данных методик весьма ограничен: до 4.5 ч после манифестации для тромболитической терапии [5, 6] и до 24 ч для тромбэктомии [7, 8]. Метаанализ данных результатов применения различных типов терапии ишемических инсультов показывает, что тромболитическая терапия обеспечивает эффективность восстановления нейрологических функций от 20 до 40%, в то время как комбинация тромболитической терапии и тромбэктомии достигает эффективности в 99%. При этом безопасность тромболитической терапии находится в диапазоне 40–60%, безопасность тромбэктомии составляет 12%, а безопасность комбинации тромболитической терапии и тромбэктомии достигает 84% [9]. Помимо этого, тромболитическая терапия увеличивает в 10 раз частоту развития геморрагической трансформации (кровоизлияния в мозг) [10]. Это связано с тем, что ТПА приводит к дополнительной активации каскада металлопротеиназ, вызывающих деградацию ГЭБ.

Исследование механизмов, регулирующих процессы разрушения ГЭБ, поражения тканей головного мозга и их восстановления и роли металлопротеиназ в этих процессах, важно не только с практической позиции снижения смертности и инвалидизации населения, вызываемых инсультами, но и с позиции фундаментального понимания сложных систем, управляющих развитием и гомеостазом организма.

Структура ГЭБ

Гематоэнцефалический барьер осуществляет контроль транспорта ионов, кислорода и питательных веществ между кровью и отделами мозга, а также обеспечивает защиту паренхимы головного мозга от проникновения токсинов, патогенов, лекарств и других экзогенных соединений в центральную нервную систему [11].

ГЭБ состоит из кровеносных сосудов, образованных специализированными эндотелиальными клетками, астроцитами, перицитами и окончаниями нейронов [12–14]. Ножки астроцитов примыкают к базальной мембране [15]. Перициты играют регуляторную роль в тонусе, стабильности, восстановлении и ангиогенезе сосудистой сети [16], а также способны модулировать функцию астроглии [17, 18]. Наконец, нейроны также активно участвуют в этой структуре, поскольку нейрональные окончания приходят ко всем клеткам, образующим ГЭБ [19] (рис. 1).

Поток гидрофильных молекул через эндотелий ГЭБ затруднен плотными контактами, герметизирующими пути между соседними эндотелиальными клетками [20]. Плотный контакт представляет собой полупроницаемый диффузионный барьер, который различает растворенные вещества на основе размера и заряда. Диффузия ионов и небольших незаряженных молекул происходит через поры диаметром около 0.4 нм [21]. Этот путь парацеллюлярной диффузии регулируется порообразующими клаудинами [22, 23]. Макромолекулы размером до 6 нм также переносятся парацеллюлярным транспортом, но макромолекулярная диффузия изучена недостаточно хорошо.

Плотный контакт образует защитный барьер там, где две соседние эндотелиальные клетки контактируют латерально в парацеллюлярных пространствах, образуя двухклеточное плотное соединение [24]. В точках контакта трех клеток образуются трехклеточные плотные контакты, которые конструктивно отличаются от двухклеточных (рис. 2).

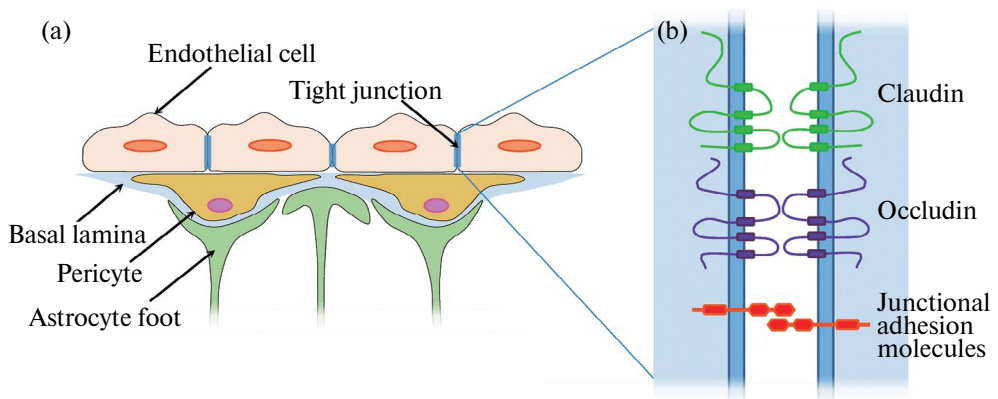


Рис. 1. Гематоэнцефалический барьер и плотный контакт. (a) – Схематичный рисунок гематоэнцефалического барьера в продольном сечении, показывающий эндотелий, базальную мембрану, перициты, астроциты и плотные контакты. (b) – Схематичное изображение плотного контакта, показаны основные структурные белки: клаудин (зеленый), окклюдин (фиолетовый) и молекулы соединительной адгезии (красный).

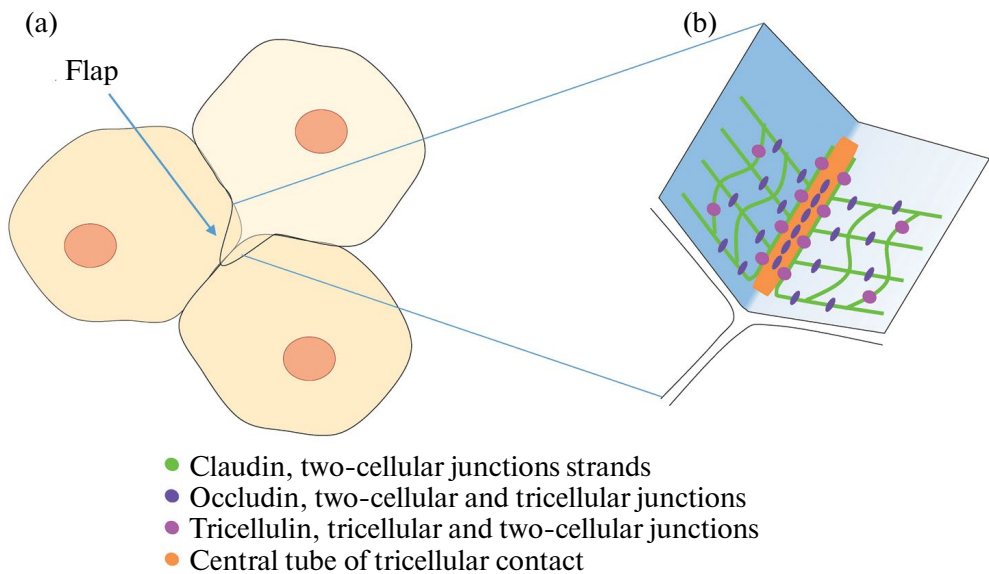


Рис. 2. Схематичное изображение места соединения трех клеток эндотелия (a) и трехклеточного плотного контакта, образованного в этом месте (b). Стрелкой отмечен лепесток клетки, настилающейся над двумя другими в месте трехклеточного контакта. Оранжевый цвет – центральная трубка трехклеточного плотного контакта. Зеленым цветом показаны фибриллы клаудина, образующие нити двухклеточных плотных контактов, подходящие к центральной трубке. Фиолетовый цвет – окклюдины, которые участвуют в формировании плотных контактов между двумя и тремя клетками. Розовый цвет – трицеллюлин, основной структурный белок трехклеточного плотного контакта, который, однако, также встречается и в двухклеточных контактах.

Сеть двухклеточных плотных контактов, состоящая из трансмембранных белков окклюдина и клаудина, расширяется базолатерально при сближении в трехклеточных контактах. Одна из трех клеток настигается тонким лепестком над двумя оставшимися подлежащими клетками, образуя расположенную параллельно локальной плоскости стенки сосуда трехцепочечную структуру с “центральной трубкой” длиной 10 нм [25], которая является местом повышенной парацеллюлярной проницаемости [26]. Основным структурным белком трехклеточного контакта является трицеллюлин, который также встречается и в двухклеточных контактах, но в существенно меньшем количестве [27]. В трехклеточном контакте также повышено количество окклюдина, который образует менее прочные трансмембранные связи и более, чем клаудин, уязвим к ферментативному расщеплению.

Клаудины способны полимеризоваться в линейные фибриллы [28], в отличие от окклюдина, который образует лишь короткие фрагменты нитей. Клаудины демонстрируют более сильную адгезию, чем окклюдин [29], обеспечивая герметизацию межклеточного пространства, и играют ключевую роль в регуляции парацеллюлярной проницаемости [30]. Своей цитоплазматической областью клаудины взаимодействуют с семейством каркасных белков зональных окклюденов [31], которые, в свою очередь, необходимы для сборки плотного контакта и его жесткого закрепления к актиновому цитоскелету [32]. Помимо клаудина и окклюдина, в формировании плотного контакта участвуют молекулы адгезии плотных контактов, белки с трансмембранным доменом и внеклеточной частью, свернутыми в два иммуноглобулиноподобных домена [33], принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов. Они связываются с клаудиновыми фибриллами и участвуют в регуляции парацеллюлярной проницаемости [34].

Следующим элементом ГЭБ является базальная мембрана, сложная аморфная структура толщиной 50–100 нм [35], находящаяся между эндотелием сосудов головного мозга и ножками астроцитов [36]. Она состоит из множества компонентов, основными из которых являются такие белки внеклеточного матрикса, как коллаген IV, ламинин, нидоген и протеогликаны [37], регулирующие целостность ГЭБ в норме и при патологиях. Базальная мембрана выполняет множество важных функций, включая структурную поддержку, закрепление клеток и передачу сигналов [38, 39].

Перициты — это многофункциональные клетки, встроенные в стенки капилляров. Перициты часто считают похожими на мезенхимальные стволовые клетки, и исследования как *in vitro*, так и *in vivo* показали, что они могут дифференцироваться в несколько типов клеток, включая ангиобласты, нейральные предшественники, сосудистые клетки и микроглию [40, 41]. Перициты регулируют проницаемость ГЭБ для воды и ряда низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений по крайней мере двумя способами: регулируя паттерны экспрессии генов, специфичных для ГЭБ, в эндотелиальных клетках и вызывая поляризацию концевых ножек астроцитов, окружающих кровеносные сосуды ЦНС [42]. Также перициты управляют формированием плотных контактов и транспортировкой везикул в эндотелиальных клетках ЦНС и ингибируют производство молекул, которые увеличивают проницаемость сосудов и инфильтрацию иммунных клеток ЦНС [43].

Астроциты являются наиболее распространенным типом клеток в мозге млекопитающих; вместе с олигодендроцитами и микроглией они являются тремя основными типами глиальных клеток [44]. Астроциты играют важную роль в развитии и поддержании целостности плотных контактов посредством высвобождения факторов роста, таких как фактор роста сосудистого эндотелия, основной фактор роста фибробластов, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии [45, 46]. Эксперименты с удалением астроцитов из зоны ГЭБ во взрослом мозге показали, что они являются необходимыми для поддержания как его целостности, так и для восстановления после повреждения [47].

Таблица 1. Металлопротеиназы, их источники и субстраты, входящие в состав ГЭБ

МП	Источник	Активатор	Субстрат в составе ГЭБ
МП2	Эндотелий, тромбоциты	Фурин, МП14, МП15	Плотные контакты: окклюдин, зональные окклюдены, трицеллюлин
МП3	Перициты, микроглия, нейроны	Плазмин	Плотные контакты: окклюдин, клаудин Базальная мембрана: ламинин
МП9	Нейтрофилы, эндотелий, перициты, астроциты	МП3, МП2, TLR2, МП7, МП10	Плотные контакты: окклюдин, зональные окклюдены, молекулы соединительной адгезии Базальная мембрана: коллагены, желатин, фибронектин, ламинин, нидоген
МП8	Макрофаги, нейтрофилы	МП3, МП7	Плотные контакты: окклюдин Базальная мембрана: коллагены, желатин, фибронектин, ламинин, нидоген
МП10	Микроглия, эндотелий, нейроны	Плазмин, МП10	Базальная мембрана: коллагены, желатин, фибронектин
МП13	Глия, нейроны, эндотелий	МП14, МП3	Базальная мембрана: коллагены, желатин

Металлопротеиназы

Матриксные металлопротеиназы (МП), или матриксин, выделяют в отдельное семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Семейство МП на данный момент содержит 28 протеаз, 23 из которых присутствуют у человека. Внутри семейства классификация МП производится по субстратной специфичности по отношению к белкам внеклеточных структур.

МП участвуют в большинстве воспалительных, аутоиммунных, раковых и патогенных заболеваний. МП могут вызывать как ухудшения в прогрессировании заболеваний, так и поддерживать восстановление. Белки внеклеточного матрикса составляют только 30% субстратов МП, а остальные субстраты МП не относятся к внеклеточному матриксу [48]. МП действительно играют важную роль в деградации коллагенов и протеогликанов. Гормоны щитовидной железы во время метаморфоза способствуют высвобождению нескольких МП, которые играют активную роль в ремоделировании кишечника; они важны для морфогенеза ветвления при развитии легких, молочных желез и других органов. МП вызывают деградацию и процессинг активно участвующих в процессе заживления ран факторов роста и их рецепторов; модулируют факторы, стимулирующие или ингибирующие ангиогенез [49], в том числе активируют такой важный регулятор ангиогенеза, как фактор роста эндотелия сосудов, который стимулирует рост и проницаемость сосудов [50, 51]. МП участвуют в регуляции апоптоза, вызванного ишемическим инсультом [52–54]. Сводные данные об основных металлопротеиназах, регулирующих целостность ГЭБ при ишемическом инсульте, а также их основных субстратах представлены в табл. 1.

МП, за немногочисленным рядом исключений, синтезируются в виде профермента; для перехода из латентного состояния к активному им требуется провзаимодейство-

вать с активатором. В роли активаторов МП могут выступать различные протеиназы, например, такие как ТПА, фурин или другие МП в активной форме. Ферментативная активность МП регулируется альфа-2-макроглобулином и группой тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ТИМП), которые путем связывания блокируют активные сайты или ухудшают реакционную способность активных МП путем связывания в альтернативных сайтах [55]. К текущему моменту были выделены и определены четыре гомологичных ТИМП (ТИМП 1–4).

Традиционно МП принято разделять на четыре группы, исходя из субстратной специфичности и частичной локализации МП в клетке. К коллагеназам принято относить МП1, МП8, МП13, они способны расщеплять фибриллярные белки – трехспиральные коллагены. МП2 и МП9 образуют группу желатиназ: ферментов, расщепляющих коллаген VI типа и желатин. МП3, МП10, МП11 объединяют в группу стромализинов на основе того, что они способны к расщеплению широкого спектра белков внеклеточного матрикса, но не взаимодействуют с трехспиральными коллагенами. Четвертая группа – мембранные МП – состоит из металлопротеиназ: МП14, МП15, МП16, МП17, МП24, МП25. Они локализованы на мембране и имеют в своей структуре уязвимый для расщепления фурином участок. Такая система классификации зачастую не позволяет однозначно разделить все ферменты семейства на группы, поэтому существуют альтернативные способы классификации, например, разделяющие МП на основе их доменной структуры [56].

Исследования взаимодействия ферментов с ГЭБ как во время физиологических процессов, так и при патологиях, влекущих обширные разрушения или частичную ремодуляцию ГЭБ, установили, что некоторые МП вовлечены в эти процессы существенно больше остальных.

МП2 (желатиназа А) играет значимую роль в процессе разрушения ГЭБ на ранних стадиях ишемического инсульта. Экспериментальные данные, полученные методом транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс, показывают, что раннему разрушению ГЭБ (в течение 3 ч с момента реканализации артерии) соответствует значительное увеличение активности МП2 в совокупности с увеличенным производством активаторов МП2, таких как фурин и МП14. Причем использование ингибитора, действующего избирательно на МП2, смогло предотвратить увеличение активности МП2 и снизить ее содержание в головном мозге, но не уменьшило область воспаления головного мозга, вызванного ишемией [57, 58]. Исследования разрушения структурных белков плотных контактов в культурах эндотелиальных клеток во время кислородного голодания, которое происходит на начальном этапе ишемии до реканализации, показали, что производство МП2 остается на том же уровне, что и в клетках, не подвергающихся кислородному голоданию, но ее активность в разы увеличивается уже спустя 30 мин кислородного голодания. Также происходит изменение локализации МП2: во время кислородного голодания ее концентрация в цитоплазме клетки ниже, чем в интактных клетках, а во внеклеточной области – выше. Это сопровождается разрушением белков плотных контактов (зональных окклюденов и окклюдина), причем разрушение предотвращается направленным ингибированием МП2 [59]. На основе этих фактов можно сделать вывод, что МП2 начинает разрушать структуры ГЭБ на самых ранних этапах ишемии и способна воздействовать особенно сильно на области плотных контактов с высоким содержанием окклюдина.

МП9 (желатиназа Б) относится к группе нейтрофильных металлопротеиназ, так как впервые была обнаружена в гранулах нейтрофилов [60]. Помимо дегрануляции проникающих в структуры ГЭБ и ткани мозга в области ишемии нейтрофилов под действием воспалительных факторов [61] или ТПА [62], в неактивном состоянии МП9 может секретироваться эндотелиальными клетками ГЭБ [59]. Следы активности МП9 присутствуют на протяжении всего ишемического инсульта, в том числе и на поздних стадиях в области эндотелия сосудов и окружающей его ткани мозга. Но определить

конкретные клетки (нейроны, клетки нейроглии) в качестве однозначных источников МП9 на текущий момент не удалось, так как на поздних стадиях ишемии начинаются процессы регенерации пораженных тканей и ангиогенез со сложными регуляторными механизмами, во время которого также происходит синтез МП9 [63]. При исследовании процессов разрушения ГЭБ, индуцируемых МП9, интересны механизмы активации секретлируемой латентной формы фермента. Активаторами МП9 могут выступать как ферменты семейства МП (МП3, МП13, МП7, МП2), так и ряд других ферментов, активирующих МП9 с меньшей скоростью [64, 65]. Самым эффективным активатором МП9 является МП3, соответствующая реакция по активации является одной из ключевых в ферментативном каскаде МП внеклеточного матрикса [66]. Помимо активации ферментами был открыт способ активации МП9 с помощью рецепторов TLR2 на астроцитах, что, вероятно, играет важную роль в регуляции активности МП9 на поздних стадиях ишемии. Субстратами МП9 являются белки плотных контактов: окклюдин [67], зональные окклюдены [58, 68, 69]. Относительно клаудина экспериментальные данные весьма противоречивы. Несмотря на то, что некоторые эксперименты на культурах эндотелиальных клеток показывают, что снижение концентрации клаудина коррелирует с активностью МП9, регулируемой через ТИМП1 [70], в ряде работ нет подтверждения тому, что МП9 взаимодействует с клаудином: концентрация клаудина (в отличие от окклюдина) в крови мышей после ОСМА не коррелирует с концентрацией МП9 в крови [67]. В другой работе уровень клаудина в плазме крови у пациентов с ишемическим инсультом коррелировал с концентрацией МП9 и увеличивался при развитии геморрагической трансформации [71]. В эксперименте с клеточной культурой микрососудистого эндотелия головного мозга мышей bEND3 было обнаружено, что кислородно-глюкозное голодание вызывает не деградацию клаудина, а его диссоциацию от каркаса цитоскелета независимым от МП2 и МП9 способом [59]. Совокупность этих фактов вызывает сомнение в том, что клаудин является субстратом МП9, либо же скорость такой протеолитической реакции является пренебрежимо малой для характерных концентраций белков и ферментов во время ишемии относительно скоростей остальных процессов разрушения ГЭБ. Другими, не менее важными субстратами МП9 являются компоненты базальной мембраны и белки адгезивных контактов мембраны [64]. Белки базальной мембраны (коллаген, фибронектин, ламинин и другие) в совокупности с кадгеринами адгезивных контактов формируют внеклеточный слой, который служит критически важным компонентом для крепления эндотелиальных клеток на стенках сосудов и отделяет их от клеток тканей головного мозга. Благодаря широкому спектру субстратов МП9 задействована на протяжении всех этапов ишемии, за исключением самых ранних, и играет важную роль в разрушении ГЭБ и последующих процессах восстановления и ангиогенеза. На текущий момент МП9 является единственным ферментом из семейства МП, который достоверно можно считать биомаркером острого ишемического инсульта [72].

Матриксная МП3 (стромализин-1) может участвовать в расщеплении элементов внеклеточного матрикса и может выступать транскрипционным фактором в ядре [73]. В широкий спектр субстратов МП3 входят фибронектин, ламинин, эластин, протеогликаны и денатурированные коллагены, но в отличие от коллагеназ МП3 не может расщеплять коллаген 1-го типа [74]. Эксперименты на модели ОСМА мыши показали, что при нокауте гена МП3 уменьшается риск геморрагической трансформации при применении тромболитической терапии с участием ТПА во время ишемии [75]. ТПА повышает синтез МП3 в культуре мышечных эндотелиальных клеток *in vitro* за счет мембранных сигнальных путей [76]. МП3 взаимодействует с рецепторами на мембране нейронов, индуцирует апоптоз [77].

Четыре представителя семейства ТИМП являются ингибиторами широкого спектра действия для всех 23 МП, обнаруженных у человека, но между ними существуют некоторые различия в специфичности. ТИМП-1 более ограничен в своем ингибирующем

диапазоне, чем три других ТИМП, имея относительно низкое сродство к МП мембранного типа: МП14, МП16 и МП24, а также к МП19 [78]. Кроме того, существуют отличия в константах ингибирования разных МП различными ТИМП. Например, ТИМП-2 и -3 являются более слабыми ингибиторами, чем ТИМП-1, для МП3 и МП7 [79]. ТИМП-3 уникален среди ТИМП млекопитающих, поскольку он ингибирует более широкий спектр МП, включая нескольких членов семейств ADAM и ADAMTS [80–82].

Как и синтез МП, синтез ТИМП претерпевает существенные изменения на различных фазах ишемического инсульта. Так, дегрануляция нейтрофилов под действием ТПА сопровождается значимым синтезом ТИМП-2 [62]. В экспериментах на культуре эндотелиальных клеток было показано, что для ТИМП-1 синтез снижается после кислородно-глюкозного голодания и достигает минимума через 12 ч, а синтез ТИМП-2 не изменяется со временем [83]. Использование модели окклюзии средней мозговой артерии на мышах и *in vitro* модели кислородного голодания культуры нейроноподобных клеток показали, что при ишемии уровень ТИМП-3 снижается в разы. Искусственное увеличение синтеза ТИМП-3 приводит к уменьшению количества апоптотических клеток *in vivo* и *in vitro*. ТИМП-3 участвует в регуляции окислительного стресса тканей головного мозга (уровней продукции активных форм кислорода и других оксидантов) через АКТ сигнальный путь [84].

МП8 (нейтрофильная коллагеназа), как и МП9, является нейтрофильной металлопротеиназой. В области вызванного ишемией воспаления МП8 вместе с МП9 выделяется при дегрануляции нейтрофилов под действием ТПА [62]. Эксперимент на культуре эндотелиальных клеток показал, что производимая активная МП8 разрезает окклюдин плотных контактов [85].

МП10 (стромализин-2) на 82% гомологична МП3, и большинство ее субстратов совпадают с субстратами МП3. При этом в комбинации с ТПА она способна ускорять фибринолиз, блокируя активируемый тромбином ингибитор фибринолиза ТАФИ [86].

МП13 (коллагеназа-3) ассоциирована с раковыми заболеваниями и является маркером агрессивности опухоли [87]. Ее основной субстрат – коллаген 2-го типа. В модели окклюзии средней мозговой артерии у мышей дефицит МП13 приводил к уменьшению объема инфаркта, снижал частоту кровотечений и улучшал функциональный исход. Однако дефицит МП13 значительно снижал количество обновленных нейроblastов в кортикальной перинфарктной зоне, а также блокировал увеличение плотности сосудов в перинфарктной области. Таким образом, МП13 на ранних этапах развития ишемического инсульта усиливает поражение головного мозга, а на более поздних этапах – способствует его восстановлению [88].

Динамика изменений ГЭБ при ишемическом инсульте

Ишемический инсульт возникает в результате окклюзии кровеносного сосуда, осуществляющего питание определенного региона головного мозга.

После ишемического повреждения головного мозга разрушение ГЭБ происходит достаточно быстро [89]. В течение 10 мин после реперфузии появляются признаки дегградации базальной мембраны и разрушения ГЭБ [90, 91]. Первичные прорехи в ГЭБ были зарегистрированы в течение 2–6 ч (медиана 3.8 ч) от начала инсульта [92, 93]. Периоды повышенной проницаемости ГЭБ наблюдались через 4–8 ч и снова через 12–16 ч [94, 95] после начала инсульта. Эта эскалация проницаемости ГЭБ может быть связана с гиперемией и гипоперфузией, развивающимися при инфаркте [95]. Начиная с 24 ч, наблюдается стойкое нарушение ГЭБ, которое длится неделями. Наиболее изученными являются начальные моменты ишемии, процессы, происходящие в течение первых 24 ч с начала инсульта.

Во время ишемии и асфиксии клетки мозга и иммунные клетки вырабатывают активные формы кислорода, которые стимулируют эндотелиальные клетки и вызывают окислительный стресс. Микроглия, астроциты, лейкоциты и эндотелиальные клетки

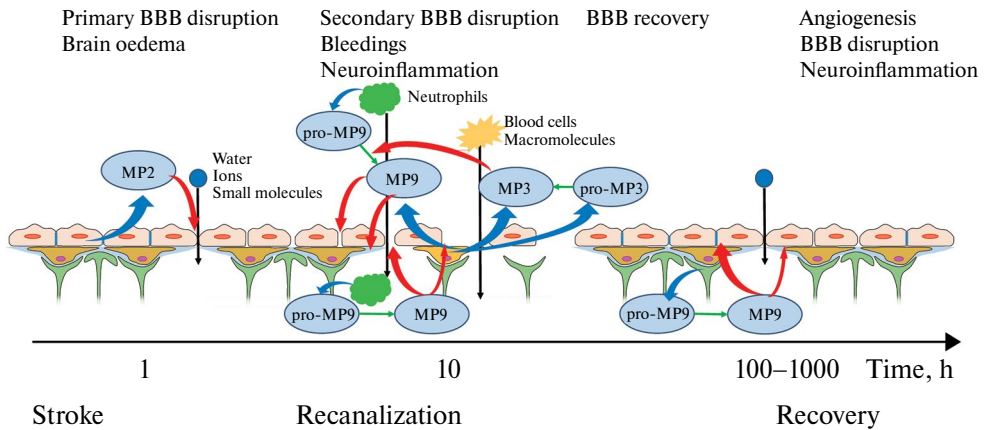


Рис. 3. Схема последовательности основных процессов, происходящих при ишемическом инсульте. Ишемический инсульт вызывает синтез МП2 эндотелиальными клетками; МП2 разрушает плотные контакты, приводя к повышению проницаемости ГЭБ для воды, ионов и малых молекул. Реканализация приводит к появлению в пораженной области нейтрофилов, способных проникать под эндотелий; нейтрофилы деградируют про-МП9, которая после активации разрушает базальную мембрану, а также плотные контакты. Перициты секретируют МП3 и про-МП3, которая после активации становится основным активатором МП9. Происходит значительное разрушение ГЭБ, в образующиеся прорехи могут проникать макромолекулы и клетки крови. Восстановление целостности ГЭБ протекает на фоне процессов репарации головного мозга, сопровождающихся ангиогенезом и ремодулированием матрикса, во время которого перициты производят про-МП9, после активации способную приводить к нарушениям целостности ГЭБ.

синтезируют ряд биохимических медиаторов и маркеров воспаления — цитокинов, хемокинов и провоспалительных ферментов [96, 97], основными из которых являются IL-6, IL-1 (встречается в двух формах: IL-1 α (внутриклеточный) и IL-1 β (секретируемый)) и фактор некроза опухоли (TNF- α и TNF- β). Появление таких молекул как TNF- α и IL-1 β приводит к активации NF- κ B, ядерного фактора каппа В, представляющего собой фактор транскрипции, который находится в цитоплазме каждой клетки и при активации перемещается в ядро. При активации NF- κ B регулирует экспрессию почти 400 различных генов, включая индуцибельную NO-синтазу (iNOS) [98], цитокины, молекулы адгезии, ангиогенные факторы. В том числе NF- κ B активирует гены, отвечающие за синтез МП9 [99–101], что на ранних стадиях инсульта усиливает разрушение ГЭБ, а на поздних - способствует восстановлению [102, 103].

К факторам, повреждающим ГЭБ, добавляется оксид азота NO, нейротоксин с мощными сосудорасширяющими свойствами, который может усугублять повреждение ДНК и эндотелия. Сами астроциты производят индуцибельную NO-синтазу во время ишемии (в здоровой ткани она не детектируется), что, в свою очередь, способствует образованию пероксинитрита и разрушению ГЭБ [104].

Мы остановимся на процессах, связанных с активностью МП и, в основном, управляющих патологическими изменениями ГЭБ на ранних этапах ишемии. Схематично этот процесс представлен на рис. 3.

В ответ на возникающее кислородно-глюкозное голодание эндотелиальные клетки синтезируют МП2, которая секретируется в межклеточное пространство уже в активной форме [59, 105]. МП2 вызывает деградацию окклюдина и трицеллюлина, что потенциально приводит к значительному увеличению проницаемости трехклеточных контактов [106, 107]. Это вызывает повышение парацеллюлярной и трансцеллюлярной проницаемости и повреждение эндотелия, в результате чего переносимые кровью

клетки, химические вещества и жидкость проникают в паренхиму головного мозга [11]. Нарушается водно-электролитный гомеостаз головного мозга, что приводит к его отеку [108]. Происходит первичное нарушение целостности ГЭБ.

Помимо МП2 из клеток выходит МП9 [109, 110], но в неактивной форме [59]. Одним из основных источников МП9 являются нейтрофилы, которые после реканализации (восстановления кровотока в затромбированной области) попадают в область с нарушенным ГЭБ и мигрируют под эндотелий [111]. Нейтрофилы дегранулируют, и из их гранул выходит МП9, которая вызывает деградацию базальной мембраны, что, вместе с разрушением плотных контактов, приводит к разрывам в эпителии сосудов и кровоизлияниям в паренхиму головного мозга [112]. Инфильтрация нейтрофилов в области под эндотелием через открытые плотные контакты еще больше усугубляет воспалительные реакции и усиливает повреждение головного мозга [113]. Происходит вторичное нарушение целостности ГЭБ.

На фоне процессов, связанных с активностью МП2, секретируемой эндотелием, и МП9, выходящей из нейтрофилов, происходит выход МП и из других клеток ГЭБ. Так, источником МП9 под действием ишемии становятся перициты, что приводит к разрушению плотных контактов и снижает связывание ножек астроцитов с сосудистой стенкой, увеличивая проницаемость ГЭБ [114].

Помимо двух упомянутых выше МП, существенную роль в разрушении ГЭБ играет МП3. Ее основным источником являются перициты и микроглия [115]. МП3 разрушает компоненты базальной мембраны и белки плотных контактов, открывая ГЭБ и тем самым облегчая приток нейтрофилов к внеклеточному матриксу под эндотелием [116]. Также МП3 является основным активатором МП9 [117].

Так как разрушение плотных контактов является основной причиной, приводящей к повышенной парацеллюлярной проницаемости ГЭБ после ишемического инсульта [118], то изучение механизмов регуляции этого процесса может не только прояснить общую картину изменений, но и определить направления новых подходов в терапии.

В основе процесса разрушения плотных контактов лежит несколько механизмов, таких как фосфорилирование окклюдина и клаудина серин/треонин-специфической протеинкиназой, активируемой GTP-связанным RhoA (ROCK-киназа) [119], диссоциация клаудина от цитоскелета зависимым от кавеолина-1 образом под действием МП9 [59], деградация окклюдина МП2 и МП9.

Кавеолин-1 представляет собой регуляторный белок оболочки кавеол, являющихся микроинвагинациями клеточной плазматической мембраны [120]. Кавеолин-1 отвечает за регуляцию различных сигнальных молекул и участвует в клеточном транспорте и гомеостазе холестерина, препятствуя его накоплению и развитию атеросклероза [121, 122]. Кавеолин-1 производится во многих типах клеток ЦНС, включая эндотелий [123], перициты [124] и астроциты [125]. Кавеолин-1 угнетает активность МП2 и МП9, тем самым препятствуя разрушению плотных контактов. У мышей, дефицитных по кавеолу, проницаемость ГЭБ после ишемии была на 45% выше, чем у контрольной группы [126]. С другой стороны, кавеолин способствует диссоциации клаудина от клеточного цитоскелета на коротких интервалах до 2 ч кислородно-глюкозного голодания [59]. В условиях длительной ишемии (4 ч кислородно-глюкозного голодания) кавеолин способствует доставке клаудина в аутофагосому для деградации: через 4 ч кислородно-глюкозного голодания уровень клаудина в культуре эндотелиальных клеток микрососудов мозга мыши линии bEND33 падал в 3 раза, по сравнению с контролем, и не изменялся в случае ингибирования синтеза кавеолина малой интерферирующей РНК [127]. Это в совокупности способствует быстрой деградации плотных контактов, открывая МП путь к внутренней части ГЭБ, а также упрощая миграцию нейтрофилов под эндотелий.

Развитие патологических изменений в ГЭБ при инсульте часто происходит на фоне тромболитической терапии, применяющейся для экстренной реканализации сосудов

головного мозга. Она представляет собой болюсное, а затем инфузионное введение сверхфизиологических доз ТПА [128], при котором его концентрация в крови увеличивается на 2–3 порядка и достигает 20–30 нМ. Цель этой терапии состоит в быстрой наработке плазмينا и растворении фибриновой составляющей тромба, препятствующего нормальному кровотоку. Однако ТПА усиливает дегрануляцию МП9 из нейтрофилов [62], что ускоряет разрушение базальной мембраны при реканализации. Помимо этого, плазмин активирует МПЗ [129], что опосредованно приводит к дополнительной активации МП9. Основным осложнением тромболитической терапии является геморрагическая трансформация – кровотечение в область ишемизированного мозга после инсульта, происходящая у 10–40% пациентов [130, 131]. Большие паренхиматозные гематомы и симптоматическое внутримозговое кровоизлияние вызывают наибольшую опасность, появляются у 6% пациентов после тромболитической терапии [132]. Так, проспективное мультицентровое исследование на более чем 1000 пациентах показало, что геморрагическая трансформация происходит у 13% пациентов на тромболитической терапии, у 8% пациентов на антиагрегантной терапии и у 9% пациентов на антикоагулянтной терапии [133]. При этом развитие паренхимальных кровотечений происходит у 6% пациентов на тромболитической терапии и только у 3% пациентов на антиагрегантной или антикоагулянтной терапиях.

Вслед за реканализацией начинается процесс восстановления тканей головного мозга, одним из этапов которого является ангиогенез [134, 135], который характеризуется повышением синтеза фактора роста эндотелия сосудов [136, 137]. Однако этот фактор индуцирует повышение синтеза МП9 астроцитами [138], это способствует дегенерации базальной мембраны, что приводит к увеличению проницаемости ГЭБ [139].

Проблемы исследования процессов, регулируемых металлопротеиназами

Общее представление о процессах, приводящих к патологическим изменениям ГЭБ, хорошо отражено в литературе, однако детали и конкретные механизмы регуляции изучены слабо. Это обусловлено рядом обстоятельств, основные из которых перечислены ниже.

В первую очередь необходимо отметить, что, хотя и считается, что на фоне инсульта происходит повышение уровня МП, особенно МП9, однако даже в том, какой уровень МП считать нормальным, нет консенсуса.

Так, в работе [140] оценивались средние плазменные уровни МП у пациентов с возрастной макулодегенерацией. Группа пациентов (15 человек, средний возраст 74 г.) сравнивалась с контрольной группой (17 пациентов, ожидающих предварительного обследования на операцию по удалению катаракты, средний возраст 76 лет). Иммуноферментный анализ показал, что в контрольной группе концентрации МП2 и МП9 в плазме крови были 7 и 3 нМ соответственно, а в группе пациентов концентрации МП2 и МП9 в плазме крови были одинаковыми – 7 нМ.

В работе, посвященной исследованию уровня МП9 у пациентов с геморрагической трансформацией после ишемического инсульта [141], сравнивались группы пациентов, перенесших ишемический инсульт с последующей геморрагической трансформацией (20 пациентов, средний возраст 72 г.), и пациентов, перенесших инсульт без геморрагической трансформации (114 пациентов, средний возраст 72 г.). Методом иммуноферментного анализа было показано, что средняя плазменная концентрация МП9 у пациентов с геморрагической трансформацией была 2 нМ, а у пациентов без геморрагической трансформации – 0.7 нМ.

В работе, посвященной исследованию уровня МП9 у пациентов с гипертензивным кризисом [142], концентрация МП9 как у группы пациентов (58 человек, средний возраст 58 лет), так и у контрольной группы (40 человек, средний возраст 43 г.) была 0.02 нМ. В работе [143] были исследованы 3186 пациента (средний возраст 62 г.) с инсуль-

том, иммуноферментный анализ образцов сыворотки крови показал, что уровень МП9 у 25% пациентов превышает 11 нМ.

Таким образом, разброс значений измеренной концентрации МП9 в различных источниках для различных групп пациентов превышает 3 порядка.

Помимо этого, в зонах инфаркта и кровоизлияний концентрации МП, в частности, МП9, повышены по сравнению с коллатеральными областями [111], что, видимо, связано с сильной нейтрофильной инфильтрацией, так как подобного эффекта не наблюдается для МП2. Такая локализация затрудняет измерение реальной действующей концентрации МП, так как средняя концентрация в крови будет сильно зависеть от локализации и объема пораженной области, геометрии сосудистого окружения.

Также субстраты МП либо являются белками плотных контактов (окклюдин и клаудин), либо составляют базальную мембрану (ламинин, фибронектин, коллагены), то есть пространственно локализованы. Это препятствует определению их истинных концентраций, что, вместе с отсутствием информации о реальной концентрации МП, не позволяет определить эффективность процессов, регулирующих разрушение ГЭБ.

Первой фазой разрушения белков плотных контактов МП становится изменение парацеллюлярного транспорта. Физиологические процессы для парацеллюлярного транспорта малых молекул и ионов достаточно хорошо изучены, но для макромолекул такого понимания пока нет. Существует несколько гипотез, описывающих этот процесс. Так, по одной из них (модели динамических нитей) внутримембранные нити плотных контактов перестраиваются, поочередно открываясь и закрываясь, и обеспечивают медленную диффузию. Такие последовательные диффузионные барьеры могут быть образованы белковыми полимерами или инвертированными липидными цилиндрами, стабильность которых регулируется ассоциированными белками [144]. В этой модели селективность по размеру определяется расстоянием между внешними слоями двух контактирующих плазматических мембран. Другая гипотеза предполагает, что плотные контакты образуются двумя инвертированными мицеллами разного размера, а диффузия макромолекул происходит внутри более крупных мицелл, которые динамически образуются и растворяются [21].

Также предполагается, что макромолекулярный транспорт может происходить через трехклеточный контакт, в области центральной трубки, регулируемой трицеллюлином [145]. Трехклеточные контакты регулируют также диapedез Т-клеток через ГЭБ [146], а значит могут быть местом внедрения нейтрофилов под эндотелий.

Таким образом, патологические изменения в межклеточных областях с частично разрушенными в результате активности МП плотными контактами представляют особый интерес для исследований. Транспортные процессы в областях с явно выраженной редукцией одного или двух измерений (для двух- или трехклеточных контактов соответственно) могут быть одним из регуляторных механизмов, управляющих разрушением ГЭБ под действием МП.

Помимо этого, изучение начальных процессов, связанных с повышением активности МП, происходящих на ранних этапах развития ишемического инсульта, затруднено, так как характерные времена одних процессов крайне малы (начало апоптоза, диссоциация клаудина через кавеолин-зависимый сигнальный путь, миграция и деградация нейтрофилов при реканализации) – порядка 10 мин, что требует регистрации изменений практически в режиме реального времени. Текущие экспериментальные методы позволяют оценить результат работы этих процессов, но не позволяют разделить эти быстрые процессы и изучить механизмы их протекания, определить локальные концентрации МП, очередность включения их источников, основные субстраты для каждого момента времени. Одновременно с этим изучение процессов, происходящих на поздних этапах ишемического инсульта, осложнено большими характерными временами – десятки дней. Таким образом, только временной промежуток до 1 дня изучен достаточно хорошо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разрушение ГЭБ происходит на фоне множества других процессов, протекающих параллельно с ним: лизис тромба (эндогенный или лекарственно индуцированный), вызывающего окклюзию сосуда; реканализация с сопутствующим транспортом нейтрофилов в область повреждения; нейровоспаление, вызываемое отеком, кровоизлиянием или гибелью ткани головного мозга; активация процессов репарации повреждения. Источники МП в разные моменты времени находятся по разные стороны ГЭБ, а характерные времена процесса – десятки и сотни часов.

Все это сильно лимитирует возможности каждого из типов модельных систем для объективной оценки процесса. Так, *in vivo* модели позволяют наблюдать целостную картину происходящего, но не дают возможности рассмотреть детали (концентрации веществ, вклады различных потоков веществ, как транспортных, так и реакционных). В моделях *in vitro* можно детальнее изучить управляющие механизмы, но довольно сложно воссоздать условия, необходимые и достаточные для реализации исследуемого феномена (например, какое должно быть клеточное окружение, как должны меняться внешние условия, как оценивать вклад реканализации и т.д.). В моделях *in silico* основным препятствием является неконкретность входных данных, таких как концентрации веществ и константы скоростей реакций.

Тем не менее исследование сложных биологических систем, таких как свертывание крови, фибринолиз, комплемент, гликолиз и др., показало, что после описательного этапа, на котором осуществляется первичный сбор информации о последовательности реакций и скоростях, их участниках и концентрациях, необходим синтетический этап, когда на основе имеющихся данных выдвигаются гипотезы о регулирующих механизмах, создаются математические модели от простых феноменологических до детальных многокомпонентных, которые дают экспериментально проверяемые предсказания о функционировании системы.

Несмотря на указанные выше сложности с созданием *in silico* модели, описывающей определенные аспекты протекания ишемического инсульта, наиболее перспективным на данный момент выглядит моделирование каскада активации МП, строения плотных контактов, миграции нейтрофилов и различных этапов деградации ГЭБ на начальных этапах ишемии, так как большинство экспериментальных данных было собрано именно для этого временного интервала, во время которого осуществляется рекомендованное терапевтическое вмешательство и наблюдаются побочные эффекты терапии.

Создание таких моделей позволит ускорить исследования ишемического инсульта и разработку новых подходов в терапии, так как обеспечит широкий фронт экспериментально проверяемых гипотез о регуляторных механизмах и ключевых участниках реакций, а также систематизирует огромные накопленные данные, находящиеся в достаточно разрозненном состоянии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта № 075-15-2021-950. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и оформление рисунков (А.М.Ш.), написание и редактирование текста, утверждение финального варианта статьи для публикации (Л.Ю.К. и А.М.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, Fisher M, Pandian J, Lindsay P* (2022) World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke* 17: 18–29. <https://doi.org/10.1177/17474930211065917>
2. *Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK* (2008) Epidemiology of Ischemic and Hemorrhagic Stroke: Incidence, Prevalence, Mortality, and Risk Factors. *Neurol Clin* 26: 871–895. <https://doi.org/10.1016/j.necl.2008.07.003>
3. *Woodruff TM, Thundyil J, Tang S-C, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV* (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6: 11. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-11>
4. *Xiong Y, Wakhloo AK, Fisher M* (2022) Advances in Acute Ischemic Stroke Therapy. *Circ Res* 130: 1230–1251. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319948>
5. *Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F, Andersen G, Berthezene Y, Cheng B, Cheripelli B, Cho T-H, Fazekas F, Fiehler J, Ford I, Galinovic I, Gellissen S, Golsari A, Gregori J, Günther M, Guibernau J, Häusler KG, Hennerici M, Kemmling A, Marstrand J, Modrau B, Neeb L, Perez de la Ossa N, Puig J, Ringleb P, Roy P, Scheel E, Schonewille W, Serena J, Sunaert S, Villringer K, Wouters A, Thijs V, Ebinger M, Endres M, Fiebach JB, Lemmens R, Muir KW, Nighoghossian N, Pedraza S, Gerloff C* (2018) MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset. *N Engl J Med* 379: 611–622. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804355>
6. *Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, Hao Q, Tourdias T, Wu O, Kim JS, Breuer L, Singer OC, Warach S, Christensen S, Treszl A, Forkert ND, Galinovic I, Rosenkranz M, Engelhorn T, Köhrmann M, Endres M, Kang D-W, Dousset V, Sorensen AG, Liebeskind DS, Fiebach JB, Fiehler J, Gerloff C* (2011) DWI-FLAIR mismatch for the identification of patients with acute ischaemic stroke within 4·5 h of symptom onset (PRE-FLAIR): a multicentre observational study. *Lancet Neurol* 10: 978–986. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70192-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70192-2)
7. *Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, Yavagal DR, Ribo M, Cognard C, Hanel RA, Sila CA, Hassan AE, Millan M, Levy EI, Mitchell P, Chen M, English JD, Shah QA, Silver FL, Pereira VM, Mehta BP, Baxter BW, Abraham MG, Cardona P, Veznedaroglu E, Hellinger FR, Feng L, Kirmani JF, Lopes DK, Jankowitz BT, Frankel MR, Costalat V, Vora NA, Yoo AJ, Malik AM, Furlan AJ, Rubiera M, Aghaebrahim A, Olivot J-M, Tekle WG, Shields R, Graves T, Lewis RJ, Smith WS, Liebeskind DS, Saver JL, Jovin TG* (2018) Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med* 378: 11–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706442>
8. *Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, McTaggart RA, Torbey MT, Kim-Tenser M, Leslie-Mazwi T, Sarraj A, Kasner SE, Ansari SA, Yeatts SD, Hamilton S, Mlynash M, Heit JJ, Zaharchuk G, Kim S, Carrozzella J, Palesch YY, Demchuk AM, Bammer R, Lavori PW, Broderick JP, Lansberg MG* (2018) Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med* 378: 708–718. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713973>
9. *Hui W, Wu C, Zhao W, Sun H, Hao J, Liang H, Wang X, Li M, Jadhav AP, Han Y, Ji X* (2020) Efficacy and Safety of Recanalization Therapy for Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion. *Stroke* 51: 2026–2035. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.028624>
10. (1995) Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 333: 1581–1588. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
11. *Keaney J, Campbell M* (2015) The dynamic blood–brain barrier. *FEBS J* 282: 4067–4079. <https://doi.org/10.1111/febs.13412>
12. *Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E* (2006) Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
13. *Abbott NJ, Romero JA* (1996) Transporting therapeutics across the blood–brain barrier. *Mol Med Today* 2: 106–113. [https://doi.org/10.1016/1357-4310\(96\)88720-X](https://doi.org/10.1016/1357-4310(96)88720-X)

14. *Risau W, Wolburg H* (1990) Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 13: 174–178. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90043-A](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90043-A)
15. *Farkas E, Luiten PG* (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 64: 611. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00068-X)
16. *Kutcher ME, Herman IM* (2009) The pericyte: Cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res* 77: 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.01.007>
17. *Tamai I, Tsuji A* (2000) Transporter-Mediated Permeation of Drugs Across the Blood–Brain Barrier. *J Pharm Sci* 89: 1371–1388. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200011\)89:11<1371::AID-JPS1>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200011)89:11<1371::AID-JPS1>3.0.CO;2-D)
18. *Thomas WE* (1999) Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Rev* 31: 42–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00024-7)
19. *Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C* (2001) Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *J Cell Biol* 153: 543–554. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.543>
20. *Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H* (2011) Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* 55: 467–476. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103224sl>
21. *Lingaraju A, Long TM, Wang Y, Austin JR, Turner JR* (2015) Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Semin Cell Dev Biol* 42: 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.04.008>
22. *Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccato MR, Proctor W, Colegio OR, Anderson JM* (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121: 298–305. <https://doi.org/10.1242/jcs.021485>
23. *Yu ASL, Cheng MH, Angelow S, Günzel D, Kanzawa SA, Schneeberger EE, Fromm M, Coalson RD* (2009) Molecular Basis for Cation Selectivity in Claudin-2–based Paracellular Pores: Identification of an Electrostatic Interaction Site. *J Gen Physiol* 133: 111–127. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810154>
24. *Tsukita S, Furuse M, Itoh M* (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285–293. <https://doi.org/10.1038/35067088>
25. *Walker DC, MacKenzie A, Hosford S* (1994) The Structure of the Tricellular Region of Endothelial Tight Junctions of Pulmonary Capillaries Analyzed by Freeze-Fracture. *Microvasc Res* 48: 259–281. <https://doi.org/10.1006/mvre.1994.1054>
26. *Walker DC, MacKenzie A, Hulbert WC, Hogg JC* (1985) A Re-Assessment of the Tricellular Region of Epithelial Cell Tight Junctions in Trachea of Guinea Pig. *Cells Tissues Organs* 122: 35–38. <https://doi.org/10.1159/000145982>
27. *Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S* (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171: 939–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510043>
28. *Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S* (1998) A Single Gene Product, Claudin-1 or -2, Reconstitutes Tight Junction Strands and Recruits Occludin in Fibroblasts. *J Cell Biol* 143: 391–401. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.2.391>
29. *Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S* (1999) Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol* 9: 1035–1038. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80452-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80452-7)
30. *Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS* (2016) Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
31. *Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S* (1999) Direct Binding of Three Tight Junction-Associated Maguks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the CooH Termini of Claudins. *J Cell Biol* 147: 1351–1363. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>
32. *Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse S, Tsukita S* (2006) ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell* 126: 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.043>

33. Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA (2001) Cloning of Human Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM3) and Its Identification as the JAM2 Counter-receptor. *J Biol Chem* 276: 45826–45832.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105972200>
34. Mandell KJ, Babbitt BA, Nusrat A, Parkos CA (2005) Junctional Adhesion Molecule 1 Regulates Epithelial Cell Morphology through Effects on β 1 Integrins and Rap1 Activity. *J Biol Chem* 280: 11665–11674.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412650200>
35. Ruben GC, Yurchenko PD (1994) High resolution platinum-carbon replication of freeze-dried basement membrane. *Microsc Res Tech* 28: 13–28.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070280104>
36. Yao Y (2019) Basement membrane and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 39: 3–19.
<https://doi.org/10.1177/0271678X18801467>
37. Paulsson M (1992) Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 93–127.
<https://doi.org/10.3109/10409239209082560>
38. Kim S-H, Turnbull J, Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209: 139–151.
<https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>
39. Baeten KM, Akassoglou K (2011) Extracellular matrix and matrix receptors in blood–brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol* 71: 1018–1039.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20954>
40. Özen I, Deierborg T, Miharada K, Padel T, Englund E, Genové G, Paul G (2014) Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta Neuropathol* 128: 381–396.
<https://doi.org/10.1007/s00401-014-1295-x>
41. Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, Kawahara M, Taguchi A, Matsuyama T (2015) Brain Vascular Pericytes Following Ischemia Have Multipotential Stem Cell Activity to Differentiate Into Neural and Vascular Lineage Cells. *Stem Cells* 33: 1962–1974.
<https://doi.org/10.1002/stem.1977>
42. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C (2010) Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* 468: 557–561.
<https://doi.org/10.1038/nature09522>
43. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010) Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468: 562–566.
<https://doi.org/10.1038/nature09513>
44. Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(2): 137–149.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200302000-00001>
45. Alvarez JI, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61: 1939–1958.
<https://doi.org/10.1002/glia.22575>
46. Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC (2013) The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6.
<https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>
47. Heithoff BP, George KK, Phares AN, Zuidhoek IA, Munoz-Ballester C, Robel S (2021) Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia* 69: 436–472.
<https://doi.org/10.1002/glia.23908>
48. Dufour A, Overall CM (2015) Subtracting Matrix Out of the Equation: New Key Roles of Matrix Metalloproteinases in Innate Immunity and Disease. In: *Matrix Metalloproteinase Biology*. Wiley, 131–152
49. Schultz GS, Wysocki A (2009) Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 17: 153–162.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>
50. Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317–1326.
<https://doi.org/10.1091/mbc.4.12.1317>
51. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2: 737–744.
<https://doi.org/10.1038/35036374>

-
52. Copin J, Goodyear M, Gidday JM, Shah AR, Gascon E, Dayer A, Morel DM, Gasche Y (2005) Role of matrix metalloproteinases in apoptosis after transient focal cerebral ischemia in rats and mice. *Eur J Neurosci* 22: 1597–1608.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04367.x>
 53. Walker EJ, Rosenberg GA (2009) TIMP-3 and MMP-3 contribute to delayed inflammation and hippocampal neuronal death following global ischemia. *Exp Neurol* 216: 122–131.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.11.022>
 54. Huang T, Gao D, Jiang X, Hu S, Zhang L, Fei Z (2014) Resveratrol inhibits oxygen-glucose deprivation-induced MMP-3 expression and cell apoptosis in primary cortical cells via the NF- κ B pathway. *Mol Med Rep* 10: 1065–1071.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2239>
 55. Malemud, Charles J (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11: 1696.
<https://doi.org/10.2741/1915>
 56. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463–516.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>
 57. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1992) TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res* 576: 203–207.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90681-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90681-X)
 58. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007) Matrix Metalloproteinase-Mediated Disruption of Tight Junction Proteins in Cerebral Vessels is Reversed by Synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitor in Focal Ischemia in Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 697–709.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375>
 59. Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W (2012) Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Occludin Degradation and Caveolin-1-Mediated Claudin-5 Redistribution Contribute to Blood–Brain Barrier Damage in Early Ischemic Stroke Stage. *J Neurosci* 32: 3044–3057.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6409-11.2012>
 60. Sopata I, Dancewicz AM (1974) Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta - Enzymol* 370: 510–523.
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(74\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(74)90112-0)
 61. McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM (2008) Systemic Inflammation Alters the Kinetics of Cerebrovascular Tight Junction Disruption after Experimental Stroke in Mice. *J Neurosci* 28: 9451–9462.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2674-08.2008>
 62. Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, Montaner J (2008) Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 84: 207–214.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0907606>
 63. Wang G, Guo Q, Hossain M, Fazio V, Zeynalov E, Janigro D, Mayberg MR, Namura S (2009) Bone marrow-derived cells are the major source of MMP-9 contributing to blood–brain barrier dysfunction and infarct formation after ischemic stroke in mice. *Brain Res* 1294: 183–192.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.070>
 64. Zitka O, Kukacka J, Krizkov S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R (2010) Matrix Metalloproteinases. *Curr Med Chem* 17: 3751–3768.
<https://doi.org/10.2174/092986710793213724>
 65. Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, Grati M, Mittal J, Yan D, Chapagain P, Liu XZ (2016) Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol* 231: 2599–2621.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25430>
 66. Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM (2001) Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1528: 61–73.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00190-8)
 67. Pan R, Yu K, Weatherwax T, Zheng H, Liu W, Liu KJ (2017) Blood Occludin Level as a Potential Biomarker for Early Blood Brain Barrier Damage Following Ischemic Stroke. *Sci Rep* 7: 40331.
<https://doi.org/10.1038/srep40331>
 68. Asahi M, Asahi K, Jung J-C, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000) Role for Matrix Metalloproteinase 9 after Focal Cerebral Ischemia: Effects of Gene Knockout and Enzyme Inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1681–1689.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007>

69. *Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung J-C, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH* (2001) Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on the Proteolysis of Blood–Brain Barrier and White Matter Components after Cerebral Ischemia. *J Neurosci* 21: 7724–7732.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07724.2001>
70. *Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH* (2009) Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 50: 1914–1923.
<https://doi.org/10.1002/hep.23203>
71. *Kazmierski R, Michalak S, Wencel-Warot A, Nowinski WL* (2012) Serum tight-junction proteins predict hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients. *Neurology* 79: 1677–1685.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826e9a83>
72. *Dagonnier M, Donnan GA, Davis SM, Dewey HM, Howells DW* (2021) Acute Stroke Biomarkers: Are We There Yet? *Front Neurol* 12.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.619721>
73. *Verma RP, Hansch C* (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 15: 2223–2268.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>
74. *Klein T, Bischoff R* (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 41: 271–290.
<https://doi.org/10.1007/s00726-010-0689-x>
75. *Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR* (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* 5: 1732–1739.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x>
76. *Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K* (2009) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor–related protein. *Blood* 114: 3352–3358.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203919>
77. *Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA* (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* 50: 329–339.
<https://doi.org/10.1002/glia.20169>
78. *Nagase H, Murphy G* Tailoring TIMPs for Selective Metalloproteinase Inhibition. In: *The Cancer Degradome*. Springer New York. 787–810.
79. *Hamze AB, Wei S, Bahudhanapati H, Kota S, Acharya KR, Brew K* (2007) Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors. *Protein Sci* 16: 1905–1913.
<https://doi.org/10.1110/ps.072978507>
80. *Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knäuper V, Docherty AJ, Murphy G* (1998) TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435: 39–44.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01031-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01031-X)
81. *Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K* (2001) TIMP-3 Is a Potent Inhibitor of Aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and Aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem* 276: 12501–12504.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000848200>
82. *Wang W-M, Ge G, Lim NH, Nagase H, Greenspan DS* (2006) TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem J* 398: 515–519.
<https://doi.org/10.1042/BJ20060630>
83. *Reuter B, Rodemer C, Grudzenski S, Couraud P-O, Weksler B, Romero IA, Meairs S, Bugert P, Hennerici MG, Fatar M* (2013) Temporal Profile of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in a Human Endothelial Cell Culture Model of Cerebral Ischemia. *Cerebrovasc Dis* 35: 514–520.
<https://doi.org/10.1159/000350731>
84. *Meng L, Zhang Y, Li D, Shang X, Hao X, Chen X, Gao F* (2021) TIMP3 attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress in neurocytes by regulating the AKT pathway. *Exp Ther Med* 22: 973.
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10405>
85. *Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapke F, Hebling S, Frosch M* (2010) Neisseria meningitidis Induces Brain Microvascular Endothelial Cell Detachment from the Matrix and Cleavage of Occludin: A Role for MMP-8. *PLoS Pathog* 6: e1000874.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000874>
86. *Orbe J, Barrenetxe J, Rodriguez JA, Vivien D, Orset C, Parks WC, Birkland TP, Serrano R, Purroy A, Martinez de Lizarrondo S, Angles-Cano E, Páramo JA* (2011) Matrix Metalloproteinase-10 Effectively Reduces Infarct Size in Experimental Stroke by Enhancing Fibrinolysis via a Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor–Mediated Mechanism. *Circulation* 124: 2909–2919.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.047100>

87. Balbin M, Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Freije JP, Lopez-Otin C (1999) Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* 107: 45–53.
<https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01525.x>
88. Ma F, Martínez-San Segundo P, Barceló V, Morancho A, Gabriel-Salazar M, Giralí D, Montaner J, Rosell A (2016) Matrix metalloproteinase-13 participates in neuroprotection and neurorepair after cerebral ischemia in mice. *Neurobiol Dis* 91: 236–246.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.016>
89. Yang Y, Rosenberg GA (2011) Blood–Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 42: 3323–3328.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257>
90. Wang CX, Shuaib A (2007) Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol* 83: 140–148.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.07.006>
91. Hamann GF, Liebetrau M, Martens H, Burggraf D, Kloss CUA, Bültmeier G, Wunderlich N, Jäger G, Pfefferkorn T (2002) Microvascular Basal Lamina Injury after Experimental Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 526–533.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200205000-00004>
92. Latour LL, Kang D, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S (2004) Early blood–brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 56: 468–477.
<https://doi.org/10.1002/ana.20199>
93. Warach S, Latour LL (2004) Evidence of Reperfusion Injury, Exacerbated by Thrombolytic Therapy, in Human Focal Brain Ischemia Using a Novel Imaging Marker of Early Blood–Brain Barrier Disruption. *Stroke* 35: 2659–2661.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000144051.32131.09>
94. Klops J, Steinbrink J, Bourayou R, Mueller S, Cordell R, Licha K, Schirner M, Dirnagl U, Lindauer U, Wunder A (2009) Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: A novel method for non-invasive optical imaging of blood–brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Methods* 180: 126–132.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.03.002>
95. Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 32: 200–219.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.005>
96. Lakhani SE, Kirchgeßner A, Hofer M (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7: 97.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-97>
97. Mizuma A, Yenari MA (2017) Anti-Inflammatory Targets for the Treatment of Reperfusion Injury in Stroke. *Front Neurol* 8.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00467>
98. Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J (1998) Cytokine-mediated Transcriptional Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Requires Both Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B-binding Sites. *J Biol Chem* 273: 22201–22208.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22201>
99. Wang Z, Leng Y, Tsai L-K, Leeds P, Chuang D-M (2011) Valproic Acid Attenuates Blood–Brain Barrier Disruption in a Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischemia: The Roles of HDAC and MMP-9 Inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 52–57.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.195>
100. Qin W, Li J, Zhu R, Gao S, Fan J, Xia M, Zhao RC, Zhang J (2019) Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY)* 11: 11391–11415.
<https://doi.org/10.18632/aging.102537>
101. Deng L, Zhang J, Chen S, Wu Y, Fan X, Zuo T, Hu Q, Jiang L, Yang S, Dong Z (2023) miR-671-5p Upregulation Attenuates Blood–Brain Barrier Disruption in the Ischemia Stroke Model Via the NF- κ B/MMP-9 Signaling Pathway. *Mol Neurobiol* 60: 3824–3838.
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03318-7>
102. Cai H, Ma Y, Jiang L, Mu Z, Jiang Z, Chen X, Wang Y, Yang G-Y, Zhang Z (2017) Hypoxia Response Element-Regulated MMP-9 Promotes Neurological Recovery via Glial Scar Degradation and Angiogenesis in Delayed Stroke. *Mol Ther* 25: 1448–1459.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.020>
103. Abdelnaseer MM, Elfauomy NM, Esmail EH, Kamal MM, Elsayy EH (2017) Matrix Metalloproteinase-9 and Recovery of Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26: 733–740.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.043>

104. *Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL* (1997) Nitric Oxide Synthase in Models of Focal Ischemia. *Stroke* 28: 1283–1288.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.28.6.1283>
105. *Taraboletti G, D'Ascenzoy S, Giusti I, Marchetti D, Borsotti P, Millimaggi D, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V* (2006) Bioavailability of VEGF in Tumor-Shed Vesicles Depends on Vesicle Burst Induced by Acidic pH. *Neoplasia* 8: 96–103.
<https://doi.org/10.1593/neo.05583>
106. *Furuse M, Izumi Y, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N* (2014) Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers* 2: e28960.
<https://doi.org/10.4161/tisb.28960>
107. *Eum SY, Jaraki D, Bertrand L, András IE, Toborek M* (2014) Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N -3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Liver Physiol* 306: G992–G1001.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00016.2014>
108. *Rosenberg GA* (1999) Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* 42: 209–216.
[https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(99\)70003-4](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(99)70003-4)
109. *Zozulya A, Weidenfeller C, Galla H-J* (2008) Pericyte–endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood–brain barrier in vitro. *Brain Res* 1189: 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.099>
110. *Mostafa Mtairag E* (2001) Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res* 49: 882–890.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00287-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00287-X)
111. *Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J* (2008) MMP-9–Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood–Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke. *Stroke* 39: 1121–1126.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.500868>
112. *Turner RJ, Sharp FR* (2016) Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci* 10.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00056>
113. *Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ* (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66: 232–245.
<https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.12.028>
114. *Underly RG, Levy M, Hartmann DA, Grant RI, Watson AN, Shih AY* (2017) Pericytes as Inducers of Rapid, Matrix Metalloproteinase-9-Dependent Capillary Damage during Ischemia. *J Neurosci* 37: 129–140.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2891-16.2016>
115. *Mun-Bryce S, Lukes A, Wallace J, Lukes-Marx M, Rosenberg GA* (2002) Stromelysin-1 and gelatinase A are upregulated before TNF- α in LPS-stimulated neuroinflammation. *Brain Res* 933: 42–49.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02303-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02303-X)
116. *Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA* (2006) Blood–brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* 23: 87–96.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.006>
117. *Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R* (2003) Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 386–395.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01405-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01405-0)
118. *Wolburg H, Lippoldt A* (2002) Tight junctions of the blood–brain barrier. *Vascul Pharmacol* 38: 323–337.
[https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00200-8](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00200-8)
119. *Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T* (2008) Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. *Am J Pathol* 172: 521–533.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070076>
120. *Gurnik S, Devraj K, Macas J, Yamaji M, Starke J, Scholz A, Sommer K, Di Tacchio M, Vutukuri R, Beck H, Mittelbronn M, Foerch C, Pfeilschifter W, Liebner S, Peters KG, Plate KH, Reiss Y* (2016) Angiopoietin-2-induced blood–brain barrier compromise and increased stroke size are rescued by VE-PTP-dependent restoration of Tie2 signaling. *Acta Neuropathol* 131: 753–773.
<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1551-3>
121. *Truong TQ, Aubin D, Bourgeois P, Falstra L, Brissette L* (2006) Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1761: 24–36.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.12.004>

122. Frank PG, Cheung MW-C, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP (2006) Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Circ Physiol* 291: H677–H686.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01092.2005>
123. Sowa G (2012) Regulation of Cell Signaling and Function by Endothelial Caveolins: Implications in Disease. *Transl Med Suppl* 8: 001.
<https://doi.org/10.4172/2161-1025.S8-001>
124. Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Tauer U, Roncali L, Bertossi M (2002) Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* 115: 145–152.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00374-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00374-3)
125. Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS (1997) Identification of Caveolin and Caveolin-Related Proteins in the Brain. *J Neurosci* 17: 9520–9535.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-24-09520.1997>
126. Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, Tong Y, Chung SK, Liu KJ, Shen J (2012) Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem* 120: 147–156.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07542.x>
127. Liu J, Weaver J, Jin X, Zhang Y, Xu J, Liu KJ, Li W, Liu W (2016) Nitric Oxide Interacts with Caveolin-1 to Facilitate Autophagy-Lysosome-Mediated Claudin-5 Degradation in Oxygen-Glucose Deprivation-Treated Endothelial Cells. *Mol Neurobiol* 53: 5935–5947.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9504-8>
128. Tanswell P, Tebbe U, Neuhaus KL, Gläsele-Schwarz L, Wojcik J, Seifried E (1992) Pharmacokinetics and fibrin specificity of alteplase during accelerated infusions in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 19: 1071–1075.
[https://doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90297-z](https://doi.org/10.1016/0735-1097(92)90297-z)
129. Hahn-Dantona E, Ramos-Desimone N, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999) Activation of ProMMP-9 by a Plasmin/MMP-3 Cascade in a Tumor Cell Model: Regulation by Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 878: 372–387.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07696.x>
130. Terruso V, D'Amelio M, Di Benedetto N, Lupo I, Saia V, Famoso G, Mazzola MA, Aridon P, Sarno C, Ragonesi P, Savettieri G (2009) Frequency and Determinants for Hemorrhagic Transformation of Cerebral Infarction. *Neuroepidemiology* 33: 261–265.
<https://doi.org/10.1159/000229781>
131. England TJ, Bath PMW, Sare GM, Geeganage C, Moulin T, O'Neill D, Woimant F, Christensen H, De Deyn P, Leys D, Ringelstein EB (2010) Asymptomatic Hemorrhagic Transformation of Infarction and Its Relationship With Functional Outcome and Stroke Subtype. *Stroke* 41: 2834–2839.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.573063>
132. Charbonnier G, Bonnet L, Biondi A, Moulin T (2021) Intracranial Bleeding After Reperfusion Therapy in Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2020.629920>
133. Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, Ageno W, Alberti A, Lanari A, Caso V, Micheli S, Bertolani L, Venti M, Palmerini F, Biagini S, Comi G, Previdi P, Silvestrelli G (2008) Early Hemorrhagic Transformation of Brain Infarction: Rate, Predictive Factors, and Influence on Clinical Outcome. *Stroke* 39: 2249–2256.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.510321>
134. Szpak GM, Lechowicz W, Lewandowska E, Bertrand E, Wierzba-Bobrowicz T, Dymecki J (1999) Border zone neovascularization in cerebral ischemic infarct. *Folia Neuropathol* 37: 264–268.
135. Li W-L, Fraser JL, Yu SP, Zhu J, Jiang Y-J, Wei L (2011) The role of VEGF/VEGFR2 signaling in peripheral stimulation-induced cerebral neurovascular regeneration after ischemic stroke in mice. *Exp Brain Res* 214: 503–513.
<https://doi.org/10.1007/s00221-011-2849-y>
136. Adamczak JM, Schneider G, Nelles M, Que I, Suidgeest E, van der Weerd L, Lawik C, Hoehn M (2014) In vivo bioluminescence imaging of vascular remodeling after stroke. *Front Cell Neurosci* 8.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00274>
137. Matsuo R, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Kuwashiro T, Hata J, Sugimori H, Fukuda K, Gotoh S, Makiyama N, Fukuhara M, Awano H, Isomura T, Suzuki K, Yasaka M, Okada Y, Kiyohara Y, Kitazono T (2013) Clinical significance of plasma VEGF value in ischemic stroke - research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS) study. *BMC Neurol* 13: 32.
<https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-32>
138. Shan Y, Tan S, Lin Y, Liao S, Zhang B, Chen X, Wang J, Deng Z, Zeng Q, Zhang L, Wang Y, Hu X, Qiu W, Peng L, Lu Z (2019) The glucagon-like peptide-1 receptor agonist reduces inflammation and blood-brain barrier breakdown in an astrocyte-dependent manner in experimental stroke. *J Neuroinflammation* 16: 242.
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1638-6>

139. Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, Divoux D, MacKenzie ET, Bernaudin M, Roussel S, Petit E (2005) VEGF-Induced BBB Permeability is Associated with an MMP-9 Activity Increase in Cerebral ischemia: Both Effects Decreased by ANG-1. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1491–1504.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600148>
140. Chau KY, Sivaprasad S, Patel N, Donaldson TA, Luthert PJ, Chong N V (2007) Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye* 21: 1511–1515.
<https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702722>
141. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A (2003) Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 34: 40–46.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000046764.57344.31>
142. Valente FM, de Andrade DO, Cosenso-Martin LN, Cesarino CB, Guimarães SM, Guimarães VB, Lacchini R, Tanus-Santos JE, Yugar-Toledo JC, Vilela-Martin JF (2020) Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are elevated in individuals with hypertensive crisis. *BMC Cardiovasc Disord* 20: 132.
<https://doi.org/10.1186/s12872-020-01412-5>
143. Zhong C, Yang J, Xu T, Xu T, Peng Y, Wang A, Wang J, Peng H, Li Q, Ju Z, Geng D, Zhang Y, He J (2017) Serum matrix metalloproteinase-9 levels and prognosis of acute ischemic stroke. *Neurology* 89: 805–812.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004257>
144. Steed E, Balda MS, Matter K (2010) Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* 20: 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.002>
145. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Günzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M (2009) Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Mol Biol Cell* 20: 3713–3724.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0080>
146. Castro Dias M, Odriozola Quesada A, Soldati S, Bösch F, Gruber I, Hildbrand T, Sönmez D, Khire T, Witz G, McGrath JL, Piontek J, Kondoh M, Deutsch U, Zuber B, Engelhardt B (2021) Brain endothelial tricellular junctions as novel sites for T cell diapedesis across the blood–brain barrier. *J Cell Sci* 134.
<https://doi.org/10.1242/jcs.253880>

The role of metalloproteinases in the development of ischemia-induced pathologies of the blood-brain barrier

L. Yu. Koliaskin^a, and A. M. Shibeko^{b, c, *}

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

^b*Center for theoretical problems of physico-chemical pharmacology of the Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russia*

^c*Dmitry Rogachev National Medical Research Center Of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology, Moscow, Russia*

**e mail: alshibeko@gmail.com*

The blood-brain barrier maintains brain homeostasis by regulating the transport of nutrients and macromolecules from the bloodstream. Its integrity is disrupted by a number of pathological processes, such as ischemic stroke, neurodegenerative diseases or inflammation. This leads to loss of control of transport processes from the bloodstream to the brain, which causes hemorrhage, oedema and tissue death. The blood-brain barrier permeability is largely regulated by matrix metalloproteinases, a family of enzymes responsible for the blood vessels remodeling, angiogenesis and a number of other physiological and pathological processes. This review presents data on the structure of the blood-brain barrier, its pathological changes, caused by metalloproteinases, the mechanisms that regulate metalloproteinases activity, and the difficulties associated with studying these processes.

Keywords: blood–brain barrier, matrix metalloproteinase, ischemic stroke

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО АЦИДОЗА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
ВКЛАД K_{ATP} И TASK-1 КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИЮ
СОСУДИСТОГО ТОНУСА В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

© 2024 г. А. А. Швецова¹, А. А. Борзых^{1,2}, Д. К. Гайнуллина^{1,*}

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

²Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Dina.Gaynullina@gmail.com

Поступила в редакцию 19.09.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Активность многих белков и, как следствие, механизмов регуляции тонуса сосудов зависит от pH. Снижение pH (при некомпенсированном ацидозе), как правило, вызывает расслабление сосудов, что достаточно подробно изучено для взрослого половозрелого организма. Однако влияние ацидоза на механизмы регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде остается практически неисследованным. Целью данной работы было исследование влияния внеклеточного метаболического ацидоза на функциональный вклад калиевых каналов K_{ATP} и TASK-1 в регуляцию сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде. В работе моделировали некомпенсированный внеклеточный метаболический ацидоз (pH 6.8, эквимоллярная замена $NaHCO_3$ на NaCl в растворе) и исследовали сократительные реакции подкожной артерии у крыс в возрасте 3–4 месяцев и крысят в возрасте 12–15 дней в изометрическом режиме. Оказалось, что сокращение артерий в ответ на действие агониста α_1 -адренорецепторов метоксамина при pH 6.8 снижено по сравнению с нормальным pH 7.4 как у крыс в возрасте 3–4 месяцев, так и у 12–15-дневных животных. Блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид не приводил к изменению реакций артерий на метоксамин ни при pH 7.4, ни при pH 6.8 ни в одной из возрастных групп. Блокатор TASK-1-каналов AVE1231 не изменял сократительные реакции артерий ни при одном из pH у крыс в возрасте 3–4 месяцев. Однако у 12–15-дневных крысят прирост сократительных ответов на метоксамин под влиянием AVE1231 был меньше при pH 6.8, чем при pH 7.4. Таким образом, результаты данной работы демонстрируют, что ацидоз уменьшает сократительную активность артерий животных в возрасте 3–4 месяцев и животных в период раннего постнатального онтогенеза, при этом у последних антиконстрикторное влияние каналов TASK-1 снижается, а K_{ATP} -каналы не оказывают влияния на регуляцию тонуса сосудов ни при нормальном, ни при кислом значении pH ни в одной из возрастных групп.

Ключевые слова: ацидоз, артерия, калиевые каналы, АТФ-чувствительные калиевые каналы, каналы TASK-1, гладкая мышца, ранний постнатальный онтогенез

ВВЕДЕНИЕ

Активность большинства белков, а, следовательно, и многих механизмов регуляции тонуса сосудов зависит от кислотности среды, мерой которой является показатель pH. За счет работы буферных систем в норме pH артериальной крови близок к значению 7.4. Закисление крови до значений ниже 7.38 обозначают как состояние некомпенсированного ацидоза [1]. Как правило, закисление приводит к снижению тонуса сосудов [2, 3]. Стоит отметить, что механизмы расслабления сосудов при снижении pH во взрослом половозрелом организме изучены достаточно подробно [4, 5], чего нельзя сказать о периоде раннего постнатального онтогенеза. Ранее нами было показано, что некомпенсированный метаболический ацидоз вызывает уменьшение сократительных реакций подкожных артерий с интактным эндотелием у 12–15-дневных крысят, что связано с усилением антиконстрикторной роли эндотелиального оксида азота [3]. Вместе с тем остается практически неизученным, как в условиях сниженного pH изменяется активность механизмов, присущих гладкомышечным клеткам сосудов, в период раннего постнатального онтогенеза. Важно отметить, что состояние некомпенсированного ацидоза часто возникает у новорожденных детей в результате неонатальной гипоксии (асфиксии) [6]. Данный факт указывает на необходимость всестороннего изучения влияния закисления внеклеточной среды на тонус сосудов в период раннего постнатального онтогенеза.

Одним из механизмов, способствующих расслаблению сосудов при закислении внеклеточной среды, может быть активация калиевых каналов гладкомышечных клеток, что смещает уровень мембранного потенциала в сторону более отрицательных значений, приводя к закрытию потенциал-управляемых кальциевых каналов и, соответственно, снижению внутриклеточной концентрации кальция. Основываясь на работах, исследующих влияние снижения pH на сократительную активность артерий половозрелого организма, наиболее вероятными кандидатами на роль калиевых каналов, активирующихся при закислении, являются K_{ATP} . Отметим, что, согласно данным литературы, функциональный вклад этих каналов в регуляцию сосудистого тонуса в нормальных физиологических условиях проявляется довольно редко [7]. Однако в патологических условиях, в условиях метаболических нарушений, в том числе при смещении кислотно-щелочного равновесия в сторону низких значений pH, их регуляторный вклад существенно возрастает. Действительно, было показано, что снижение pH вызывает активацию K_{ATP} -каналов в изолированных гладкомышечных клетках артерий брыжейки крыс [8]. Кроме того, расслабление артерий мозга, сердца и аорты половозрелых крыс, а также внутренней грудной артерии человека в условиях закисления внеклеточной среды происходит в том числе из-за активации каналов K_{ATP} [9–12]. Однако влияние пониженного pH внеклеточной среды на функциональный вклад K_{ATP} в регуляцию тонуса сосудов в период раннего постнатального онтогенеза ранее не было изучено.

Помимо K_{ATP} , к изменению pH чувствительны каналы TASK-1 (the weak inward-rectifying K^+ (TWIK)-related acid-sensitive K^+ -channel). Каналы TASK-1 являются представителями одного из классов калиевых каналов, имеющих две порообразующие петли (K_{2P}), эти каналы опосредуют ток утечки в гладкомышечных клетках артерий [13, 14]. Показано, что закисление среды подавляет активность каналов TASK-1, тем самым способствуя сокращению гладкой мышцы [15–17]. Примечательно, что каналы TASK-1 обладают более выраженным антиконстрикторным (т.е. противодействующим сокращению) влиянием в артериях в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослым возрастом [18]. Однако чувствительность каналов TASK-1 к внеклеточному pH в раннем постнатальном периоде до этого не была исследована.

Исходя из вышесказанного, снижение внеклеточного pH, с одной стороны, может подавлять ярко выраженное антиконстрикторное влияние каналов TASK-1 в артериях в ранний постнатальный период, а, с другой стороны, приводить к компенсаторной активации антиконстрикторного пути, реализующегося путем активации K_{ATP} -каналов.

Таким образом, целью данной работы было исследование влияния внеклеточного некомпенсированного метаболического ацидоза на функциональный вклад $K_{\text{АТР}}$ -и TASK-1-каналов в регуляцию сосудистого тонуса в раннем постнатальном онтогенезе. Для сравнения с крысами в раннем постнатальном периоде (в возрасте 12–15 дней) в работе использовали крыс в возрасте 3–4 месяцев. Объектом исследования служила подкожная артерия – сосуд мышечного типа, вносящий существенный вклад в регуляцию кожного кровотока, который составляет до 20% от сердечного выброса у новорожденных [19].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Работу проводили на крысах Wistar из питомника НИИ Общей патологии и патофизиологии. Половозрелых самцов и самок крыс содержали в стандартных условиях вивария биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Доступ к пище и воде у животных был свободным; соблюдали световой режим день/ночь длительностью по 12 ч каждый. С целью получения потомства самцов и самок крыс помещали в одну клетку на 4 дня. Всего в работе было использовано потомство от 12 самок. На следующий день после родов ограничивали размер помета до 8 крысят.

Эксперименты проводили на самцах крыс в возрасте 3–4 месяцев, а также на крысах мужского пола в возрасте 12–15 дней. Для проведения исследований на изолированных артериях животных декапитировали (крыс в возрасте 3–4 месяцев предварительно анестезировали с использованием CO_2), после чего выделяли подкожную артерию (сосуд мышечного типа, питающий кровью кожу плюсны и стопы). Выделение артерий проводили в растворе для препаровки (в мМ): NaCl – 145; KCl – 4.5; CaCl_2 – 0.1; MgSO_4 – 1.0; NaH_2PO_4 – 1.2; EDTA – 0.025; HEPES – 5.0; pH 7.4.

Эксперименты на изолированных сосудах

Для проведения экспериментов на изолированных сосудах использовали многоканальные миографы (модели 410A, 420M или 620M, DMT, Дания). Для регистрации сократительной активности в изометрическом режиме из артерий вырезали кольцевые сегменты длиной по 2 мм и закрепляли их в каналах миографа, заполненных раствором для препаровки. Затем проводили удаление эндотелия, совершая вращательные движения внутри сосуда крысиным усом. Оцифровку сигнала проводили с частотой 10 Гц с использованием аналого-цифрового преобразователя (E14-140, L-CARD, Россия). Запись сигнала осуществляли в программе PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия). После того как камеры с препаратами нагревались до 37°C, проводили процедуру нормализации, в ходе которой определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления сократительной активности [20]. После этого раствор в камере миографа сменяли на рабочий (в мМ): NaCl – 120; NaHCO_3 – 26; KCl – 4.5; CaCl_2 – 1.6; MgSO_4 – 1.0; NaH_2PO_4 – 1.2; D-глюкоза – 5.5; EDTA – 0.025; HEPES – 5. Раствор непрерывно аэрировали карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2) для оксигенации и поддержания pH 7.4.

В начале каждого эксперимента проводили процедуру активации препаратов, заключающуюся в добавлении вазоактивных веществ с последующей отмывкой. Сначала к препаратам добавляли норэпинефрин (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин); затем агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин), на фоне действия которого проводили оценку эндотелиальной функции с помощью ацетилхолина (10 мкМ, длительность воздействия 2 мин); в конце процедуры активации вновь добавляли метоксамин (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин). Отсутствие расслабления на ацетилхолин свидетельствовало об успешном удалении

эндотелия. Для всех воздействий в ходе эксперимента длительность отмытки составляла 15 мин, во время отмытки раствор в камере миографа меняли минимум 5 раз.

Протокол эксперимента состоял из двух последовательных зависимостей “концентрация – эффект” на метоксамин (диапазон концентраций 10 нМ – 100 мкМ, длительность действия каждой концентрации 2 мин.). Первую зависимость “концентрация – эффект” на метоксамин проводили через 20 мин. после окончания процедуры активации препарата. Первая зависимость “концентрация – эффект” на метоксамин использовалась для того, чтобы убедиться, что исходная реактивность препаратов внутри одной возрастной группы животных не различалась. После отмытки раствор в камерах миографа сменяли на рабочий раствор с pH 7.4 (состав см. выше). В другой половине препаратов раствор сменяли на рабочий раствор с pH 6.8 (эквимоллярная замена NaHCO_3 на NaCl), содержащий: (в мМ) NaCl 140.5; NaHCO_3 5.5; KCl 4.5; CaCl_2 1.6; MgSO_4 1.0; NaH_2PO_4 1.2; D-глюкоза 5.5; ЭДТА 0.025; HEPES 5.0. Значение pH в камере раствора проверяли с использованием портативного pH-метра (Mettler Toledo). Через 10 мин. к части препаратов добавляли блокаторы калиевых каналов: 3 мкМ глибенкламида (для K_{ATP} -каналов) или 1 мкМ AVE1231 (для TASK-1-каналов). К оставшейся части препаратов добавляли эквивалентный объем растворителя (ДМСО, 5 мкл). Через 20 мин были получены вторые зависимости “концентрация – эффект” на метоксамин, которые представлены на рисунках.

При обработке результатов из значения силы при каждой концентрации метоксамин вычитали значение “пассивной” силы, соответствующее полному расслаблению гладкой мышцы препарата (в растворе для препаровки после окончания процедуры нормализации). Полученные значения активной силы выражали в % от максимальной силы сокращения препарата, определенной по первой зависимости “концентрация – эффект”. Для оценки эффекта ингибитора в программе GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, CA, США) рассчитывали площади под индивидуальными кривыми “концентрация – эффект”, после чего площадь в присутствии ингибитора выражали в процентах от соответствующих значений площади в присутствии растворителя.

В работе использовали норэпинефрин, метоксамин, ацетилхолин, глибенкламид фирмы Sigma-Aldrich, AVE1231 был предоставлен компанией Sanofi.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 7.0. Нормальность распределения проверяли с использованием теста Шапиро-Уилка. Использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (сравнение кривых на графиках, представленных на рис. 1–5) или непарный *t*-критерий Стьюдента (сравнение площадей под кривыми “концентрация – эффект”). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Все данные представлены как среднее $\pm$ $\pm$ ошибка среднего, n – количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внеклеточный ацидоз приводит к уменьшению сократительных ответов артерий у крыс в возрасте 3–4 месяцев и 12–15 дней.

При измерении pH раствора в камере миографа были получены следующие значения pH: 7.39 ± 0.10 (группа pH 7.4, $n = 7$); 6.80 ± 0.11 (группа pH 6.8, $n = 8$). При pH 6.8 сократительные реакции на метоксамин артерий как у крыс в возрасте 3–4 месяцев (рис. 1a), так и 12–15-дневных (рис. 1b) крыс были существенно слабее, чем при pH 7.4.

Ацидоз не приводит к изменению вклада K_{ATP} -каналов в регуляцию тонуса артерий у крыс в возрасте 3–4 месяцев и 12–15 дней.

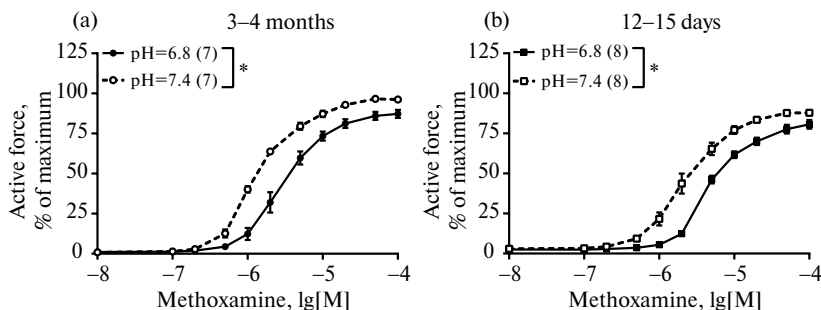


Рис. 1. Влияние внеклеточного ацидоза (pH 6.8) на сократительные ответы подкожной артерии на метоксамин у крыс в возрасте 3–4 месяцев (а) и 12–15 дней (б). Числа в скобках обозначают количество животных в группе. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

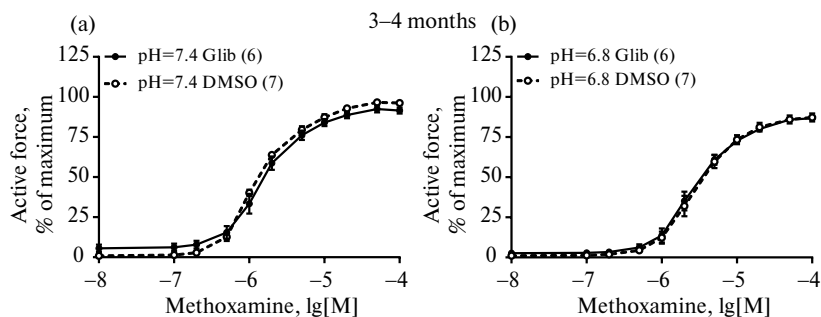


Рис. 2. Влияние блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида на сократительные ответы подкожной артерии на метоксамин у крыс в возрасте 3–4 месяцев при pH 7.4 (а) и pH 6.8 (б). Числа в скобках обозначают количество животных в группе.

На следующем этапе мы оценивали вклад K_{ATP} -каналов в регуляцию тонуса артерий у крыс в возрасте 3–4 месяцев и 12–15 дней при нормальном pH и при pH 6.8. У крыс в возрасте 3–4 месяцев блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид не изменял сократительные ответы артерий на метоксамин ни при pH 7.4 (рис. 2а), ни при pH 6.8 (рис. 2б).

Так же, как и у крыс в возрасте 3–4 месяцев, глибенкламид не вызывал изменения сократительных ответов на метоксамин у 12–15-дневных крысят ни при pH 7.4 (рис. 3а), ни при pH 6.8 (рис. 3б).

Ацидоз приводит к уменьшению вклада TASK-1-каналов в регуляцию тонуса артерий у 12–15-дневных крыс.

На последнем этапе работы мы оценивали вклад каналов TASK-1 в регуляцию тонуса артерий у крыс в возрасте 3–4 месяцев и 12–15-дневных крыс при нормальном pH и при pH 6.8. У крыс в возрасте 3–4 месяцев блокатор TASK-1-каналов AVE1231 не изменял сократительные ответы артерий на метоксамин ни при pH 7.4 (рис. 4а), ни при pH 6.8 (рис. 4б).

У 12–15-дневных крысят AVE1231 приводил к существенному усилению сократительных ответов артерий на метоксамин при pH 7.4 (рис. 5а). При pH 6.8 AVE1231 также вызывал прирост сократительных ответов на метоксамин (рис. 5б), который, однако, был меньше, чем при нормальном pH. Для того, чтобы сравнить эффекты AVE1231 при pH 7.4 и при pH 6.8, мы оценивали изменение площади под кривыми в присутствии AVE1231 в процентах от площади в присутствии растворителя при каждом pH. Оказалось, что при pH 7.4 площадь в присутствии AVE1231 составила $164 \pm 10\%$ от площади

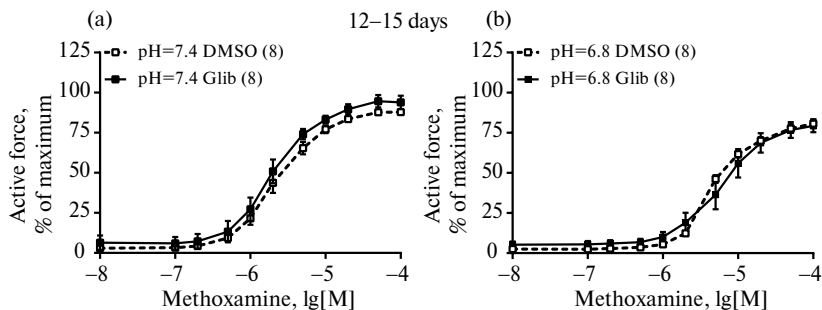


Рис. 3. Влияние блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида на сократительные ответы подкожной артерии на метоксамин у 12–15-дневных крысят при pH 7.4 (a) и pH 6.8 (b). Числа в скобках обозначают количество животных в группе.

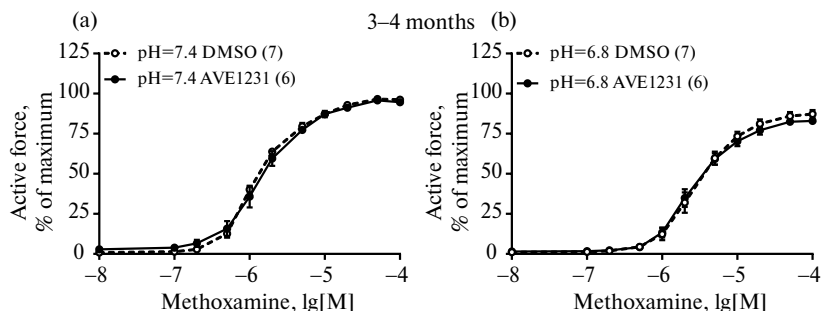


Рис. 4. Влияние блокатора TASK-1-каналов AVE1231 на сократительные ответы подкожной артерии на метоксамин у крыс в возрасте 3–4 месяцев при pH.

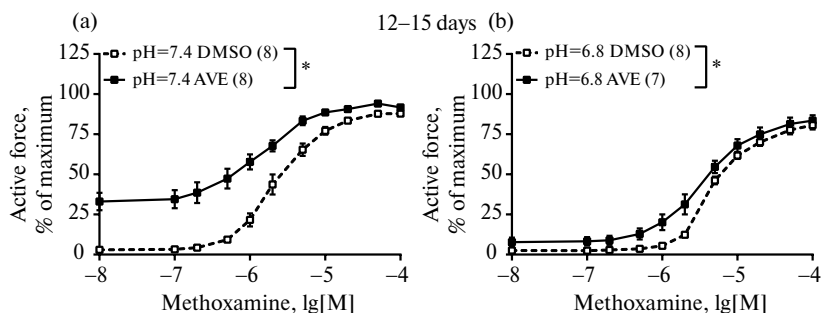


Рис. 5. Влияние блокатора TASK-1-каналов AVE1231 на сократительные ответы подкожной артерии на метоксамин у 12–15-дневных крысят при pH 7.4 (a) и pH 6.8 (b). Числа в скобках обозначают количество животных в группе. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений). 7.4 (a) и pH 6.8 (b). Числа в скобках обозначают количество животных в группе.

в присутствии ДМСО, а при pH 6.8 площадь в присутствии AVE1231 составила $128 \pm 12\%$ от площади в присутствии ДМСО ($p < 0.05$, непарный t -критерий Стьюдента). Следовательно, мы можем сделать вывод, что при более кислом pH влияние AVE1231 на сократительные ответы артерий на метоксамин у 12–15-дневных крысят оказываются меньше, чем при нормальном pH.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данной работы нами было проведено исследование роли K_{ATP} и TASK-1 калиевых каналов в регуляции сократительных ответов артерий при некомпенсированном внеклеточном ацидозе у 12–15-дневных крыс и крыс в возрасте 3–4 месяцев. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что внеклеточный метаболический ацидоз подавляет сократительные ответы резистивных артерий как у крыс в возрасте 3–4 месяцев, так и у крысят в возрасте 12–15 дней. Эти данные хорошо соотносятся с имеющимися данными литературы, где в подавляющем большинстве работ снижение pH также угнетало сократительную активность резистивных артерий. Например, ранее было показано, что закисление pH уменьшает сокращение артерий брыжейки [21, 22], мозговых артерий [23–25], артерий сетчатки [26], артерий молочной железы [11] и артерий скелетных мышц [27] у взрослых половозрелых животных. В то же время необходимо отметить, что онтогенетический аспект влияния некомпенсированного метаболического ацидоза на сократительную активность артерий изучен значительно хуже. В частности, ранее было показано, что респираторный (не метаболический) ацидоз приводит к подавлению сократительных ответов аорты и артерий брыжейки у новорожденных кроликов [28, 29]. Кроме этого, нами было недавно продемонстрировано, что метаболический ацидоз вызывает уменьшение сократительных реакций подкожных артерий с интактным эндотелием у 12–15-дневных крысят, что связано, в частности, с усилением антиконстрикторной роли оксида азота NO [3]. Вместе с тем на сегодняшний момент остается практически неисследованным, как влияет снижение внеклеточного pH на механизмы регуляции тонуса, присущие гладкомышечным клеткам сосудов в раннем онтогенезе.

Антиконстрикторное влияние TASK-1-каналов, ярко выраженное в период раннего постнатального онтогенеза, в значительной степени уменьшалось при ацидозе. В данном случае такое влияние ацидоза согласуется с данными литературы, поскольку TASK-1-каналы описаны как чувствительные к pH: при ацидозе их активность снижается, в то время как при алкалозе растет [30, 31]. Наши экспериментальные данные впервые позволили продемонстрировать, что в период раннего постнатального онтогенеза в артериях большого круга кровообращения высокая антиконстрикторная активность TASK-1-каналов существенно уменьшается при снижении pH до 6.8, но не исчезает совсем. Отметим, что у животных в возрасте 3–4 месяцев антиконстрикторного влияния TASK-1-каналов не было обнаружено ни при нормальном, ни при кислом pH.

Основываясь на данных литературы мы предполагали, что ацидоз может вызывать активацию K_{ATP} -каналов [9, 10], тем самым усиливая их антиконстрикторное влияние, не выраженное при нормальном pH в подкожной артерии взрослых крыс и крысят в ранний постнатальный период [7]. Более того, у животных в ранний постнатальный период из-за снижения антиконстрикторного влияния TASK-1-каналов в условиях ацидоза мы могли ожидать, что функциональный вклад других калиевых каналов, например K_{ATP} , будет увеличиваться. Несмотря на наши предположения, экспериментальные данные продемонстрировали обратное. Блокатор K_{ATP} -каналов глИБенкламид не оказывал влияния на артерии крыс в возрасте 3–4 месяцев и 12–15-дневных крыс как при нормальном pH, так и при ацидозе, то есть влияние сниженного pH на эти артерии не связано с активацией K_{ATP} -каналов.

Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что закисление внеклеточной среды приводит к подавлению сократительной активности артерий крыс в возрасте 3–4 месяцев и крысят в период раннего постнатального онтогенеза, при этом у последних также снижается антиконстрикторное влияние TASK-1-каналов, а K_{ATP} -каналы не оказывают влияния на регуляцию тонуса сосудов ни при нормальном, ни при кислом pH ни в одной из возрастных групп. Вместе с тем остается неясным, активация и/или подавление каких механизмов регуляции сосудистого

тонуса приводит к снижению сократительных реакций гладкой мышцы в раннем постнатальном периоде. Можно предположить, что в качестве одного из таких механизмов может выступать Rho-киназа, играющая проконстрикторную роль в гладкомышечных клетках, особенно ярко выраженную в раннем онтогенезе [32, 33]. Отметим, что для Rho-киназы ранее было показано снижение ферментативной активности при $\text{pH} < 7.0$ [34]. Вопрос о механизмах, объясняющих снижение сократительных реакций гладкомышечных клеток в условиях снижения pH в раннем постнатальном периоде, остается открытым и станет предметом дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Рудольфу Шуберту за полезные советы и обсуждение дизайна исследования и интерпретации полученных данных. Часть оборудования, использованного в исследовании, предоставлена МГУ в рамках национального проекта “Наука и университеты” (Договор № 161”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены биоэтической комиссией МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 97-ж-2 от 11.11.2021 г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 21-75-10036). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.А.Ш. и Д.К.Г.), сбор данных (А.А.Ш., А.А.Б. и Д.К.Г.), обработка данных (А.А.Ш. и Д.К.Г.), написание и редактирование манускрипта (А.А.Ш. и Д.К.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berend K, de Vries APJ, Gans ROB (2014) Physiological Approach to Assessment of Acid–Base Disturbances. *N Engl J Med* 371: 1434–1445.
https://doi.org/10.1056/NEJMRA1003327/SUPPL_FILE/NEJMRA1003327_DISCLOSURES.PDF
2. Гайнуллина ДК, Швецова АА, Тарасова ОС (2022) Механизмы влияния ацидоза на тонус кровеносных сосудов. *Авиакосмич экологич мед* 56: 38–45. [Gainullina DK, Shvetsova AA, Tarasova OS (2022) Mechanisms of the influence of acidosis on the tone of blood vessels. *Aerospace Environment Med* 56: 38–45. (In Russ)].
<https://doi.org/10.21687/0233-528x-2022-56-5-38-45>
3. Gaynullina DK, Tarasova OS, Shvetsova AA, Borzykh AA, Schubert R (2022) The Effects of Acidosis on eNOS in the Systemic Vasculature: A Focus on Early Postnatal Ontogenesis. *Int J Mol Sci* 23: 5987.
<https://doi.org/10.3390/ijms23115987>
4. Boedtker E, Aalkjaer C (2012) Intracellular pH in the resistance vasculature: regulation and functional implications. *J Vasc Res* 49: 479–496.
<https://doi.org/10.1159/000341235>

5. *Boedtker E* (2018) Acid–base regulation and sensing: Accelerators and brakes in metabolic regulation of cerebrovascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab* 38: 588–602.
<https://doi.org/10.1177/0271678X17733868>
6. *Remzö G, Németh J, Varga V, Kovács V, Tóth-Szűki V, Kaila K, Voipio J, Domoki F* (2020) Brain interstitial pH changes in the subacute phase of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn pigs. *PLoS One* 15: e0233851.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233851>
7. *Shvetsova AA, Gaynullina DK, Tarasova OS, Schubert R* (2019) Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15-day-old rats: Dominating role of Kv7 channels. *Acta Physiol* 225: e13176.
<https://doi.org/10.1111/apha.13176>
8. *Wang X, Wu J, Li L, Chen F, Wang R, Jiang C* (2003) Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles. *Circ Res* 92: 1225–1232.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000075601.95738.6D>
9. *Celotto AC, Restini CBA, Capellini VK, Bendhack LM, Evora PRB* (2011) Acidosis induces relaxation mediated by nitric oxide and potassium channels in rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol* 656: 88–93.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.053>
10. *Lindauer U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U* (2003) Cerebrovascular Vasodilation to Extraluminal Acidosis Occurs via Combined Activation of ATP-Sensitive and Ca²⁺-Activated Potassium Channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(10): 1227–1238.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000088764.02615.B7>
11. *Rohra DK, Sharif HM, Zubairi HS, Sarfraz K, Ghayur MN, Gilani AH* (2005) Acidosis-induced relaxation of human internal mammary artery is due to activation of ATP-sensitive potassium channels. *Eur J Pharmacol* 514: 175–181.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.041>
12. *Phillis JW, Song D, O'Regan MH* (2000) Mechanisms involved in coronary artery dilatation during respiratory acidosis in the isolated perfused rat heart. *Basic Res Cardiol* 95: 93–97.
<https://doi.org/10.1007/s003950050169>
13. *Gurney A, Manoury B* (2009) Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J* 38: 305–318.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0326-8>
14. *Goldstein SAN, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N* (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 23(2): 175–184.
<https://doi.org/10.1038/35058574>
15. *Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H* (2006) Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 98: 1072–1080.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000219677.12988.e9>
16. *Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, Péchoux C, Potus F, Nadeau V, Tremblay E, Ruffenach G, Bourgeois A, Dorfmueller P, Breuils-Bonnet S, Fadel E, Ranchoux B, Jourdon P, Girerd B, Montani D, Provencher S, Bonnet S, Simonneau G, Humbert M, Perros F* (2016) Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 133: 1371–1385.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951>
17. *Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH* (2004) Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 142: 192–202.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705691>
18. *Shvetsova AA, Gaynullina DK, Schmidt N, Bugert P, Lukoshkova E V, Tarasova OS, Schubert R* (2020) TASK-1 channel blockade by AVE1231 increases vasocontractile responses and BP in 1- to 2-week-old but not adult rats. *Br J Pharmacol* 177: 5148–5162.
<https://doi.org/10.1111/bph.15249>
19. *Stulcova B* (1977) Postnatal development of cardiac output distribution measured by radioactive microspheres in rats. *Neonatology* 32: 119–124.
20. *Mulvany MJ, Halpern W* (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.41.1.19>
21. *Yartsev VN, Karachentseva OV, Dvoretzky DP* (2002) Effect of pH changes on reactivity of rat mesenteric artery segments at different magnitude of stretch. *Acta Physiol Scand* 174: 1–7.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2002.00923.x>

22. Mohanty I, Suklabaidya S, Parija SC (2016) Acidosis reduces the function and expression of $\alpha 1D$ -adrenoceptor in superior mesenteric artery of capra hircus. *Int J Pharmacol* 48: 399–406.
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.186199>
23. Aoyama Y, Ueda K, Setogawa A, Kawai Y (1999) Effects of pH on contraction and Ca^{2+} mobilization in vascular smooth muscles of the rabbit basilar artery. *Jpn J Physiol* 49: 55–62.
24. Akanji O, Weinzierl N, Schubert R, Schilling L (2019) Acid sensing ion channels in rat cerebral arteries: Probing the expression pattern and vasomotor activity. *Life Sci* 227: 193–200.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.054>
25. Aleksandrowicz M, Kozniowska E (2020) Compromised regulation of the rat brain parenchymal arterioles in vasopressin-associated acute hyponatremia. *Microcirculation* 27: 1–7.
<https://doi.org/10.1111/micc.12644>
26. Hessellund A, Aalkjaer C, Bek T (2006) Effect of acidosis on isolated porcine retinal vessels. *Curr Eye Res* 31: 427–434.
<https://doi.org/10.1080/02713680600681236>
27. Ives SJ, Andibacka RHI, Noyes RD, Morgan RG, Gifford JR, Park SY, Symons JD, Richardson RS (2013) $\alpha 1$ -Adrenergic responsiveness in human skeletal muscle feed arteries: The impact of reducing extracellular pH. *Exp Physiol* 98: 256–267.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066613>
28. Nakanishi T, Gu H, Momma K (1997) Developmental changes in the effect of acidosis on contraction, intracellular pH, and calcium in the rabbit mesenteric small artery. *Pediatr Res* 42: 750–757.
<https://doi.org/10.1203/00006450-199712000-00006>
29. Nakanishi T, Gu H, Momma K (1997) Effect of acidosis on contraction, intracellular pH, and calcium in the newborn and adult rabbit aorta. *Heart Vessels* 12: 207–215.
<https://doi.org/10.1007/BF02766785>
30. Lotshaw DP (2007) Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K^+ channels. *Cell Biochem Biophys* 47(2): 209–256.
<https://doi.org/10.1007/s12013-007-0007-8>
31. Ma L, Zhang X, Zhou M, Chen H (2012) Acid-sensitive TWIK and TASK Two-pore Domain Potassium Channels Change Ion Selectivity and Become Permeable to Sodium in Extracellular Acidification. *J Biol Chem* 287(44): 37145–37153.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.398164>
32. Mochalov SV, Tarasova NV, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Kalenchuk VU, Borovik AS, Vorotnikov AV, Tarasova OS, Schubert R (2018) Higher Ca^{2+} -sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity. *Acta Physiol* 223: 1–15.
<https://doi.org/10.1111/apha.13044>
33. Akopov SE, Zhang L, Pearce WJ (1998) Regulation of Ca^{2+} sensitization by PKC and rho proteins in ovine cerebral arteries: Effects of artery size and age. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 275: 930–939.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.3.h930>
34. Boedtker E, Praetorius J, Matchkov VV, Stankevicius E, Mogensen S, Füchtbauer AC, Simonson U, Füchtbauer EM, Aalkjaer C (2011) Disruption of Na^+ , HCO_3^- cotransporter NBCn1 (slc4a7) Inhibits no-mediated vasorelaxation, smooth muscle Ca^{2+} Sensitivity, and hypertension development in mice. *Circulation* 124: 1819–1829.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.015974>

**Influence of extracellular acidosis on the functional contribution
of K_{ATP} and TASK-1 potassium channels to the regulation of vascular tone
in early postnatal ontogenesis**

A. A. Shvetsova^a, A. A. Borzykh^{a, b}, and D. K. Gaynullina^{a, *}

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

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

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

The activity of many proteins and, as a result, of the mechanisms of vascular tone regulation depends on pH. A decrease of pH (uncompensated acidosis), usually causes relaxation of blood vessels, which has been studied in sufficient detail for an adult, matured organism.

However, the effect of acidosis on the mechanisms of vascular tone regulation in the early postnatal period remains almost completely unexplored. The aim of this work was to study the effect of extracellular metabolic acidosis on the functional contribution of K_{ATP} and TASK-1 potassium channels to the regulation of vascular tone in early postnatal period. We modeled extracellular metabolic acidosis (pH 6.8, equimolar replacement of $NaHCO_3$ with NaCl in solution) and studied isometric contractile responses of the saphenous artery in rats aged 3–4 months and rat pups aged 12–15 days. Arterial contraction to the α_1 -adrenergic agonist methoxamine at pH 6.8 was reduced compared to normal pH 7.4 in both 3–4-month-old and 12–15-day-old rats. The K_{ATP} channel blocker glibenclamide did not change the arterial responses to methoxamine, neither at pH 7.4 nor at pH 6.8 in any of the age groups. The TASK-1 channel blocker AVE1231 did not alter arterial contractile responses at any pH in 3–4-month-old rats. However, in 12–15-day-old rat pups, the increase in contractile responses to methoxamine under the influence of AVE1231 was less at pH 6.8 than at pH 7.4. Thus, the results of this work demonstrate that acidosis reduces the contractile activity of the arteries of 3–4-month-old animals and animals during early postnatal ontogenesis, while in the latter, the anticontractile role of TASK-1 channels decreases, and K_{ATP} channels do not affect the regulation of vascular tone, either under normal, or at acidic pH in any of the age groups.

Keywords: acidosis, artery, potassium channels, ATP-sensitive potassium channels, TASK-1 channels, smooth muscle, early postnatal ontogenesis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ У КРЫС
С РАЗЛИЧНЫМИ ИНДИВИДУАЛЬНО-ТИПОЛОГИЧЕСКИМИ
ОСОБЕННОСТЯМИ ПОВЕДЕНИЯ В МОДЕЛИ ПТСР
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ДАЛАРГИНА**

© 2024 г. О. Г. Семенова¹*, А. В. Вьюшина¹, А. В. Притворова¹,
В. В. Ракицкая¹, Н. Э. Ордян¹

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

*E-mail: SemenovaOG@infran.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 18.11.2023 г.

Исследованы морфологические изменения надпочечников у крыс-самцов Вистар после внутримышечного введения препарата “Даларгин” (синтетический аналог лей-энкефалина) в модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). По результатам тестирования в Т-лабиринте и приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) крыс разделили на группы: активные низкотревожные (АНТ), активные высокотревожные (АВТ), пассивные низкотревожные (ПНТ) и пассивные высокотревожные (ПВТ). У крыс группы АНТ под влиянием даларгина в модели ПТСР увеличилась толщина пучковой зоны (zF) коры надпочечников ($p < 0.05$) на 14%, площадь ядер в клетках zF ($p < 0.001$) на 9.5% и площадь мозгового вещества ($p < 0.05$) на 21%. При развитии ПТСР-подобного состояния у АВТ крыс толщина пучковой зоны увеличилась ($p < 0.05$) на 10%, тогда как даларгин в модели ПТСР предотвратил это увеличение. Развитие ПТСР-подобного состояния у ПНТ крыс сопровождалось увеличением толщины пучковой зоны ($p < 0.05$) на 17% и уменьшением площади ядер в клетках зоны ($p < 0.05$) на 10.5%. Одновременно было обнаружено уменьшение площади мозгового вещества ($p < 0.05$) и площади ядер ($p < 0.05$) в клетках этой структуры на 41% и 8% соответственно. После инъекций даларгина площадь ядер в клетках мозгового вещества уменьшилась ($p < 0.05$) еще на 7%. У ПВТ крыс под воздействием даларгина в модели ПТСР было обнаружено увеличение ($p < 0.01$) толщины пучковой зоны на 23%. Сделано заключение, что эффекты даларгина на морфометрические показатели надпочечников при моделировании ПТСР определяются индивидуально-типологическими особенностями поведения.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство, даларгин, надпочечники, тревожность, активность, крысы

DOI: 10.31857/S0869813924010048, EDN: WSCUJJ

ВВЕДЕНИЕ

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) возникает как отсроченный или затянувшийся ответ на тяжелое стрессовое событие в результате дисфункции высоко-консервативных систем мозга, связанных со стрессом, тревогой, страхом

и вознаграждением [1]. Важную роль в развитии ПТСР играет условно-рефлекторный страх. События и предметы, сопутствующие травматической ситуации, становятся условными сигналами, способными спровоцировать прогрессирование психопатологии во времени. Симптомы ПТСР включают постоянную тревогу, раздражительность, панику, нарушение сна и когнитивных функций, дистресс в ответ на сигналы, связанные с травмой [1–3]. При сохранении симптомов в течение 2–4 недель и далее диагностируется развитие ПТСР [3]. У больных с ПТСР отмечают повышенную активность симпатoadреналовой системы и недостаточную функцию гипоталамо-адреналовой системы (ГАС) [4]. Многочисленные исследования характеризуют ПТСР снижением гормональной функции ГАС в связи с развитием ее гиперчувствительности к сигналам отрицательной обратной связи и усилением ингибирования ее активности. В результате уже на ранних стадиях нарушаются адаптивные функции ГАС, приводящие к высокому уровню кортиколиберина и низкому уровню глюкокортикоидов в крови [5, 6].

Опиоидная система является одной из ведущих стресс-лимитирующих систем, участие которой необходимо для обеспечения пластичности взаимодействия возбуждающих и тормозных механизмов и ограничения стресс-реакции на центральном и периферическом уровнях регуляции [7, 8]. Кроме того, установлено, что экзогенные опиоиды, блокируя секреторную деятельность аденогипофиза и надпочечников, снижают уровень АКТГ, кортикостероидов и адреналина в плазме крови [8–10].

Синтетический аналог лей-энкефалина фармакологический препарат “Даларгин” в условиях хронического стресса предупреждает истощение депо катехоламинов и глюкокортикоидов в надпочечниках, ограничивает проявление стресс-реакции и повышает выживаемость животных в экстремальных условиях [8, 11, 12].

Основная цель настоящего исследования: изучение влияния даларгина на морфологические изменения надпочечников в условиях развития ПТСР-подобного состояния у крыс, различающихся по показателям поведенческой активности и тревожности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали крыс-самцов Вистар массой 250–280 г в возрасте 2,5 месяца. Животные содержались в пластиковых клетках по 6 особей на стандартной диете при свободном доступе к воде и пище и при обычном 12-часовом световом режиме. После недельного периода адаптации к условиям лаборатории у крыс определяли стратегию приспособительного поведения в Т-образном лабиринте [13, 14]. Лабиринт выполнен из непрозрачного пластика с прозрачной верхней крышкой для наблюдения и состоит из трех рукавов, два из которых образуют основной коридор ($140 \times 10 \times 15$ см), разделенный посередине перпендикулярно расположенным третьим рукавом ($19 \times 4 \times 4$ см). Были предложены нормированные индексы поведенческой активности (ИПА) и поведенческой пассивности (ИПП), которые определяли у каждого животного по результатам тестирования в Т-образном лабиринте [14]. К поведенческой активности относили все формы вертикальной и горизонтальной активности, исключая груминг, а ИПА рассчитывали как процент времени, когда животное совершало побежки, стойки и двигалось на месте (за исключением груминга), от общего времени наблюдения ($\text{ИПА} = (180 - (\text{LP} + \text{tN} + \text{Gr})) \times 100/180$; где 180 – общее время наблюдения, с; LP – латентный период входа в лабиринт через средний рукав, с; tN – время неподвижности, с; Gr – продолжительность реакции груминга, с). ИПП рассчитывали как процент времени, когда животное было неподвижно, от общего времени тестирования ($\text{ИПП} = (\text{LP} + \text{tN}) \times 100/180$; где 180 – общее время наблюдения, с; LP – латентный период входа в лабиринт, с; tN – время неподвижности, с). Поскольку распределения полученных индексов резко асимметричны, данные были прологарифмированы и на их основании рассчитаны границы групп. В качестве границ групп были взяты 25%-ные квантили и среднее, которые делят распределение на части: $X_1 = M - 0.67SD$,

$X_2 = M \pm SD$, $X_3 = M + 0.67SD$, где M – среднее значение, а SD – стандартное отклонение. Таким образом, крысы, у которых значение ИПА попадало в интервал от 85% до 100%, а значение ИПП – в интервал от 0% до 4.6% считались животными с высокой активностью, тогда как низкоактивными решено было считать крыс, у которых значение ИПА было в интервале от 0% до 70%, а значение ИПП – в интервале от 15% до 100%.

Для определения исходного уровня тревожности крысы были протестированы в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ), установка которого состояла из двух открытых и двух закрытых рукавов размерами 50×14 см и $50 \times 14 \times 33$ см соответственно, соединенных центральной площадкой размером 14×14 см. Лабиринт был приподнят над уровнем пола на высоту 60 см. Во время тестирования открытые рукава лабиринта дополнительно освещались лампами мощностью 40 Вт, расположенными на высоте 30 см. В течение 5 мин. регистрировали время нахождения животных в открытых и закрытых рукавах ПКЛ, продолжительность реакции замирания, частоту дефекаций. Известно, что продолжительность нахождения особей в открытых рукавах ПКЛ обратно пропорциональна уровню тревожности [15]. По результатам тестирования в ПКЛ были сформированы группы, различающиеся по уровню тревожности: активные низкотревожные (АНТ, $n = 18$); активные высокотревожные (АВТ, $n = 18$); пассивные низкотревожные (ПНТ, $n = 18$); пассивные высокотревожные (ПВТ, $n = 18$). Каждая группа была разделена на три подгруппы: подгруппа 1 – контроль (крысы, не подвергавшиеся стрессорным и фармакологическим воздействиям), подгруппа 2 – модель ПТСР + инъекции физиологического раствора, подгруппа 3 – модель ПТСР + инъекции даларгина.

Известно, что распространенная модель ПТСР – “стресс-рестресс” формирует устойчивое тревожное состояние у грызунов, сходное с ПТСР человека [5]. В данной модели у животных наблюдали нарастающее с течением времени увеличение тревожности, пониженный уровень кортикостерона в крови, усиленное торможение ГАС глюкокортикоидными гормонами, изменение в экспрессии минерало- и глюкокортикоидных рецепторов гиппокампа [5]. В нашей работе для формирования экспериментального аналога ПТСР мы использовали водно-иммерсионное воздействие в парадигме “стресс-рестресс”: животных жестко фиксировали в железных пеналах и погружали по шею на 1 ч в воду (16°C), через 10 суток повторная процедура длилась в течение 30 мин. Тяжесть первого стресса по температурному режиму и продолжительности была экспериментально подобрана в предыдущих исследованиях с целью предотвращения летальных исходов в группе пассивных животных. Одновременно было установлено, что через 20 суток после первого стресса у животных формируется ПТСР-подобное состояние [14, 16]. Поэтому в наших опытах через 20 суток после первого стресса крысам из подгруппы 3 в течение недели один раз в день внутримышечно вводили раствор даларгина в дозе 0.1 мг/кг, а животным из подгруппы 2 – физиологический раствор в эквивалентном объеме. Следует отметить, что при системном введении в дозах до 1 мг/кг даларгин не проникает через гематоэнцефалический барьер [8, 12] и взаимодействует с опиоидными рецепторами только на периферии. Спустя 2 суток после недельного курса инъекций все животные были протестированы в ПКЛ, а спустя еще 2 суток крыс выводили из эксперимента и производили фиксацию надпочечников. Дизайн эксперимента представлен на схеме опыта (рис. 1).

Гистологическая обработка

Надпочечник (левый) очищали от жировой ткани и помещали в фиксирующую смесь Буэна (75 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты + 20 мл 40%-ного формальдегида + 5 мл ледяной уксусной кислоты). Через 10 дней фиксированные надпочечники промывали в проточной воде и обезжизивали при последовательной инкубации в 30%-ном и 50%-ном этаноле в течение 60 мин. До последующей обработки материал был оставлен на хранение в 70%-ном этаноле.

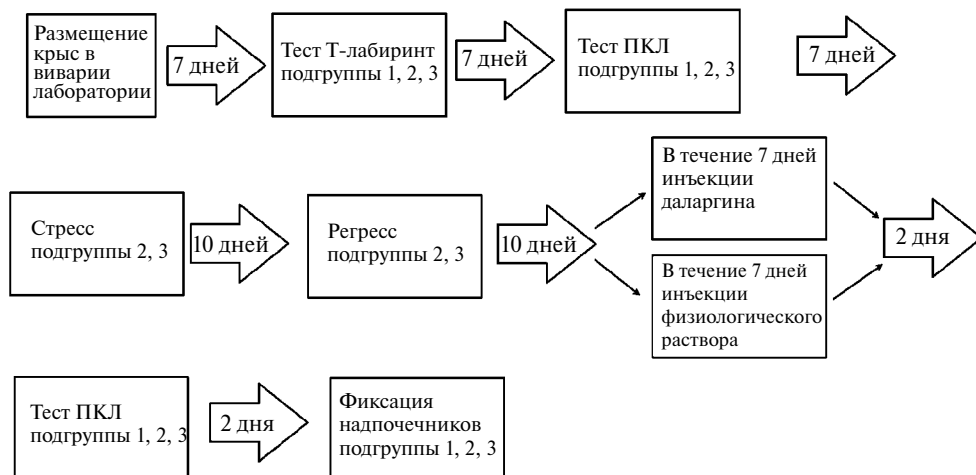


Рис. 1. Схема опыта. Подгруппа 1 – контроль, подгруппа 2 – модель ПТСР + инъекции физиологического раствора, подгруппа 3 – модель ПТСР + инъекции даларгина.

Заливка в парафин

Дальнейшее обезвоживание надпочечников было проведено посредством последовательной инкубации в 80%- и 90%-ном этаноле по 60 мин., абсолютном этаноле – 3 смены по 60 мин, далее гистологический материал инкубировался 30 мин в бутаноле и затем помещался во вторую порцию бутанола на 14 ч. Затем надпочечники инкубировали в ксилоле (4 смены по 15 мин.) и помещали в термостат при температуре 56°C в расплавленный парафин – 3 смены по 60 мин. Далее была сделана заливка в парафин.

Изготовление срезов

Парафиновые срезы толщиной 6–7 мкм изготавливали с помощью микротомы. Перед окраской срезы подвергались депарафинированию посредством инкубации в ксилоле (2 смены по 5 мин), затем следы ксилола отмывались при последовательной инкубации в абсолютном этаноле, 90%- и 70%-ном этаноле – по 5 мин и 2 мин в дистиллированной воде. Для определения морфологических изменений в надпочечниках было проведено стандартное окрашивание срезов железным гематоксилином по методу Гейденгайна.

Фотографирование срезов и морфометрическое исследование

Срезы исследовали с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (“АТМ-практика”, Санкт-Петербург). На микрофотографиях при помощи системы анализа изображения количественно оценивалась площадь мозгового вещества при увеличении в 4 раза (на 5 центральных срезах у каждого животного), толщина коркового слоя надпочечника и отдельных его зон (клубочковой, пучковой, сетчатой) – при увеличении в 10 раз (по 10 измерений каждой структуры по всему периметру среза на каждом из 5 центральных срезов у каждого животного). Диаметры ядер (d_1 , d_2) клеток пучковой зоны и мозгового вещества измеряли в двух взаимно перпендикулярных сечениях при увеличении в 100 раз (по 50 ядер на каждом из 5 центральных срезов у каждого животного). Площадь ядра рассчитывали по формуле $S = \pi \times d_1 \times d_2 / 4$.

Статистический анализ данных

Статистическая обработка полученных результатов производилась с помощью SPSS Statistics 21 (IBM, США) и с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Морфометрические изменения надпочечников в модели ПТСР были проанализированы отдельно для каждой из групп (АНТ, АВТ, ПНТ и ПВТ). Сравнение проводилось между подгруппой 1 (контроль) и подгруппой 2 (модель ПТСР + инъекции физиологического раствора), между подгруппой 2 и подгруппой 3 (модель ПТСР + инъекции даларгина), а также между контролем и подгруппой 3. С помощью критерия Шапиро-Уилка была сделана оценка нормальности распределения значений в выборках, а с помощью Levene's test была сделана проверка равенства дисперсий. При нормальном распределении данных и равенстве дисперсий в группах для анализа был использован однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки, а при нормальном распределении и неоднородности дисперсий был применен ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймс-Хоуэла. При построении графиков использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 8. Результаты на графиках представлены в виде $M \pm SD$ (M – среднее значение; SD – стандартное отклонение). Результаты в табл. 1 представлены в виде $M \pm SEM$ (M – среднее значение; SEM – стандартная ошибка среднего). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$, при $0.05 \leq p \leq 0.1$ отмечали наличие тенденции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование экспериментальных групп животных

По результатам тестирования в Т-образном лабиринте для каждого животного были рассчитаны индексы поведенческой активности (ИПА) и пассивности (ИПП). После тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) были сформированы группы, различающиеся по уровню тревожности. В табл. 1 представлены результаты тестирования крыс в Т-образном лабиринте и ПКЛ с учетом разделения активных и пассивных крыс на низкотревожных и высокотревожных.

Каждая группа была разделена на три подгруппы: подгруппа 1 – контроль (крысы, не подвергавшиеся стрессорным и фармакологическим воздействиям), подгруппа 2 – модель ПТСР + инъекции физиологического раствора, подгруппа 3 – модель ПТСР + инъекции даларгина.

Таблица 1. Результаты тестирования в Т-лабиринте и приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ), ($M \pm SEM$)

группа	ИПА (%)	ИПП (%)	время в ОР ПКЛ (с)
АНТ, $n = 18$	95.09 ± 0.33	1.85 ± 0.17	24.17 ± 0.58
АВТ, $n = 18$	94.26 ± 0.41	1.67 ± 0.19	0
ПНТ, $n = 18$	52.78 ± 0.78	38.89 ± 0.89	15.0 ± 0.51
ПВТ, $n = 18$	55.37 ± 0.57	33.43 ± 0.59	0

Группа АНТ – активные низкотревожные крысы, группа АВТ – активные высокотревожные крысы, группа ПНТ – пассивные низкотревожные крысы, группа ПВТ – пассивные высокотревожные крысы; ИПА – индекс поведенческой активности; ИПП – индекс поведенческой пассивности; ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ОР ПКЛ – открытые рукава ПКЛ; n – число крыс.

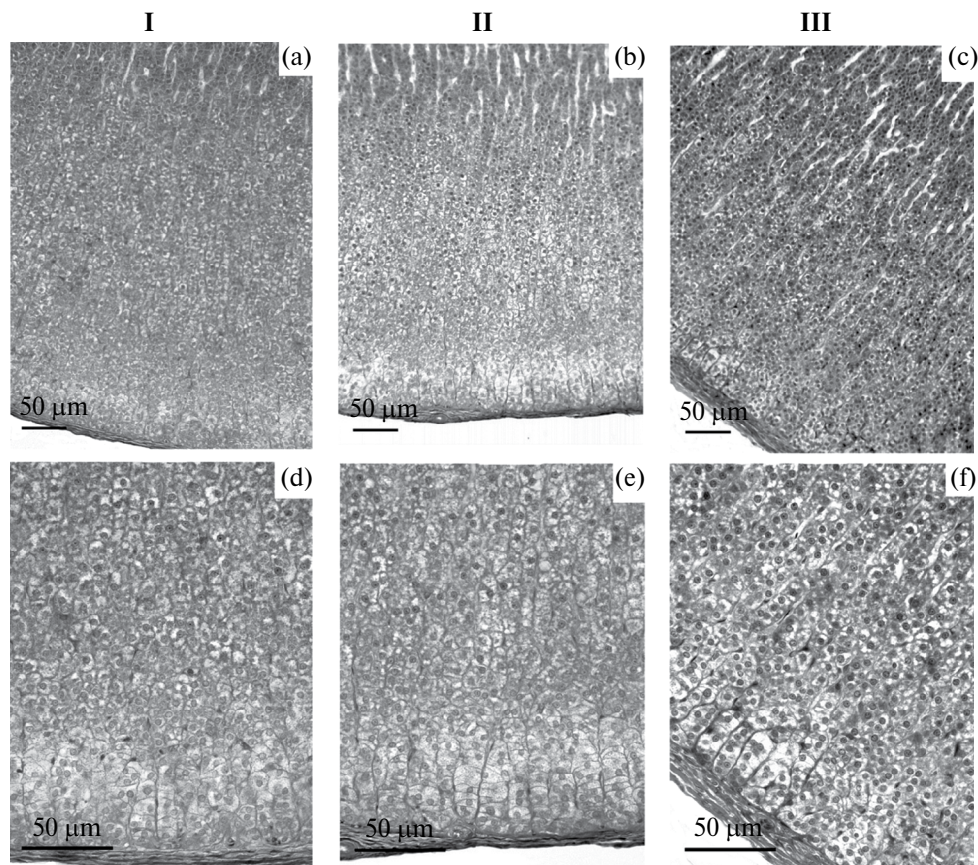


Рис. 2. Кора надпочечников крыс группы АНТ, окраска железным гематоксилином по методу Гейденгайна. I (a, d) – подгруппа 1 (контроль); II (b, e) – подгруппа 2 (модель ПТСР + инъекции физиологического раствора); III (c, f) – подгруппа 3 (модель ПТСР + инъекции даларгина); (a, b, c) – ув. 20; (d, e, f) – ув. 40.

Группа АНТ (активные низкотрещовжные крысы)

Микроскопическое исследование показало наличие четкой зональности коры надпочечников у контрольных крыс группы АНТ. Архитектоника клеток в зонах не была нарушена. Клетки клубочковой зоны, расположенные в виде арок, петель и клубочков, имели цитоплазму слабоинтенсивной окраски за счет светлых жировых включений. Между клубочками располагались синусоидные капилляры. Клетки пучковой зоны образовывали длинные тяжи, ориентированные почти перпендикулярно поверхности коры и разделенные синусоидными капиллярами. Из-за большого количества липидных включений цитоплазма имела зернистый вид. Клетки сетчатой зоны выглядели более мелкими по сравнению с клетками пучковой и клубочковой зон. Мелкие липидные включения равномерно распределялись в цитоплазме. Между тяжами клеток сетчатой зоны располагались широкие синусоидные капилляры (рис. 2a, d).

В модели ПТСР (подгруппа 2) количественное соотношение клубочковой, пучковой и сетчатой зон коры надпочечников по сравнению с контролем изменилось (рис. 3a). Одновременно было обнаружено уменьшение толщины коры надпочечников на 11% (рис. 3b). Толщина пучковой зоны осталась на уровне контроля (рис. 3e), одновременно площадь ядер клеток пучковой зоны уменьшилась на 9% (рис. 3f). Площадь мозгового

вещества не отличалась от контроля (рис. 3g), но наблюдалась тенденция ($p = 0.082$) укрупнения ядер в клетках этой структуры (рис. 3h). Выраженных морфологических изменений адренокортикоцитов у АНТ крыс подгруппы 2 по сравнению с подгруппой 1 обнаружено не было (рис. 2b, e).

Введение даларгина в модели ПТСР (подгруппа 3) мало изменило (по сравнению с подгруппой 2) количественное зональное соотношение (рис. 3a). Морфометрическое исследование показало увеличение (по сравнению с подгруппой 2) толщины пучковой зоны на 14% (рис. 3e) и площади ядер в клетках этой структуры на 9.5% (рис. 3f). В пучковой зоне можно было наблюдать появление клеток с крупными липидными включениями в цитоплазме (рис. 2c, f). Под влиянием даларгина в модели ПТСР было также обнаружено увеличение площади мозгового вещества на 21% (рис. 3g).

Таким образом, развитие ПТСР-подобного состояния у АНТ крыс сопровождалось только снижением активности ядер в клетках пучковой зоны и тенденцией повышения активности ядер в клетках мозгового вещества, тогда как даларгин в модели ПТСР способствовал активации и стимуляции синтетической активности пучковой зоны (утолщение зоны, активация клеточных ядер, появление крупных жировых включений в цитоплазме) и мозгового вещества (увеличение площади мозгового вещества).

Группа АВТ (активные высокотревожные крысы)

У контрольных АВТ крыс зональность коры надпочечников и архитектоника клеток в зонах не были нарушены. Плотнo расположенные клетки клубочковой зоны отличались интенсивно окрашенной цитоплазмой (рис. 4a, d). Между клубочками располагались синусоидные капилляры. Тяжи плотнo расположенных клеток пучковой зоны были ориентированы перпендикулярно поверхности коры и окружены синусоидными капиллярами. В пучковой зоне были обнаружены клетки с интенсивно окрашенной цитоплазмой, а также клетки с большим количеством мелких жировых включений, определяющих слабую интенсивность окраски цитоплазмы и придающих ей зернистый вид. В цитоплазме клеток сетчатой зоны мелкие липидные включения были равномерно распределены. Между тяжами клеток располагались широкие синусоидные капилляры.

В модели ПТСР (подгруппа 2) количественное зональное соотношение в коре, по сравнению с контролем, изменилось (рис. 5a). Достоверного изменения толщины коры, клубочковой и сетчатой зон не наблюдалось (рис. 5b, c, d), тогда как толщина пучковой зоны увеличилась на 10% (рис. 5e). Большинство клеток пучковой зоны имели слабо окрашенную цитоплазму с большим количеством крупных жировых включений (рис. 4b, e, g).

Введение даларгина в модели ПТСР (подгруппа 3) почти не изменило, по сравнению с подгруппой 2, количественное зональное соотношение (рис. 5a), хотя способствовало уменьшению толщины коры надпочечников на 10% (рис. 5b). Под воздействием даларгина в модели ПТСР (подгруппа 3) толщина пучковой зоны осталась в пределах контрольных значений (рис. 5e), а клетки зоны имели интенсивно окрашенную цитоплазму, содержащую мелкие жировые включения (рис. 4c, f).

Таким образом, при развитии ПТСР-подобного состояния у АВТ крыс стимулировалась синтетическая активность пучковой зоны коры надпочечников, проявлением чего было увеличение толщины зоны и накопления в цитоплазме клеток крупных жировых включений. Даларгин, в свою очередь, ингибировал активацию этого процесса.

Группа ПНТ (пассивные низкотревожные крысы)

У контрольных ПНТ крыс кора надпочечников имела четкую зональность. Нарушений архитектоники клеток в зонах не было обнаружено. Большинство клеток клубочковой зоны содержали слабо окрашенную цитоплазму (рис. 6a, g). В пучковой

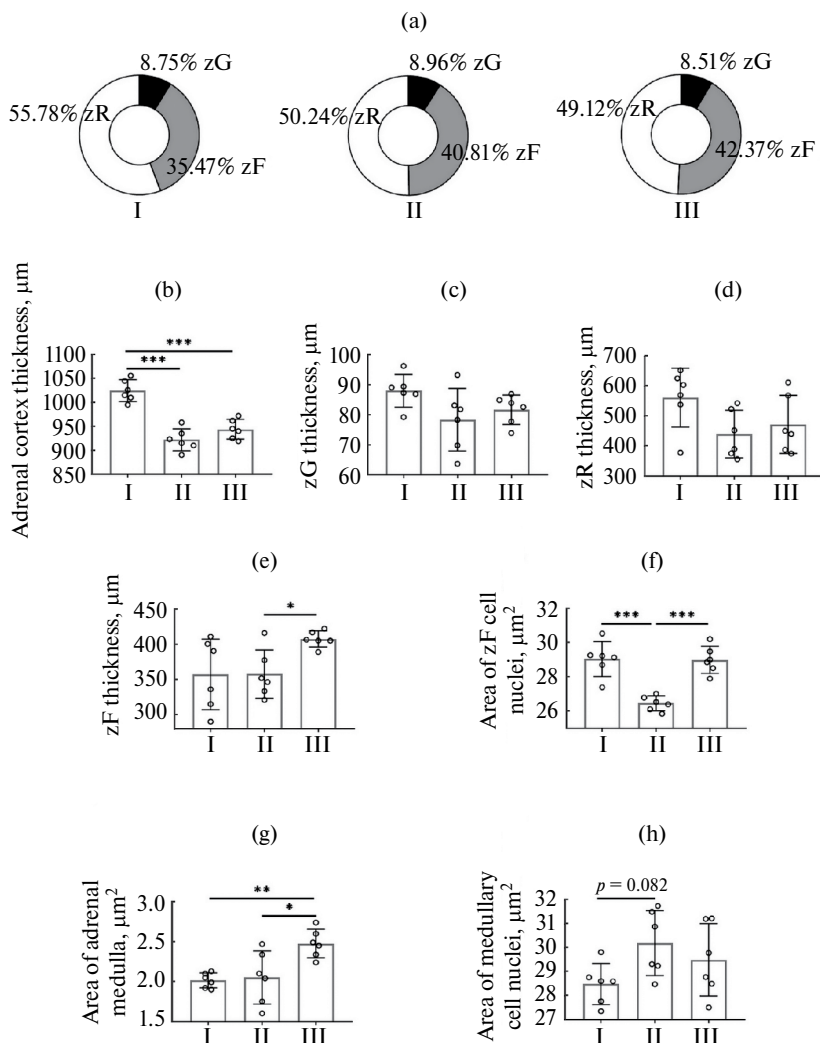


Рис. 3. Морфометрические показатели надпочечников крыс группы АНТ; (а) – процентное соотношение клубочковой (zG), пучковой (zF) и сетчатой (zR) зон в коре надпочечников; на графиках (b, c, d, e, f, g, h) – морфометрические изменения коры и мозгового вещества надпочечников, результаты представлены в виде $M \pm SD$ и приведены индивидуальные значения для каждого животного. I – подгруппа 1, контроль; II – подгруппа 2, модель ПТСР + инъекции физиологического раствора; III – подгруппа 3, модель ПТСР + инъекции даларгина; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – достоверные отличия между подгруппами в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки или ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса-Хоуэла, $0.05 \leq p \leq 0.1$ ($p = 0.082$) – тенденция различий между подгруппами в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки; (b) – толщина коры надпочечников, $F_{(2,15)} = 35.63$, $p < 0.001$, по оси ординат – thickness adrenal cortex, μm (толщина коры надпочечников, мкм); (c) – толщина клубочковой зоны, $F_{(2,15)} = 2.68$, $p = 0.101$, по оси ординат – thickness zG, μm (толщина клубочковой зоны, мкм); (d) – толщина сетчатой зоны, $F_{(2,15)} = 2.8$, $p = 0.09$, по оси ординат – thickness zR, μm (толщина сетчатой зоны, мкм); (e) – толщина пучковой зоны, $F_{(2,7,62)} = 7.38$, $p = 0.017$, по оси ординат – thickness zF, μm (толщина пучковой зоны, мкм); (f) – площадь ядра в клетках пучковой зоны, $F_{(2,15)} = 21.43$; $p < 0.001$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²); (g) – площадь мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 7.82$, $p = 0.005$, по оси ординат – the area of the adrenal medulla, mm^2 (площадь мозгового вещества, мм²); (h) – площадь ядра в клетках мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 2.73$, $p = 0.096$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²).

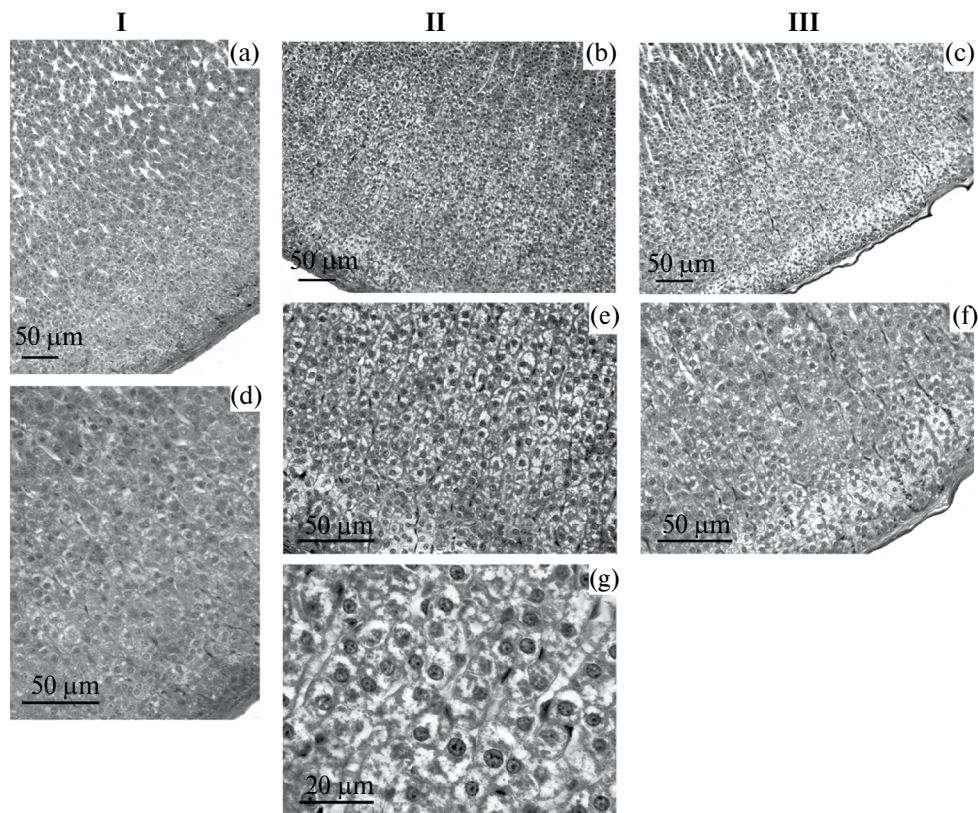


Рис. 4. Кора надпочечников крыс группы АВТ, окраска железным гематоксилином по методу Гейденгайна. I (a, d) – подгруппа 1 (контроль); II (b, e, g) – подгруппа 2 (модель ПТСР + инъекции физиологического раствора); III (c, f) – подгруппа 3 (модель ПТСР + инъекции даларгина); (a, b, c) – ув. 20; (d, e, f) – ув. 40; (g) – ув. 100.

зоне можно было наблюдать клетки со слабо окрашенной цитоплазмой, включающей жировые капли, одновременно часть клеток содержали сильно окрашенную цитоплазму зернистого вида (рис. 6a, d). Ядра округлой формы имели ярко окрашенную оболочку. Тяжи клеток пучковой зоны разделяли синусоидные капилляры. Клетки сетчатой зоны были мельче, чем в клубочковой и пучковой зонах, и содержали в цитоплазме мелкие жировые включения. Сетчатую зону пронизывали широкие синусоидные капилляры.

В модели ПТСР (подгруппа 2) количественное зональное соотношение в коре, по сравнению с контролем, изменилось (рис. 7a). Было обнаружено уменьшение толщины коры надпочечников на 11% (рис. 7b) за счет истончения клубочковой (рис. 7c) и сетчатой (рис. 7d) зон на 11% и 27% соответственно.

Одновременно наблюдалось утолщение пучковой зоны на 17% (рис. 7e) и уменьшение площади ядер в клетках этой структуры на 10.5% (рис. 7f). В пучковой зоне появилось большое количество клеток с многочисленными крупными жировыми включениями (рис. 6b, e). Ядра клеток пучковой зоны стали продолговатой или угловатой формы со слабоокрашенной ядерной оболочкой (рис. 6e). Было также обнаружено уменьшение площади мозгового вещества надпочечников на 41% (рис. 7g) и площади ядер в мозговом веществе на 8% (рис. 7h).

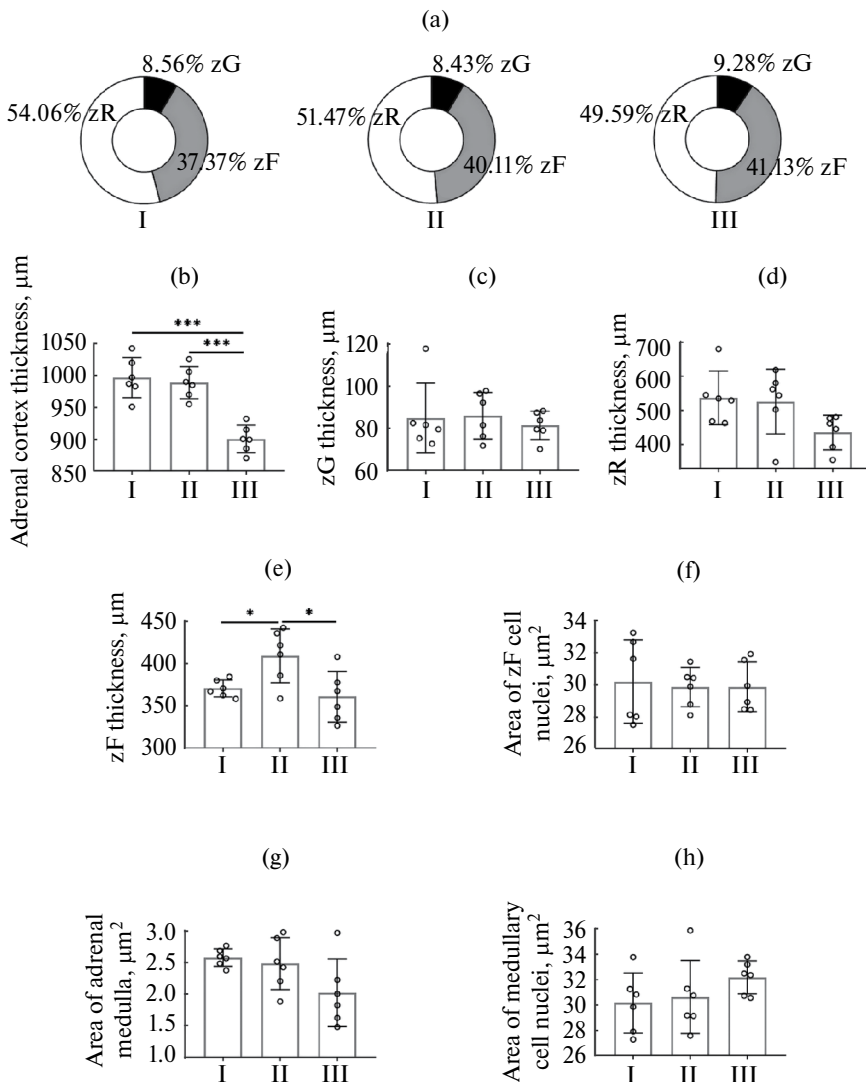


Рис. 5. Морфометрические показатели надпочечников крыс группы АВТ; (а) – процентное соотношение клубочковой (zG), пучковой (zF) и сетчатой (zR) зон в коре надпочечников; на графиках (b, c, d, e, f, g, h) – морфометрические изменения коры и мозгового вещества надпочечников, результаты представлены в виде $M \pm SD$ и приведены индивидуальные значения для каждого животного. I – подгруппа 1, контроль; II – подгруппа 2, модель ПТСП + инъекции физиологического раствора; III – подгруппа 3, модель ПТСП + инъекции далаרגина; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ – достоверные отличия между подгруппами в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки; (b) – толщина коры надпочечников, $F_{(2,15)} = 24.35$, $p < 0.001$, по оси ординат – thickness adrenal cortex, μm (толщина коры надпочечников, мкм); (c) – толщина клубочковой зоны, $F_{(2,15)} = 0.23$, $p = 0.79$, по оси ординат – thickness zG, μm (толщина клубочковой зоны, мкм); (d) – толщина сетчатой зоны, $F_{(2,15)} = 3.14$, $p = 0.072$, по оси ординат – thickness zR, μm (толщина сетчатой зоны, мкм); (e) – толщина пучковой зоны, $F_{(2,15)} = 5.84$, $p = 0.013$, по оси ординат – thickness zF, μm (толщина пучковой зоны, мкм); (f) – площадь ядра в клетках пучковой зоны, $F_{(2,15)} = 0.064$, $p = 0.94$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²); (g) – площадь мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 3.38$, $p = 0.061$, по оси ординат – the area of the adrenal medulla, mm^2 (площадь мозгового вещества, мм²); (h) – площадь ядра в клетках мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 1.3$, $p = 0.3$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²).

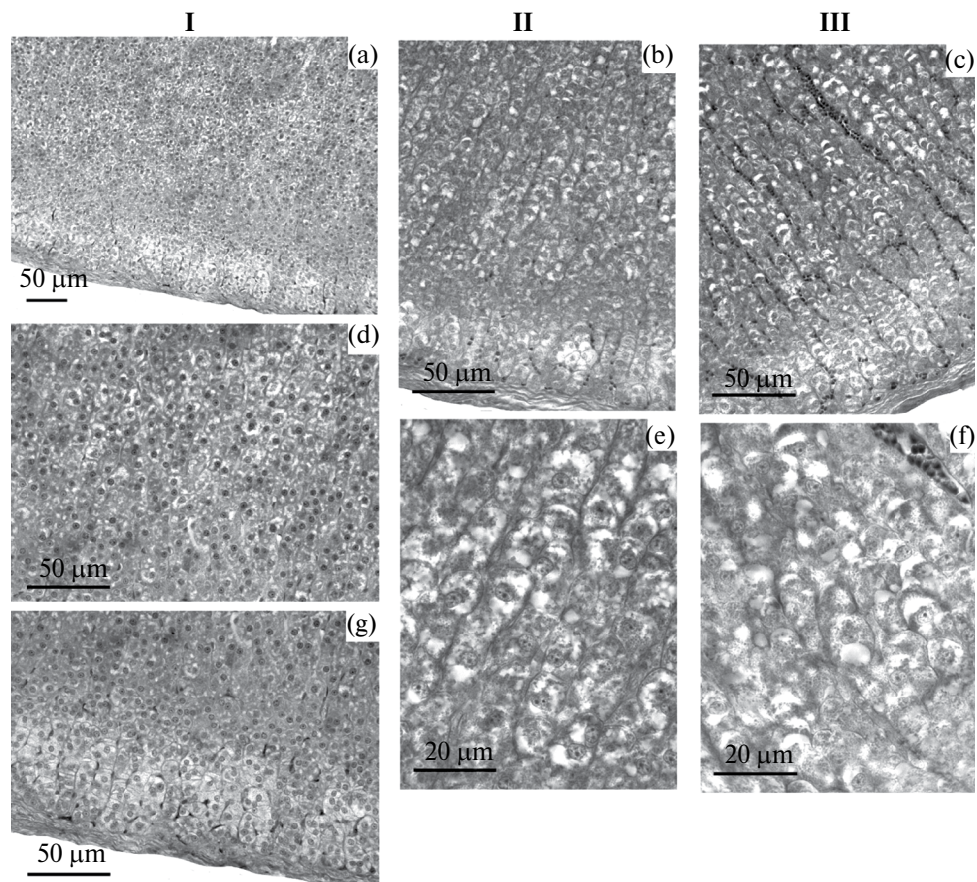


Рис. 6. Кора надпочечников крыс группы ПНТ, окраска железным гематоксилином по методу Гейденгайна. I (a, d, g) – подгруппа 1 (контроль); II (b, e) – подгруппа 2 (модель ПТСР + инъекции физиологического раствора); III (c, f) – подгруппа 3 (модель ПТСР + инъекции даларгина); (a) – ув. 20; (b, c, d, g) – ув. 40; (e, f) – ув. 100.

После введения даларгина в модели ПТСР (подгруппа 3) соотношение клубочковой, пучковой и сетчатой зон в коре мало изменилось (рис. 7а). Толщина пучковой зоны и средняя площадь ядра у крыс подгруппы 3 не отличались от этих показателей для подгруппы 2 (рис. 7е, ф). В клетках пучковой зоны у крыс подгруппы 3, так же как и в подгруппе 2, были обнаружены многочисленные крупные жировые включения в цитоплазме и изменение формы ядер (рис. 6с, ф). Одновременно было обнаружено еще большее уменьшение площади ядер в клетках мозгового вещества (рис. 7h).

Таким образом, развитие ПТСР-подобного состояния у ПНТ крыс сопровождалось стимуляцией синтетических процессов в пучковой зоне за счет увеличения толщины зоны и накопления многочисленных крупных жировых включений в цитоплазме клеток, хотя одновременно происходило снижение активности ядер клеток пучковой зоны и уменьшение синтетической активности мозгового вещества. Даларгин в модели ПТСР практически не оказал влияния на морфологические изменения надпочечников у крыс группы ПНТ.

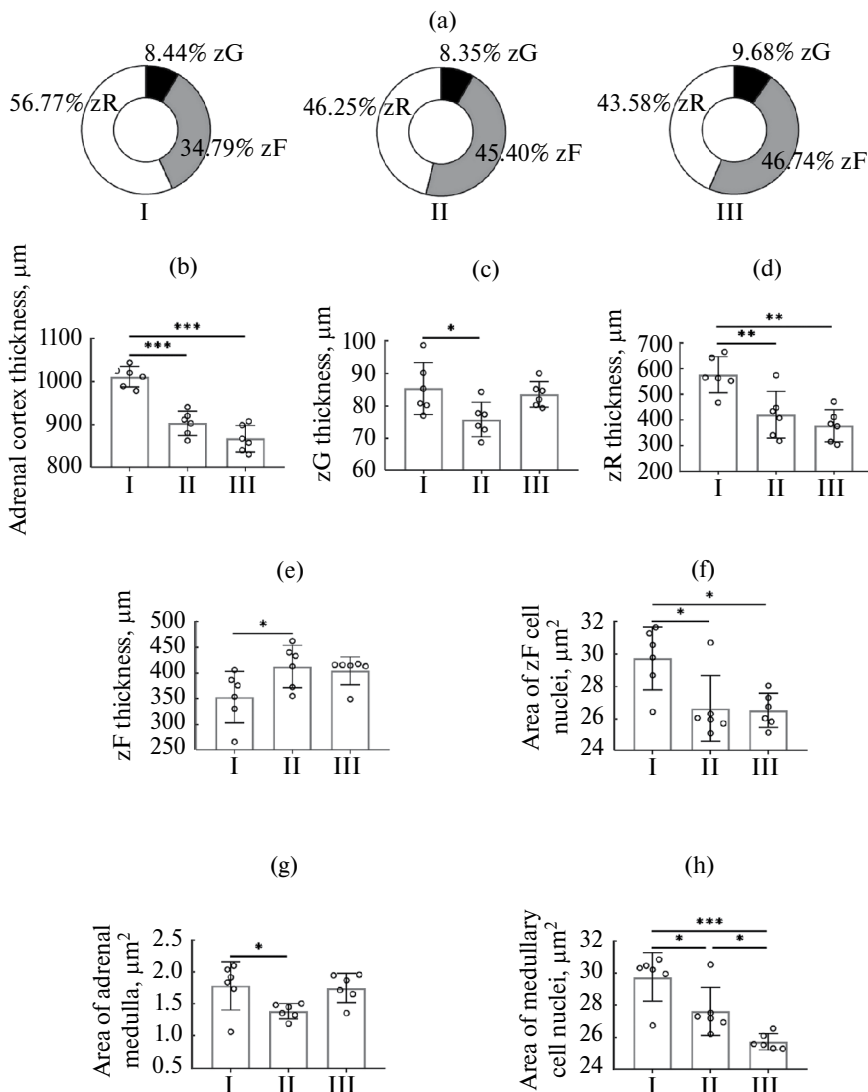


Рис. 7. Морфометрические показатели надпочечников крыс группы ПНТ; (а) – процентное соотношение клубочковой (zG), пучковой (zF) и сетчатой (zR) зон в коре надпочечников; на графиках (b, c, d, e, f, g, h) – морфометрические изменения коры и мозгового вещества надпочечников, результаты представлены в виде $M \pm SD$ и приведены индивидуальные значения для каждого животного. I – подгруппа 1, контроль; II – подгруппа 2, модель ПТСП + инъекции физиологического раствора; III – подгруппа 3, модель ПТСП + инъекции далаרגина; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – достоверные отличия между подгруппами в ANOVA с апостериорным критерием Тьюки; (b) – толщина коры надпочечников, $F_{(2,15)} = 43.9$, $p < 0.001$, по оси ординат – thickness adrenal cortex, μm (толщина коры надпочечников, мкм); (c) – толщина клубочковой зоны, $F_{(2,15)} = 4.34$, $p = 0.032$, по оси ординат – thickness zG, μm (толщина клубочковой зоны, мкм); (d) – толщина сетчатой зоны, $F_{(2,15)} = 11.46$, $p < 0.001$, по оси ординат – thickness zR, μm (толщина сетчатой зоны, мкм); (e) – толщина пучковой зоны, $F_{(2,15)} = 4.78$, $p = 0.041$, по оси ординат – thickness zF, μm (толщина пучковой зоны, мкм); (f) – площадь ядра в клетках пучковой зоны, $F_{(2,15)} = 6.65$, $p = 0.008$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²); (g) – площадь мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 4.18$, $p = 0.036$, по оси ординат – the area of the adrenal medulla, μm^2 (площадь мозгового вещества, мм²); (h) – площадь ядра в клетках мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 15.34$, $p < 0.001$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²).

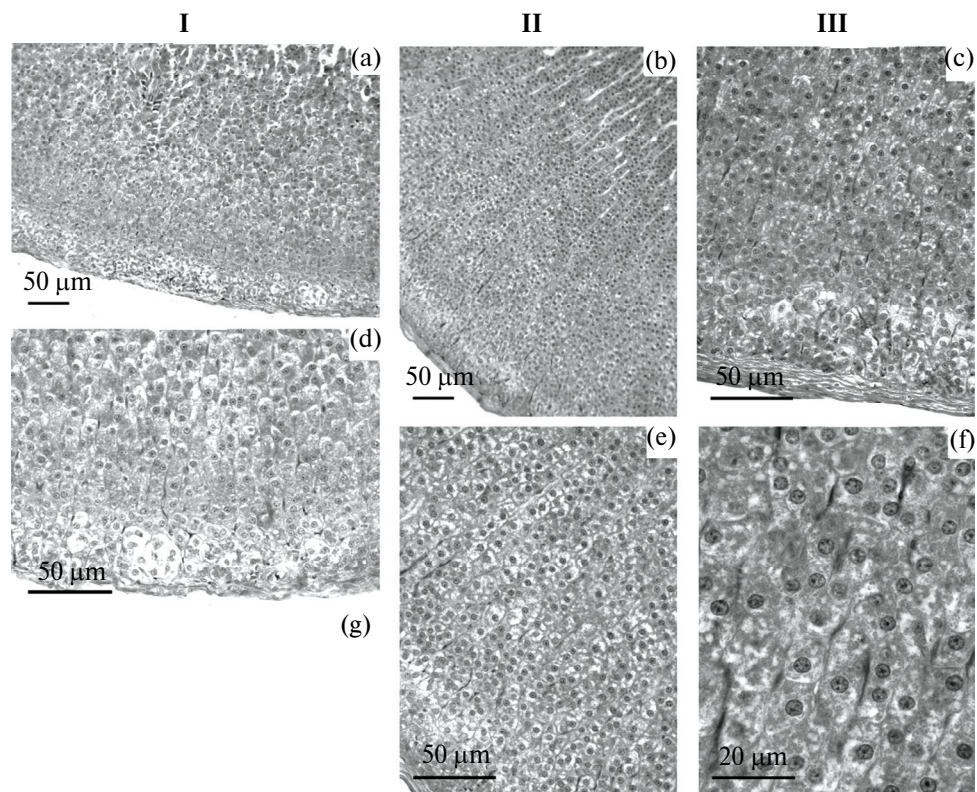


Рис. 8. Кора надпочечников крыс группы ПВТ, окраска железным гематоксилином по методу Гейденгайна. I (a, d) – подгруппа 1 (контроль); II (b, e) – подгруппа 2 (модель ПТСР + инъекции физиологического раствора); III (c, f) – подгруппа 3 (модель ПТСР + инъекции даларгина); (a, b) – ув. 20; (c, d, e) – ув. 40; (f) – ув. 100.

Группа ПВТ (пассивные высокотревожные крысы)

У контрольных ПВТ крыс часть клеток клубочковой зоны содержали слабо-окрашенную цитоплазму, а часть – сильноокрашенную плотную цитоплазму (рис. 8a, d). Цитоплазма клеток пучковой зоны в основном была интенсивно окрашена и содержала мелкие жировые включения, что определяло ее зернистый вид. В некоторых клетках наблюдалась слабоокрашенная цитоплазма. Тяжи клеток пучковой и сетчатой зон разделялись синусоидными капиллярами.

В модели ПТСР (подгруппа 2) количественное соотношение клубочковой, пучковой и сетчатой зон коры надпочечников, по сравнению с контролем, почти не изменилось (рис. 9a). Достоверных изменений морфометрических показателей надпочечников обнаружено не было (рис. 9b, c, d, e, f, g, h). Выраженных морфологических изменений в коре надпочечников, по сравнению с подгруппой 1, тоже не наблюдалось (рис. 8b, e).

Введение даларгина в модели ПТСР (подгруппа 3) изменило, по сравнению с подгруппой 2, количественное зональное соотношение в коре надпочечников (рис. 9a) и способствовало утолщению пучковой зоны на 23% (рис. 9e). Выраженных морфологических изменений в коре надпочечников, по сравнению с подгруппой 2, обнаружено не было (рис. 8c, f).

Для определения уровня тревожности через 2 суток после окончания недельного курса инъекций даларгина (подгруппа 3) и физиологического раствора (подгруппа 2)

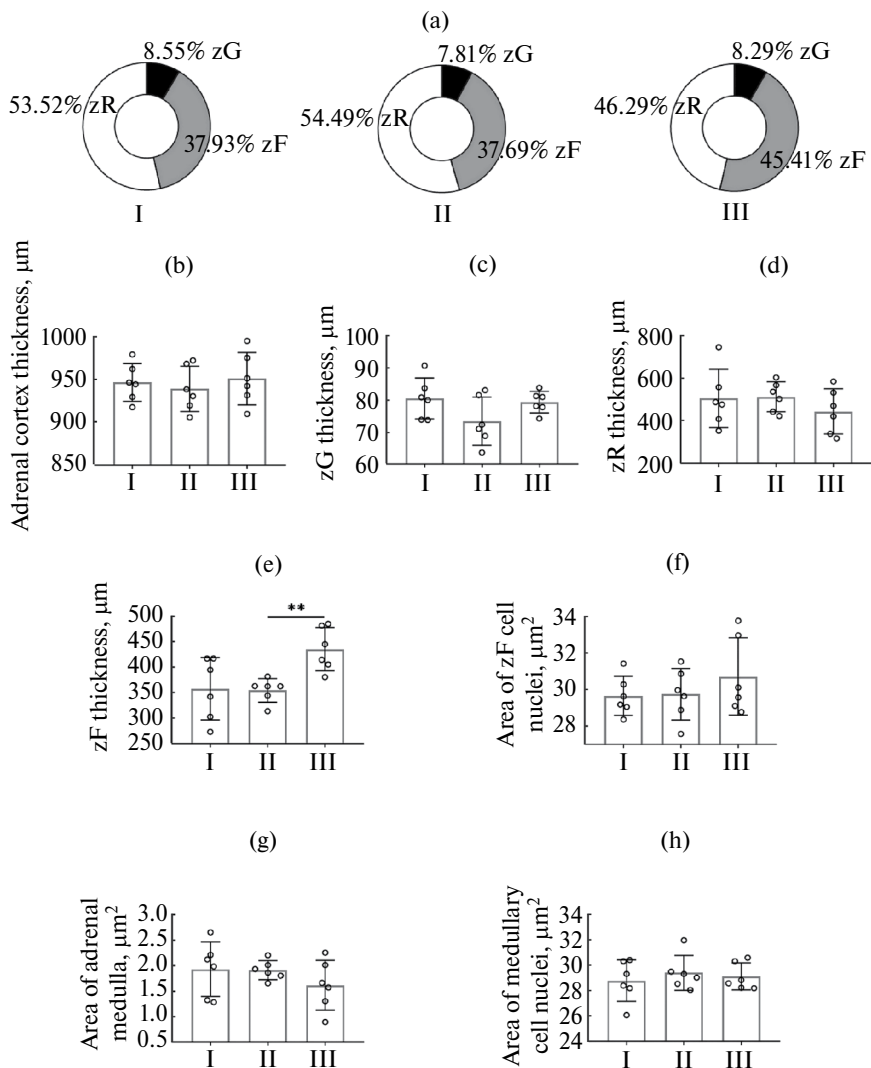


Рис. 9. Морфометрические показатели надпочечников крыс группы ПБТ; (а) – процентное соотношение клубочковой (zG), пучковой (zF) и сетчатой (zR) зон в коре надпочечников; на графиках (b, c, d, e, f, g, h) – морфометрические изменения коры и мозгового вещества надпочечников, результаты представлены в виде $M \pm SD$ и приведены индивидуальные значения для каждого животного. I – подгруппа 1, контроль; II – подгруппа 2, модель ПТСР + инъекции физиологического раствора; III – подгруппа 3, модель ПТСР + инъекции даларгина; ** $p < 0.01$ – достоверные отличия между подгруппами в ANOVA с поправкой Уэлча и апостериорным критерием Геймса-Хоуэла; (b) – толщина коры надпочечников, $F_{(2,15)} = 0.29$, $p = 0.7$, по оси ординат – thickness adrenal cortex, μm (толщина коры надпочечников, мкм); (c) – толщина клубочковой зоны, $F_{(2,15)} = 2.4$, $p = 0.12$, по оси ординат – thickness zG, μm (толщина клубочковой зоны, мкм); (d) – толщина сетчатой зоны, $F_{(2,15)} = 0.72$, $p = 0.49$, по оси ординат – thickness zR, μm (толщина сетчатой зоны, мкм); (e) – толщина пучковой зоны, $F_{(2,8.70)} = 7.94$, $p = 0.011$, по оси ординат – thickness zF, μm (толщина пучковой зоны, мкм); (f) – площадь ядра в клетках пучковой зоны, $F_{(2,15)} = 0.81$, $p = 0.45$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²); (g) – площадь мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 0.99$, $p = 0.39$, по оси ординат – the area of the adrenal medulla, μm^2 (площадь мозгового вещества, мм²); (h) – площадь ядра в клетках мозгового вещества, $F_{(2,15)} = 0.3$, $p = 0.74$, по оси ординат – the area of the nucleus, μm^2 (площадь ядра, мкм²).

Таблица 2. Влияние даларгина в модели ПТСР на тревожность и морфометрические показатели пучковой зоны (zF) коры и мозгового вещества (МВ) надпочечников

группа	параметр	подгруппа 2	подгруппа 3
АНТ	тревожность	=	↑
	толщина zF (мкм)	=	↑ 14%
	площадь ядер клеток zF (мкм ²)	↓ 9%	↑ 9.5%
	площадь МВ (мм ²)	=	↑ 21%
	площадь ядер клеток МВ (мкм ²)	~↑ 6%	=
АВТ	тревожность	↑	↓
	толщина zF (мкм)	↑ 10%	↓ 11%
	площадь ядер клеток zF (мкм ²)	=	=
	площадь МВ (мм ²)	=	=
	площадь ядер клеток МВ (мкм ²)	=	=
ПНТ	тревожность	↑	↑↑
	толщина zF (мкм)	↑ 17%	=
	площадь ядер клеток zF (мкм ²)	↓ 10.5%	=
	площадь МВ (мм ²)	↓ 41%	=
	площадь ядер клеток МВ (мкм ²)	↓ 8%	↓↓ 7%
ПВТ	тревожность	=	=
	толщина zF (мкм)	=	↑ 23%
	площадь ядер клеток zF (мкм ²)	=	=
	площадь МВ (мм ²)	=	=
	площадь ядер клеток МВ (мкм ²)	=	=

Группа АНТ – активные низкотревожные крысы; группа АВТ – активные высокотревожные крысы; группа ПНТ – пассивные низкотревожные крысы; группа ПВТ – пассивные высокотревожные крысы; подгруппа 2 – модель ПТСР + инъекции физиологического раствора; подгруппа 3 – модель ПТСР + инъекции даларгина; обозначения в графе “подгруппа 2” показывают изменения параметров по сравнению с контролем; обозначения в графе “подгруппа 3” показывают изменения параметров по сравнению с подгруппой 2; (↑) – увеличение, (↓) – уменьшение, (~↑) – тенденция увеличения.

крысы всех подгрупп (1, 2, 3) были протестированы в ПКЛ (рис. 1). Выведение крыс из эксперимента и фиксации надпочечников были сделаны спустя 2 суток после тестирования в ПКЛ. Результаты исследования о влиянии даларгина в модели ПТСР на развитие тревожности у крыс различных групп (АНТ, АВТ, ПНТ, ПВТ) нами были опубликованы в 2021 г. [13]. В табл. 2 представлены данные по изменению тревожности [13] и морфометрические изменения пучковой зоны и мозгового вещества у крыс различных групп (АНТ, АВТ, ПНТ, ПВТ).

У крыс группы АНТ в модели ПТСР (подгруппа 2) уровень тревожности, по сравнению с контролем, не изменялся (табл. 2), толщина пучковой зоны коры надпочеч-

ников и площадь мозгового вещества тоже не отличались от контрольных значений. После курса инъекций даларгина в модели ПТСР у АНТ крыс было обнаружено повышение тревожности. Одновременно увеличилась толщина пучковой зоны и площадь ядер клеток зоны, а также площадь мозгового вещества. У крыс группы АВТ в модели ПТСР (подгруппа 2) уровень тревожности, по сравнению с контролем, повысился, одновременно происходило увеличение толщины пучковой зоны. Под влиянием даларгина в модели ПТСР (подгруппа 3) уровень тревожности у АВТ крыс, по сравнению с подгруппой 2, оказался значительно ниже. Одновременно мы обнаружили уменьшение толщины пучковой зоны. У ПНТ крыс в модели ПТСР повышение тревожности тоже сопровождалось увеличением толщины пучковой зоны, но одновременно было зафиксировано уменьшение площади ядер клеток зоны, площади мозгового вещества и площади ядер клеток мозгового вещества. Под влиянием даларгина в модели ПТСР был зафиксирован, по сравнению с подгруппой 2, еще более высокий уровень тревожности, одновременно мы обнаружили еще большее уменьшение площади ядер мозгового вещества у ПНТ крыс. У крыс группы ПНТ морфометрические изменения показателей пучковой зоны наблюдались только в подгруппе 3, причем изменения уровня тревожности в подгруппах 2 и 3 обнаружено не было (табл. 2).

Таким образом, у животных АНТ, АВТ и ПНТ групп можно было проследить односторонненность изменений тревожности и толщины пучковой зоны. Интересно также отметить, что у пассивных низкотревожных крыс (ПНТ) повышение тревожности сопровождалось увеличением только толщины пучковой зоны, а площадь ядер клеток зоны, площадь мозгового вещества и площадь ядер клеток мозгового вещества при этом уменьшались. В то же время у активных особей (АНТ и АВТ) увеличение толщины пучковой зоны никогда не сопровождалось уменьшением площади ядер клеток зоны.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кора и мозговое вещество надпочечников играют решающую роль в реакции организма на стресс, а их морфофункциональные изменения являются одним из основных показателей стрессорного ответа. Несмотря на зональное строение, кора функционирует как единое целое, причем установлено, что клетки железы мигрируют центростремительно, изменяясь фенотипически и функционально по мере продвижения через клубочковую, пучковую и ретикулярную зоны, подвергаясь затем апоптозу [17]. Таким образом, выбор и поддержание клеточного фенотипа, а также наличие в клетках ферментов, необходимых для продукции определенных стероидов, зависит от пространственной локализации внутри железы. Ключевым гормоном, контролирующим стероидогенез, а также пролиферацию и дифференциацию клеток в корковом слое, является АКТГ [18].

По результатам морфометрического исследования надпочечников у крыс группы АНТ в модели ПТСР размер пучковой зоны, находящейся под непосредственным стимулирующим влиянием АКТГ [18, 19], не отличался от контроля. Уменьшение размеров ядер в клетках пучковой зоны при отсутствии различий в размере самой зоны (по сравнению с контролем) может свидетельствовать о стабилизации секреторной динамики у АНТ особей в стрессорных условиях. Одновременно была зафиксирована тенденция увеличения размера ядер в клетках мозгового вещества надпочечников, что может свидетельствовать о синтетической активности, связанной не только с выбросом катехоламинов, но и эндорфинов [20, 21]. Все это демонстрирует развитую стресс-лимитирующую систему крыс группы АНТ и согласуется с данными об отсутствии изменений в поведении, которые демонстрировали бы повышение тревожности у этих животных в модели ПТСР [13], по-видимому, в связи с адекватной продукцией CRF в экстрагипоталамических структурах мозга [22, 23].

У крыс группы АВТ в модели ПТСР нами было обнаружено утолщение пучковой зоны и накопление крупных жировых включений в цитоплазме, вероятно, вследствие хронического повышения стимулирующего воздействия АКТГ на кору надпочечников, в том числе на доставку [19, 24] и накопление [25] предшественников гормонов. Увеличение вакуолизации цитоплазмы клеток пучковой зоны при развитии ПТСР-подобного состояния было отмечено в исследованиях и других авторов [26]. Известно, что хронически высокий уровень циркулирующего АКТГ может быть обнаружен в результате нарушения регуляции ГАС по механизму отрицательной обратной связи, что, вероятно, одновременно с повышением тревожности [13] и происходит у крыс группы АВТ в модели ПТСР, как у высокотренируемых крыс high anxiety behavior [27].

У крыс группы ПНТ в модели ПТСР повышение тревожности [13], увеличение пучковой зоны [18] и накопление предшественников гормонов [19, 24, 25] в цитоплазме клеток пучковой зоны, возможно, тоже связано с хронически повышенным стимулирующим воздействием АКТГ в результате нарушения регуляции ГАС по механизму отрицательной обратной связи. Однако в отличие от крыс группы АВТ у ПНТ особей вместе с утолщением пучковой зоны было зафиксировано уменьшение размеров ядер в клетках, что может быть признаком патологических изменений [28] в результате чрезмерной выработки кортикостерона [2, 29]. Одновременно с изменениями в коре надпочечников у ПНТ крыс в модели ПТСР происходит уменьшение площади мозгового вещества и ядер в клетках этой структуры, что может свидетельствовать о снижении активности мозгового вещества.

Фармакологический препарат “Даларгин”, воздействуя только на периферические δ -опиоидные рецепторы, способен блокировать выработку глюкокортикоидов, нормализовать их содержание в крови стрессированных животных и препятствовать развитию гипертрофии надпочечников [8]. В ряде исследований указывается, что агонисты δ -опиоидных рецепторов оказывают анксиолитическое влияние на линейных мышей, демонстрирующих высокий уровень страха. [30, 31].

По результатам проведенного нами ранее исследования поведения [13] даларгин на крыс группы АВТ в модели ПТСР тоже оказал анксиолитическое действие. В нашем исследовании под воздействием даларгина в модели ПТСР толщина пучковой зоны у крыс группы АВТ практически не отличалась от контрольных значений. Экзогенное введение даларгина, по-видимому, восполнило дефицит эндоопиоидов и воспрепятствовало нарушению регуляции ГАС по механизму отрицательной обратной связи.

После инъекций даларгина в модели ПТСР у крыс группы АНТ мы обнаружили увеличение размеров пучковой зоны и мозгового вещества надпочечников, по сравнению с подгруппой 2, что свидетельствует о стимулирующем влиянии CRF и АКТГ на секрецию кортикостерона и адреналина, вероятно, в связи с недостаточным их количеством в крови, так как продукция этих гормонов блокируется даларгином. В опубликованных исследованиях [8, 30] указывается, что у животных, демонстрирующих стресс-устойчивость, зафиксировано увеличение содержания эндоопиоидов в крови и тканях. Можно предположить, что в наших опытах у крыс группы АНТ стресс-устойчивость в модели ПТСР обуславливается повышением содержания эндоопиоидов в крови и тканях, по сравнению с интактными особями этой же группы. Введение экзогенного агониста δ -опиоидных рецепторов даларгина крысам группы АНТ в модели ПТСР, по-видимому, нарушает сбалансированную систему взаимодействия стресс-реализующих и стресс-лимитирующих механизмов, вызывая опиоид-индуцированную недостаточность функции надпочечников [32]. Возможно, связанное с этими процессами увеличение уровня CRF, синтезируемого в ответ на снижение концентрации стрессорных гормонов надпочечников, может быть причиной повышения тревожности подгруппы 3 крыс группы АНТ [4, 33 - 35].

Высокая тревожность стрессированных крыс группы ПНТ, получавших инъекции даларгина [13], и сохранение у них, по сравнению с подгруппой 2, изменений в пучковой зоне, характерных для ПТСР-подобного состояния (увеличение вакуолизации

цитоплазмы [26] и уменьшение размера ядер в клетках пучковой зоны [28]) свидетельствует об отсутствии антистрессорного действия даларгина на этих животных.

При ранее проведенном нами исследовании поведения крыс группы ПВТ в модели ПТСР нам не удалось обнаружить достоверных изменений ни после введения физиологического раствора, ни после инъекций даларгина [13]. В результате морфометрического исследования надпочечников у крыс группы ПВТ только после введения даларгина в модели ПТСР было обнаружено увеличение пучковой зоны коркового слоя. Таким образом, в связи с высокой тревожностью, свойственной данной группе в интактном состоянии, можно предположить малую вариативность физиологических адаптивных изменений, что подтверждается гистологической картиной при воздействии даларгина в модели ПТСР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфологическое исследование надпочечников показало, что у крыс группы АНТ в результате введения даларгина в модели ПТСР происходит увеличение размеров пучковой зоны коры и мозгового вещества надпочечников, что обусловлено усилением синтетической активности клеток в этих структурах.

У крыс группы АВТ при развитии ПТСР-подобного состояния было обнаружено усиление синтетической активности пучковой зоны коры надпочечников, а даларгин в модели ПТСР блокировал продукционную деятельность надпочечников.

У крыс группы ПНТ в модели ПТСР наряду с увеличением толщины пучковой зоны уменьшается активность ядер клеток пучковой зоны коры и активность клеток мозгового вещества надпочечников. Введение даларгина практически не изменило морфологию надпочечников у стрессированных ПНТ животных.

У крыс группы ПВТ после введения даларгина в модели ПТСР, судя по морфологическим изменениям, усиливается синтетическая активность пучковой зоны.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа проведена на животных из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes). Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, протокол 06/08 от 08 июня 2020 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета при поддержке Госпрограммы 47 ГП “научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030), тема № 0134-2019-0002. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.В., Н.Э.О.), подготовка экспериментальных животных (О.Г.С., А.В.П.) сбор данных (А.В.П., А.В.В., В.В.Р., О.Г.С.), обработка данных (В.В.Р., О.Г.С., А.В.П.), написание и редактирование манускрипта (А.В.В., О.Г.С., А.В.П., Н.Э.О.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lisieski MJ, Eagle AL, Conti AC, Liberzon I, Perrine SA* (2018) Single-prolonged stress: a review of two decades of progress in a rodent model of post-traumatic stress disorder. *Front Psychiatry* 9: 196. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00196>
2. *Wilson CB, McLaughlin LD, Nair A, Ebenezer PJ, Dange R, Francis J* (2013) Inflammation and oxidative stress are elevated in the brain, blood, and adrenal glands during the progression of post-traumatic stress disorder in a predator exposure animal model. *PloS One* 8(10): e76146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076146>
3. *Ressler KJ, Berretta S, Bolshakov VY, Rosso IM, Meloni EG, Rauch SL, Carlezon Jr WA* (2022) Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nat Rev Neurol* 18(5): 273–288. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00635-8>
4. *Шалыпина ВГ* (2005) Кортиколиберин в регуляции приспособительного поведения и патогенезе постстрессорной психопатологии. В кн: Основы нейроэндокринологии. Шалыпина ВГ, Шабанов ПД (ред). Элби-СПб. 84–146. [*Shalyapina VG* (2005) Corticoliberin in the regulation of adaptive behavior and the pathogenesis of post-stress psychopathology. In: *Bases of Neuroendocrinology*. Eds: *Shalyapina VG, Shabanov PD* (Eds). Elbi-SPb. 84–146. (In Russ)].
5. *Миронова ВИ, Рыбникова ЕА* (2008) Устойчивые модификации экспрессии нейрогормонов в гипоталамусе крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 94(11): 1277–1284. [*Mironova VI, Rybnikova EA* (2008) Modifications of hypothalamic neurohormone expression in animal model of post-traumatic stress disorder. *Russ J Physiol* 94(11): 1277–1284. (In Russ)].
6. *Yehuda R* (2009) Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci* 1179: 56–69. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04979.x>
7. *Blum K, Modestino EJ, Baron D, Brewer R, Thanos P, Elman I, Badgaiyan RD, Downs BW, Bagchi D, McLaughlin Th, Bowirrat A, Roy AK, Gold MS* (2021) Endorphinergic enhancement attenuation of post-traumatic stress disorder (PTSD) via activation of neuro-immunological function in the face of a viral pandemic. *Curr Psychopharmacol* 10: 86–97. <https://doi.org/10.2174/2211556009999210104221215>
8. *Лишманов ЮБ, Маслов ЛН, Нарыжная НВ, Пей Ж-М, Колар Ф, Жанг И, Портниченко АГ, Ванг Х* (2012) Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов. *Вестник РАМН* 6: 73–82. [*Lishmanov YuB, Maslov LN, Naryzhnaya NV, Pei JM, Kolar F, Zhang Y, Portnichenko AG, Wang H* (2012) Endogenous opioid system as a mediator of acute and long-term adaptation to stress. Prospects for clinical use of opioid peptides. *Ann Russ Acad Med Sci* 6: 73–82. (In Russ)].
9. *Ziegler CG, Mohn C, Lamounier-Zepter V, Rettori V, Bornstein SR, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M* (2010) Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Horm Metab Res* 42: 88–92. <https://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1241860>
10. *Niederhoffer N, Hansen HH, Fernandez-Ruiz JJ, Szabo B* (2001) Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. *Br J Pharmacol* 134(6): 1319–1327.
11. *Лихванцев ВВ, Гребенчиков ОА, Шапошников АА, Борисов КЮ, Черпаков РА, Шульгина НМ* (2012) Фармакологическое прекодиционирование: роль опиоидных пептидов. *Общая реаниматол* 8(3): 51–54. [*Likhvantsev VV, Grebenchikov OA, Shaposhnikov AA, Borisov Kyu, Cherpakov RA, Shulgina NV* (2012) Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides. *Gener Reanimatol* 8(3): 51–54. (In Russ)].
12. *Маслов ЛН, Мухомедзянов АВ, Лишманов ЮБ* (2016) Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции функционального состояния сердца. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 102(9): 1017–1029. [*Maslov LN, Mukhomedzyanov AV, Lishmanov YuB* (2016) Role of endogenous opioid system in the regulation of functional state of heart. *Russ J Physiol* 102(9): 1017–1029. (In Russ)].
13. *Семенова ОГ, Вьюшина АВ, Притворова АВ, Ракицкая ВВ, Ордян НЭ* (2021) Влияние даларгина на изменение тревожности у крыс с различными индивидуально-типологическими особенностями поведения в модели ПТСР. *Журн высш нерв деят им ИП Павлова* 71(5): 680–689. [*Semenova OG, Vyushina AV, Pritvorova AV, Rakitskaya VV, Ordyan NE* (2021) Effects of dalargin on anxiety changes in rats with different individual-typological behavioral features in the PTSD model. *J Higher Nerv Activity* 71(5): 680–689. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044467721050099>

14. *Шалыпина ВГ, Вершинина ЕА, Ракицкая ВВ, Рыжова ЛЮ, Семенова МГ, Семенова ОГ* (2006) Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс Вистар в водно-иммерсионной модели депрессии. Журн высш нерв деят им ИП Павлова 56(4): 543–547. [*Shalyapina VG, Verшинina EA, Rakitskaya VV, Rizhova LYu, Semenova MG, Semenova OG* (2006) Alteration of active and passive Wistar rats adaptive behavior in water-immersion model of depression. J Higher Nerv Activity 56(4): 543–547. (In Russ)].
15. *Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M* (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods 14(3): 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
16. *Шалыпина ВГ, Ракицкая ВВ, Семенова МГ, Семенова ОГ* (2006) Гормональная функция гипофизарно-адренокортикальной системы в патогенетической гетерогенности постстрессорных депрессий. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 92(4): 480–487. [*Shalyapina VG, Rakitskaya VV, Semenova MG, Semenova OG* (2006) Hormonal function of the hypophyseal-adrenocortical system in the pathogenetic heterogeneity of post-stress depressions. Russ J Physiol 92(4): 480–487. (In Russ)].
17. *Vinson GP* (2016) Functional zonation of the adult mammalian adrenal cortex. Front Neurosci 10: 238. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00238>
18. *Hasenmajer V, Bonaventura I, Minnetti M, Sada V, Sbardella E, Isidori AM* (2021) Non-canonical effects of ACTH: insights into adrenal insufficiency. Front Endocrinol 12: 701263. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.701263>
19. *Wellman K, Fu R, Baldwin A, Rege J, Murphy E, Rainey WE, Mukherjee N* (2021) Transcriptomic response dynamics of human primary and immortalized adrenocortical cells to steroidogenic stimuli. Cells 10: 2376. <https://doi.org/10.3390/cells10092376>
20. *Jefferys D, Funder JW* (1987) Glucocorticoids, adrenal medullary opioids, and the retention of a behavioral response after stress. Endocrinology 121(3): 1006–1009. <https://doi.org/10.1210/endo-121-3-1006>
21. *Vandael DHF, Marcantoni A, Carbone E* (2015) Ca_v1.3 channels as key regulators of neuron-like firings and catecholamine release in chromaffin cells. Current Mol Pharmacol 8(2): 149–161.
22. *Laryea G, Schutz G, Muglia LJ* (2013) Disrupting hypothalamic glucocorticoid receptors causes HPA axis hyperactivity and excess adiposity. Mol Endocrinol 27: 1655–1665. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1187>
23. *Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F* (2018) Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. Stress 21: 403–416. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1470238>
24. *Lefebvre H, Thomas M, Duparc C, Bertherat J, Louiset E* (2016) Role of ACTH in the interactive/paracrine regulation of adrenal steroid secretion in physiological and pathophysiological conditions. Front Endocrinol 7: 98. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00098>
25. *Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB* (2016) ACTH regulation of adrenal SR-B1. Front Endocrinol 7: 42. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00042>
26. *Кондашевская МВ, Цейликман ВЭ, Манухина ЕБ, Дауни ГФ, Комелькова МВ, Лапшин МС, Самойлов ЕА, Попков ПН, Алилуев АВ, Васильева МВ, Курганов АС, Мальцева НВ, Цейликман ОБ* (2017) Нарушение морфофункционального состояния надпочечников при экспериментальном посттравматическом стрессовом расстройстве у крыс: корреляция с поведенческими маркерами. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 103(7): 808–818. [*Kondashevskaya MV, Tselikman VE, Manukhina EB, Downey HF, Komelkova MV, Lapshin MS, Samoylov EA, Popkov PN, Aliluev AV, Vasileva MV, Kurganov AS, Maltseva NV, Tselikman OB* (2017) Disorder in the morphology and function of adrenal glands in experimental post-traumatic stress disorder in rats: correlation with behavioral markers. Russ J Physiol 103(7): 808–818. (In Russ)].
27. *Wegener G, Mathe AA, Neumann ID* (2012) Selectively bred rodents as models of depression and anxiety. Curr Topics Behav Neurosci (12): 139–187. <https://doi.org/10.1007/7854-2011-192>
28. *Tselikman V, Komelkova M, Kondashevskaya MV, Manukhina E, Downey HF, Chereshev V, Cheresheva M, Platkovskii P, Goryacheva A, Pashkov A, Fedotova Ju, Tselikman O, Maltseva N, Cherkasova O, Steenblock Ch, Bornstein S, Eitrich B, Chrousos GP, Ullmann E* (2021) A rat model of post-traumatic stress syndrome causes phenotype-associated morphological changes and hypofunction of the adrenal gland. Int J Mol Sci 22: 13235. <https://doi.org/10.3390/ijms222413235>
29. *Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP* (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. Am J Physiol Endocrinol Metab 291(5): E965–E973. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2006>

30. Szklarczyk K, Korostynski M, Cieslak PE, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R (2015) Opioid-dependent regulation of high and low fear responses in two inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 292: 95–101.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.001>
31. Browne CA, Lucki I (2019) Targeting opioid dysregulation in depression for the development of novel therapeutics. *Pharmacol Therap* 201: 51–76.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.009>
32. Coluzzi F, LeQuang JAK, Sciacchitano S, Scerpa MS, Rocco M, Pergolizzi J (2023) A closer look at opioid-induced adrenal insufficiency: a narrative review. *Int J Mol Sci* 24: 4575.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054575>
33. Brockway DF, Crowley NA (2020) Turning the tides on neuropsychiatric diseases: the role of peptides in the prefrontal cortex. *Front Behav Neurosci* 14: 588400.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.588400>
34. Dedic N, Chen A, Deussing JM (2018) The CRF family of neuropeptides and their receptors – mediators of the central stress response. *Current Mol Pharmacol* 11: 4–31.
<https://doi.org/10.2174/1874467210666170302104053>
35. Chen P, Lou S, Huang ZH, Wang Z, Shan QH, Wang Y, Jin Y, Zhang Z, Zhou JN (2020) Prefrontal cortex corticotropin-releasing factor neurons control behavioral style selection under challenging situations. *Neuron* 106: 301–315.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.033>

Morphological adrenal glands changes in rats with different individual-typological behavior features in the ptsd model after dalargin injections

**O. G. Semenova^{a,*}, A. V. Vyushina^a, A. V. Pritvorova^a, V. V. Rakitskaya^a,
and N. E. Ordyan^a**

^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: SemenovaOG@infran.ru*

Morphological changes in the adrenal glands of male Wistar rats were studied after intramuscular injection of dalargin (a synthetic analog of leu-enkephalin) in a model of post-traumatic stress disorders (PTSD). According to the results of testing in the T-maze and the elevated plus maze (ECL), the rats were divided into groups: active of the low anxiety (ALA), active of the high anxiety (AHA), passive of the low anxiety (PLA), passive of the high anxiety (PHA). In ALA rats after injection of dalargin in the PTSD model the thickness of the fascicular zone (zF) of the adrenal cortex increased by 14%, the area of nuclei in zF cells by 9.5%, and the area of the medulla by 21%. With the development of a PTSD-like state in AHA rats, the thickness of the zF increased by 10%. After injection of dalargin in the PTSD model the thickness of the zF was like control. With the development of a PTSD-like state in PLA rats, the thickness of the zF increased by 17%, and the area of zF cells nuclei, the area of the adrenal medulla and the area nuclei adrenal medulla are decrease by 10.5%, 41% and 8%, respectively. After injection of dalargin in the PTSD model area of the adrenal medullas nuclei decrease more by 7%. In PHA rats after injection of dalargin in the PTSD model the thickness zF increased by 23%. It was concluded that the effect of dalargin on the morphometric parameters of the adrenal glands in modeling PTSD is determined by individual typological features of behavior.

Keywords: post-traumatic stress disorder, dalargin, adrenal glands, anxiety, activity, rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗМЕНЕНИЕ БАРОРЕФЛЕКТОРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РИТМА СЕРДЦА
ПОСЛЕ “СУХОЙ” ИММЕРСИИ ПРОЯВЛЯЕТСЯ ПРИ ОРТОСТАЗЕ,
НО НЕ ПРИ ОТРИЦАТЕЛЬНОМ ДАВЛЕНИИ НА НИЖНЮЮ ЧАСТЬ ТЕЛА**

© 2024 г. Р. Ю. Жедяев^{1,*}, О. С. Тарасова^{1,2}, Ю. С. Семенов¹, А. С. Боровик¹,
О. Л. Виноградова¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва Россия

*E-mail: zhedyaev-r@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 19.11.2023 г.

Соотношение низкочастотных (~0.1 Гц) волн длительности RR-интервала и систолического артериального давления (АД) отражает чувствительность кардиохронотропного барорефлекса. Гравитационная разгрузка может приводить к изменению чувствительности кардиохронотропного барорефлекса во время пассивного ортостатического теста (ОТ) и теста с созданием отрицательного давления на нижнюю часть тела (ОДНТ). Оба воздействия вызывают перераспределение крови в нижнюю часть тела, но ОТ сопровождается большей разгрузкой синокаротидных барорецепторов, по сравнению с ОДНТ, и активацией вестибулосимпатического рефлекса, однако прямого сопоставления эффектов гравитационной разгрузки на чувствительность кардиохронотропного барорефлекса в этих тестах ранее не проводилось. Целью данной работы была проверка гипотезы о том, что влияние “сухой” иммерсии (наземная модель гравитационной разгрузки) на чувствительность кардиохронотропного барорефлекса у одних и тех же испытуемых будет ярче проявляться при ОТ, чем при ОДНТ, вызывающем сопоставимое по величине снижение ударного объема. Девять здоровых мужчин участвовали в двух тестированиях (до и после 7-дневной сухой иммерсии), включавших по пять 3-минутных ОТ (65°) и пять 3-минутных тестов ОДНТ (–35 мм рт. ст.) с последующим усреднением показателей для каждого воздействия. Амплитуду низкочастотных волн RR-интервала и систолического АД в диапазоне 0.05–0.13 Гц определяли с помощью вейвлет-анализа. Амплитуда низкочастотных волн систолического АД увеличивалась в обоих тестах, после гравитационной разгрузки – сильнее при ОТ. Амплитуда низкочастотных волн RR-интервала при обоих воздействиях снижалась, степень снижения не различалась между тестами и не изменялась под влиянием гравитационной разгрузки. α -коэффициент (отношение амплитуды низкочастотных волн RR-интервала и систолического АД) одинаково уменьшался в двух тестах до гравитационной разгрузки, однако после нее степень снижения α -коэффициента увеличивалась при ОТ, но не изменялась при ОДНТ. Таким образом, влияние гравитационной разгрузки на чувствительность кардиохронотропного барорефлекса проявляется при ОТ, но не при ОДНТ, что может объясняться более выраженным влиянием ОТ на механизмы нервной регуляции ритма сердца.

Ключевые слова: барорефлекс, гравитационная разгрузка, систолическое артериальное давление, длительность RR-интервала, α -коэффициент

DOI: 10.31857/S0869813924010053, **EDN:** WQDMTF

ВВЕДЕНИЕ

Барорефлекс является ключевым механизмом поддержания уровня системного артериального давления (АД) по принципу отрицательной обратной связи. В организме барорефлекс функционирует в “замкнутом контуре” (АД одновременно служит и стимулом, воздействующим на барорецепторы, и регулируемой переменной). В результате относительно медленной реакции сосудов на нервное воздействие в этом контуре возникают низкочастотные (НЧ) колебания АД, частота которых у человека составляет около 0.1 Гц [1–4]. Вторично к НЧ колебаниям АД по барорефлекторному же механизму возникают НЧ колебания сердечного ритма, поэтому по соотношению амплитуды НЧ колебаний ритма сердца и артериального давления можно оценить чувствительность “спонтанного” кардиохронотропного барорефлекса [5–8].

В условиях космического полета развиваются глубокие изменения регуляции сердечно-сосудистой системы, в частности, барорефлекторной регуляции сердечного ритма [9]. Эти изменения служат одной из причин послеполетной ортостатической неустойчивости, которая часто снижает функциональные возможности космонавтов в первые дни после полета [10, 11]. Для изучения эффектов гравитационной разгрузки на организм используется наземная экспериментальная модель – “сухая” иммерсия [12]. Важно, что это воздействие воспроизводит многие эффекты космического полета на сердечно-сосудистую систему и ее регуляцию, что проявляется уже через несколько дней экспозиции [6, 13–16].

В космической медицине для оценки ортостатической устойчивости человека после гравитационной разгрузки применяют пассивный ортостатический тест (ОТ) и тест с созданием отрицательного давления на нижнюю часть тела (ОДНТ) [17]. В обоих тестах поддержание уровня артериального давления, несмотря на смещение крови в нижнюю часть тела и снижение ударного объема левого желудочка, достигается активацией артериального барорефлекса и рефлексов с кардиопульмонарных рецепторов, роль этих механизмов особенно велика в первые минуты воздействия, опережая влияние ренин-ангиотензин-альдостероновой, вазопрессиновой и других гормональных систем [18–20]. Показано, что пребывание в условиях гравитационной разгрузки (космический полет или “сухая” иммерсия) сказывается на регуляции гемодинамики, что проявляется как при ортостазе [6, 10, 13, 21, 22], так и при создании ОДНТ [6, 7, 21, 23].

Следует отметить, что, несмотря на сходное влияние этих воздействий на перераспределение крови в сосудистой системе, которое можно оценить, например, по степени снижения ударного объема левого желудочка [21], ортостаз отличается от ОДНТ по степени активации и спектру задействованных регуляторных механизмов. В частности, воздействие на синокаротидные барорецепторы при ортостазе больше, так как в этом случае возникает градиент гидростатического давления между сердцем и каротидными синусами, а при создании ОДНТ (при неизменном горизонтальном положении тела человека) такой градиент отсутствует. Показано, что нарушение работы синокаротидных рецепторов ведет к снижению АД при ортостазе (развитию ортостатической гипотензии) [24]. Кроме того, при ортостазе, в отличие от ОДНТ, могут активироваться вестибулосимпатический рефлекс [25] и ряд других механизмов, функционирование которых зависит от градиента гидростатического давления в сосудистой системе [26]. Поэтому сопоставление гемодинамических реакций, наблюдаемых в этих двух тестах, может способствовать раскрытию механизмов влияния гравитационной разгрузки на регуляцию сердечно-сосудистой системы. Как ортостаз, так и ОДНТ сопровождаются изменением барорефлекторной регуляции сердечного ритма [27, 28]. Однако прямого сопоставления эффектов гравитационной разгрузки на чувствительность “спонтанного” сердечного барорефлекса при ортостазе и ОДНТ до сих пор проведено не было.

Целью данной работы была проверка следующей гипотезы: влияние гравитационной разгрузки на чувствительность кардиохронотропного барорефлекса у одних и тех же испытуемых будет более выраженным при ортостазе, чем при ОДНТ, вызывающем сопоставимое по величине снижение ударного объема.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика испытуемых

В исследовании принимали участие 9 здоровых испытуемых-добровольцев (возраст 31 ± 5 лет; масса тела 69 ± 9 кг; рост 174 ± 7 см; индекс массы тела 22.8 ± 2.3 кг/м²). Испытуемые не имели заболеваний сердечно-сосудистой системы, не курили и не принимали никаких фармакологических препаратов. Перед экспериментами они прошли медицинскую комиссию Института медико-биологических проблем РАН, по результатам которой были допущены к участию в исследовании.

Организация исследования

Эксперимент по исследованию эффектов СИ проводился в Институте медико-биологических проблем РАН, принципы его организации описаны в работе [12]. На каждом этапе эксперимента два испытуемых одновременно находились в течение 7 дней в индивидуальных ваннах для “сухой” иммерсии, температура воды в которых поддерживалась на уровне $33 \pm 1^\circ\text{C}$. Каждое утро испытуемого извлекали из ванны для проведения гигиенических процедур, время пребывания вне ванны составляло около 20 мин. в сутки. В течение всего времени пребывания в условиях “сухой” иммерсии испытуемые находились под наблюдением дежурной медицинской бригады.

За две недели до иммерсии с испытуемыми проводили занятие, во время которого их знакомили с методикой проведения измерений и, кроме того, определяли индивидуальную частоту дыхания, с которой данный испытуемый дышал во время проведения основных измерений (см. далее).

Основные измерения проводили за три дня до “сухой” иммерсии и в день выхода из нее примерно в одно и то же время суток (около 12 ч дня, т.е. через 2–3 ч после завтрака) в отдельной комнате при температуре воздуха от 22 до 24 °C. Последовательно проводили два теста: ОТ и, после 30-минутного перерыва, ОДНТ. Тесты проводили в интервальном режиме: чередование 3-минутных периодов воздействия и 3-минутных периодов “отдыха”, такой режим воздействия позволяет более подробно оценивать реакции нейрогенной природы [18–20].

Непрерывная регистрация показателей в ходе эксперимента

Регистрацию электрокардиограммы проводили с помощью стандартных одноразовых хлорсеребряных электродов и универсального усилителя NVX52 (МКС, Россия). Отводящие электроды располагали на коже испытуемого под правой ключицей и в области левого подреберья, а референтный электрод – под левой ключицей.

Давление крови в артериях среднего пальца правой руки регистрировали фотокомпенсационным методом с использованием прибора Finometer (Finapres Medical Systems, Нидерланды). Правое предплечье фиксировали на уровне мечевидного отростка грудины с помощью локтевого бандажа-косынки. Вторую измерительную манжету прибора Finometer надевали на плечо, она использовалась для калибровки уровня давления в пальцевой манжете, а также чтобы учитывать изменения гидростатического давления при возможном смещении руки относительно сердца во время проведения тестов.

Ударный объем также регистрировали с помощью прибора Finometer с использованием алгоритма “ModelFlow”, который основан на анализе формы пульсовой волны давления крови в артериях пальца [29].

Частоту дыхания регистрировали с помощью назального термисторного датчика. Во время эксперимента ритм дыхания задавался голосовыми командами с компьютера. Частоту “навязанного” дыхания подбирали индивидуально так, чтобы она была как можно выше частоты барорефлекторных волн (около 0.1 Гц или 6 циклов в мин), оставаясь комфортной для данного испытуемого. Подобранные таким образом значения частоты дыхания находились в диапазоне от 0.2 до 0.25 Гц (12–15 циклов в мин), это предотвращало наложение дыхательных волн систолического АД и RR-интервала на низкочастотные волны барорефлекторной природы.

Кроме того, в ОТ регистрировали угол наклона ортостола с использованием специально изготовленного гониометра на основе акселерометра ADXL335 (Analog devices, США), а в тесте ОДНТ – уровень отрицательного давления на нижнюю часть тела.

Все аналоговые сигналы оцифровывали с помощью универсального усилителя биосигналов NVX52 (частота дискретизации 1000 Гц) и записывали на жесткий диск персонального компьютера с использованием программы NeoRec (МКС, Россия).

Протокол проведения ортостатического теста

Перед проведением теста испытуемые находились в спокойном состоянии в положении лежа на спине не менее 15 мин, в это время устанавливали измерительные датчики и электроды, проводили калибровку приборов. Тест проводили в интервальном режиме: во время измерений показатели записывали сначала в течение 3 мин. в положении лежа, затем быстро (за время порядка 2 с) переводили испытуемого на 3 мин в положение ортостаза (65°), после чего быстро (также за 2 с) возвращали в горизонтальное положение на 3 мин. Такой 6-минутный цикл (3 мин ортостаза + 3 мин в горизонтальном положении) повторяли пять раз (рис. 1а). При ортостазе испытуемый сидел на седле, его ноги свободно свисали, что позволяло исключить влияние опорной афферентации и напряжения мышц ног.

Протокол проведения теста ОДНТ

Для создания отрицательного давления на нижнюю часть тела использовали костюм “Чибиc” (НПП Звезда, Россия) [30]. Костюм выполнен в виде штанов, изготовленных из гофрированного воздухонепроницаемого материала, поддержание заданного уровня давления осуществляется с помощью компьютерной программы, управляющей работой пневмоклапанов в системе откачки воздуха. Протокол проведения теста ОДНТ (рис. 1б) был сходным с протоколом ОТ (рис. 1а). Во время всего теста испытуемый находился в положении лежа на спине. После помещения в костюм испытуемый находился в спокойном состоянии в течение 15 мин, по истечении которых начинали регистрацию показателей: сначала 3 мин. при атмосферном давлении в костюме, затем каждые 3 мин давление в костюме периодически изменяли от атмосферного до –35 мм рт. ст. и обратно, такой 6-минутный цикл повторяли пять раз. Время снижения давления в костюме составляло 5–7 с, а повышения – 3–5 с. По результатам наших предыдущих исследований при ОДНТ, равном –35 мм рт. ст., снижение ударного объема примерно соответствует таковому при ортостазе 65° [21, 31].

Обработка экспериментальных данных

Обработку данных проводили с помощью специально разработанных программ в среде программирования MATLAB (MathWorks Inc., США). Для каждого сердечного цикла вычисляли систолическое АД и длительность RR-интервала. Значения показателей гемодинамики в покое (положение лежа/атмосферное давление) и при воздействиях (ортостаз/ОДНТ) вычисляли путем усреднения значений за последние 60 с во всех эпизодах, соответствующих периодам покоя или периодам тестового воздействия.

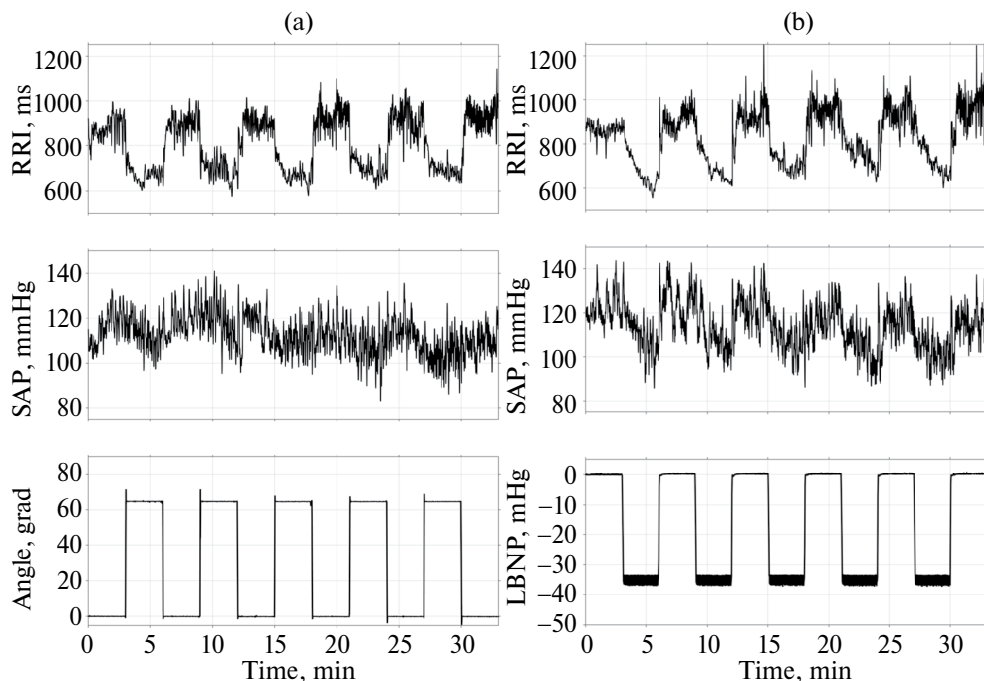


Рис. 1. Графики экспериментальных данных, полученных в интервальных ОТ (а) и тесте ОДНТ (б) (испытуемый П.). Сверху вниз: длительность RR-интервала (RRI), систолическое АД (SAP), угол наклона ортостола (а) или уровень ОДНТ (б). Для показателей гемодинамики приведены значения, вычисленные в последовательных сердечных циклах.

Для оценки спектральных характеристик спонтанных колебаний систолического АД и RR-интервала поударные значения этих показателей с использованием линейной интерполяции преобразовывали в ряды равноотстоящих по шкале времени величин (частота ресэмплирования 5 Гц), затем проводили вейвлет-преобразование этих рядов с использованием комплексного вейвлета Морзе [32]. Амплитудные вейвлет-спектры систолического АД и RR-интервала вычисляли для последних 60 с каждого из эпизодов покоя или воздействия, полученные спектры усредняли по всем пяти циклам покой/воздействие. Средние значения амплитуды низкочастотных колебаний этих показателей вычисляли путем усреднения в частотном диапазоне от 0.05 до 0.13 Гц. Для оценки чувствительности кардиохронотропного барорефлекса вычисляли отношение амплитуды низкочастотных колебаний RR-интервала и низкочастотных колебаний систолического АД.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Соответствие распределения данных нормальному было подтверждено с использованием критерия Шапиро-Уилка. Данные в тексте, в таблицах и на рисунках представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего, кроме антропометрических данных испытуемых, которые приведены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Для оценки отличий показателей гемодинамики в состоянии покоя до и после “сухой” иммерсии использовали парный *t*-тест Стьюдента. Для оценки различий в реакции показателей гемодинамики в ответ на ортостаз или ОДНТ относительно положения покоя

Таблица 1. Значения показателей гемодинамики и индексов их вариабельности в низкочастотном диапазоне в спокойном состоянии (положение лежа/атмосферное давление в костюме “Чибис”) за трое суток до (–3-й день) и на седьмые сутки “сухой” иммерсии (7-й день)

Показатели	До “сухой” иммерсии (–3-й день)	После “сухой” иммерсии (7-й день)
Ударный объем, мл	100.1 ± 5.5	$78.1 \pm 5.2^*$
RR-интервал, мс	1033 ± 36	$884 \pm 55^*$
Систолическое АД, мм рт. ст.	120.0 ± 1.2	120.4 ± 1.9
Амплитуда низкочастотных колебаний систолического АД, мм рт.ст.	1.63 ± 0.14	1.44 ± 0.08
Амплитуда низкочастотных колебаний RR-интервала, мс	22.3 ± 2.4	$15.6 \pm 1.6^*$
α -коэффициент, мс/мм рт. ст.	14.2 ± 1.6	$11.3 \pm 1.4^*$

Приведены результаты усреднения показателей в двух тестах. * – $p < 0.05$ по сравнению со значением до иммерсии (парный t -критерий Стьюдента).

до и после “сухой” иммерсии применяли двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом Сидака. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фоновые значения гемодинамических показателей и их изменения в тестах до и после “сухой” иммерсии

Пребывание в 7-дневной “сухой” иммерсии приводило к изменению показателей работы сердца в спокойном состоянии: наблюдались уменьшение ударного объема и тахикардия (табл. 1). Уровни систолического АД в покое до и после иммерсии не различались (табл. 1).

До иммерсии в двух тестах (ОТ и тест ОДНТ) наблюдались сходные изменения ударного объема и RR-интервала: оба показателя уменьшались (рис. 2а, б), однако снижение систолического АД до иммерсии было более значительным в тесте ОДНТ, чем при ортостазе (рис. 2с).

После иммерсии изменения всех показателей гемодинамики при проведении тестов были более выраженными, чем до иммерсии. При этом реакции ударного объема и RR-интервала при ортостазе и в тесте ОДНТ увеличивались сходным образом (рис. 2а, б). Вместе с тем реакция систолического АД после иммерсии в ОТ увеличивалась сильнее, чем в тесте ОДНТ (в 2.7 ± 0.5 раз по сравнению с 1.2 ± 0.1 раз, $p < 0.05$) (рис. 2с).

Фоновые значения амплитуды низкочастотных колебаний систолического АД и RR-интервала и их изменения в тестах до и после “сухой” иммерсии

На вейвлет-спектрах систолического АД и RR-интервала видны два отчетливых пика: в высокочастотной области (на дыхательной частоте, около 0.25 Гц) и в низкочастотной области (около 0.1 Гц) (рис. 3). Поскольку именно низкочастотный пик отражает колебания показателей гемодинамики, обусловленные работой барорефлекса [2],

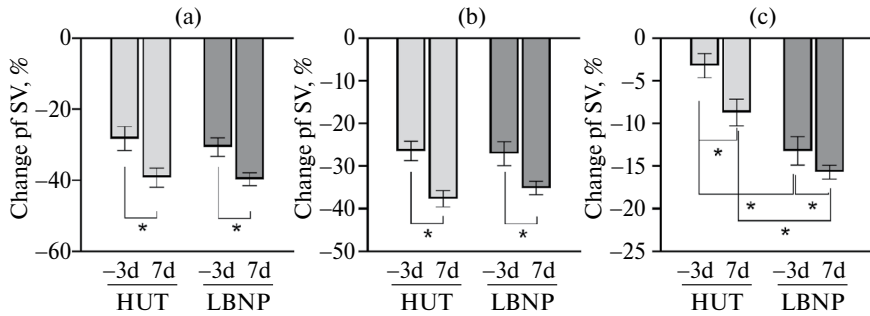


Рис. 2. Относительные изменения ударного объема (SV, a), RR-интервала (RRI, b) и систолического АД (SAP, c) в пассивном ортостатическом тесте (HUT) и в тесте с созданием отрицательного давления на нижнюю часть тела (LBNP) до (–3d) и после (7d) “сухой” иммерсии. * – $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом Сидака).

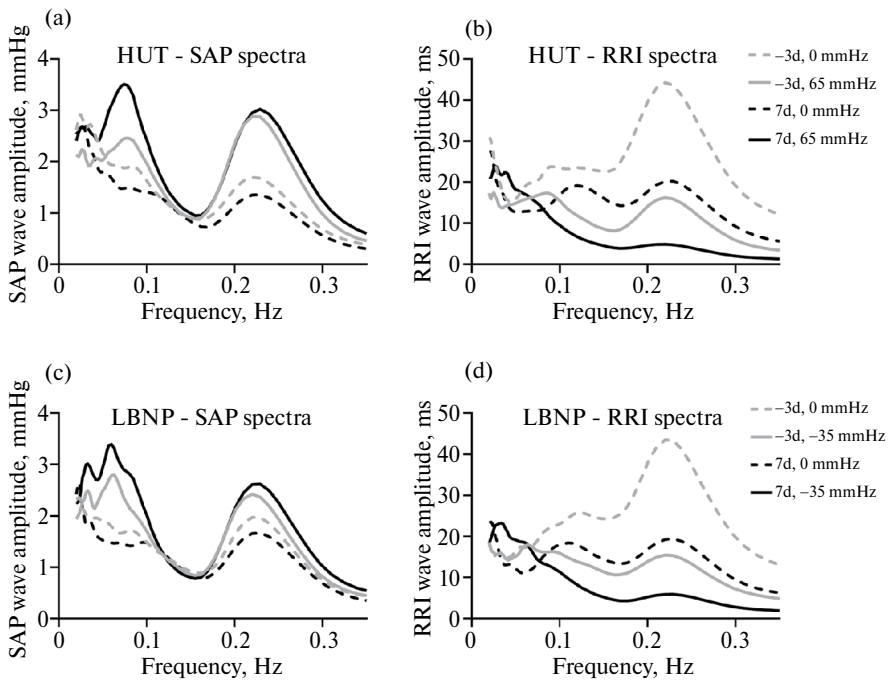


Рис. 3. Вейвлет-спектры систолического АД (SAP, a, c) и RR-интервала (RRI, b, d) в ортостатическом тесте (HUT, a, b) и в тесте ОДНТ (LBNP, c, d) за трое суток до (–3d, серые линии) и на 7-е сутки (7d, черные линии) “сухой” иммерсии. Пунктирные линии – до воздействия, сплошные линии – во время ортостаза или создания ОДНТ; каждая линия отражает результат усреднения спектров для группы испытуемых ($n = 9$).

мы анализировали изменения средней амплитуды колебаний исследуемых показателей в диапазоне от 0.05 до 0.13 Гц при проведении функциональных тестов до и после иммерсии.

В отсутствие воздействий амплитуда низкочастотных колебаний систолического АД не изменялась после иммерсии, тогда как амплитуда низкочастотных колебаний RR-интервала после иммерсии была статистически значима ниже, чем до иммерсии

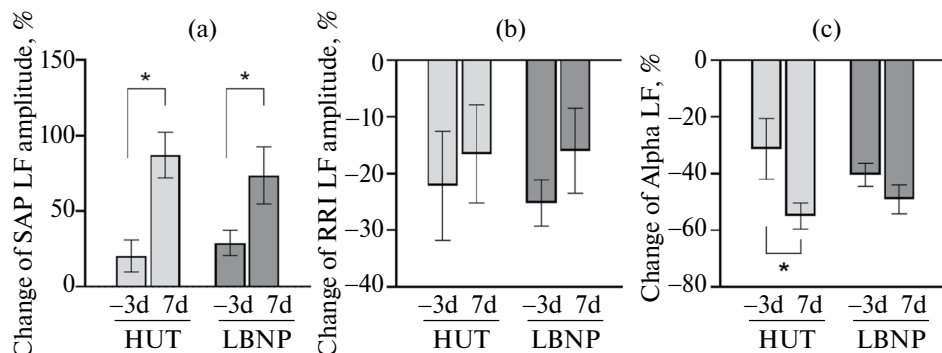


Рис. 4. Относительные изменения амплитуды колебаний систолического АД (SAP, а) и длительности RR-интервала (RRI, б), а также α -коэффициента (с) в низкочастотном диапазоне (LF, 0.05–0.13 Гц) в пассивном ортостатическом тесте (HUT) и тесте с созданием отрицательного давления на нижнюю часть тела (LBNP) до (–3d) и после (7d) “сухой” иммерсии. * – $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом Сидака).

(табл. 1). Соответственно, значение α -коэффициента в спокойном состоянии после иммерсии было сниженным (табл. 1).

Как при ортостазе, так и при ОДНТ наблюдалось повышение амплитуды низкочастотных колебаний систолического АД, причем ответы этого показателя на оба воздействия увеличились под влиянием иммерсии (рис. 3а, с, рис. 4а). Следует отметить, что после иммерсии прирост амплитуды низкочастотных колебаний систолического АД относительно ее среднего уровня до иммерсии при ортостазе был более значительным, чем в тесте ОДНТ (в 4.3 ± 0.8 раз по сравнению с 2.6 ± 0.7 раз, $p < 0.05$).

Амплитуда низкочастотных колебаний RR-интервала, напротив, снижалась при ортостазе и в тесте ОДНТ, степень снижения не различалась в двух тестах и не изменялась после иммерсии (рис. 3б, д; рис. 4б). α -коэффициент также уменьшался как при ОТ, так и при ОДНТ (рис. 4с). До иммерсии степень снижения этого показателя в двух тестах не различалась, однако после иммерсии при ортостазе наблюдалось более выраженное снижение α -коэффициента, тогда как при ОДНТ такого изменения не наблюдалось (рис. 4с). Таким образом, влияние 7-дневной “сухой” иммерсии на барорефлекторную регуляцию ритма сердца проявляется только при ортостазе, но не при создании ОДНТ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании впервые в экспериментах с участием одних и тех же испытуемых проведено сопоставление реакции гемодинамических показателей на ортостаз и ОДНТ после пребывания в “сухой” иммерсии. Эти два воздействия традиционно используются для тестирования регуляции сердечно-сосудистой системы в космической медицине, однако в предыдущих работах после полета или “сухой” иммерсии применяли лишь один из них [7, 10, 22, 23, 33, 34], или же тест ОДНТ выполнялся при ортостатическом положении тела человека [6].

Проведение нагрузочных тестов в интервальном режиме (с использованием повторных 3-минутных воздействий) позволило нам оценить быстрые изменения показателей гемодинамики, которые имеют преимущественно нервную природу при минимальном вовлечении более медленно реагирующих гормональных систем [19, 35]. Поскольку реакции всех исследуемых показателей хорошо воспроизводились от повтора к повтору (рис. 1), мы усредняли их, что способствовало повышению соотношения сигнал/

шум и выявлению закономерных реакций. Следует отметить, что короткие воздействия легче переносятся испытуемыми: снижается риск развития предсинкопального состояния, который сравнительно велик после пребывания в условиях “сухой” иммерсии [6, 15].

Уменьшение ударного объема в ортостатическом тесте и в тесте ОДНТ связано со снижением венозного возврата крови к сердцу в результате ее перераспределения в нижнюю часть тела [19]. После иммерсии фоновое значение ударного объема было сниженным, а его изменения в обоих тестах – более выраженными, что связано с уменьшением объема циркулирующей крови в условиях гравитационной разгрузки [6, 22]. Степень снижения ударного объема не различалась между тестами ни до, ни после иммерсии, что позволяет напрямую сравнивать изменения показателей системной гемодинамики и их вариабельности при двух воздействиях, сопоставимых по степени развития центральной гиповолемии.

Пребывание в условиях “сухой” иммерсии не оказало влияния на уровень систолического АД, но вызвало у испытуемых укорочение RR-интервала в состоянии покоя (горизонтальное положение тела без ОДНТ). Сходные изменения этих гемодинамических показателей наблюдались ранее после коротких космических полетов [10, 22], после 7-суточной “сухой” иммерсии [21], а также на 7-е сутки пребывания в условиях длительной (21-суточной) “сухой” иммерсии [13]. До иммерсии RR-интервал одинаково уменьшался в двух тестах, вместе с тем систолическое АД при ортостазе снижалось заметно меньше, чем при ОДНТ. Однако именно в тесте ОТ наблюдалось выраженное увеличение реакции систолического АД после “сухой” иммерсии, что может быть обусловлено изменением механизмов регуляции общего периферического сопротивления, с которыми взаимодействует барорефлекс во время ортостаза. Подробное обсуждение механизмов различного влияния ортостаза и ОДНТ на средний уровень АД приведено в нашей предыдущей работе [21].

Для оценки влияния гравитационной разгрузки на вариабельность систолического АД и RR-интервала во время кратковременного воздействия ортостаза или ОДНТ мы применяли вейвлет-анализ, который используется для изучения нестационарных процессов. Чувствительность кардиохронотропного барорефлекса оценивали по отношению амплитуды низкочастотных колебаний RR-интервала и систолического АД, этот показатель является аналогом а-коэффициента, который используется для оценки чувствительности “спонтанного” кардиохронотропного барорефлекса при спектральном анализе мощности колебаний этих показателей гемодинамики [8, 36].

Низкочастотные колебания систолического АД ожидаемо увеличивались как при ортостазе, так и при ОДНТ, поскольку при этих воздействиях происходит повышение вазомоторной симпатической активности, низкочастотная модуляция которой под действием барорефлекса и служит причиной колебаний артериального давления в низкочастотном диапазоне [1–4]. После “сухой” иммерсии изменения низкочастотных колебаний систолического АД при ОТ были намного более выраженными, сходное усиление колебаний систолического АД было описано ранее после антиортостатической гипокинезии (другая наземная модель гравитационной разгрузки) [3]. Известно, что пребывание в условиях реальной или моделируемой гравитационной разгрузки сопровождается значительным повышением активности симпатических постганглионарных волокон, иннервирующих сосуды скелетной мускулатуры как в покое, так и при проведении ОТ или теста ОДНТ [3, 15, 22, 23]. Такие изменения после гравитационной разгрузки связывают с уменьшением объема крови/ударного объема и, следовательно, с более выраженным изменением активности барорецепторов и кардиопульмонарных рецепторов при перераспределении крови в нижнюю часть тела [15, 22]. Вместе с тем следует отметить, что в нашей работе повышение низкочастотных колебаний систолического АД после “сухой иммерсии” было более выраженным в ОТ, чем в тесте ОДНТ, несмотря на одинаковое снижение ударного объема в этих тестах. Это предполагает,

что при ортостазе активация симпатической нервной системы может происходить за счет дополнительных механизмов, которые в меньшей степени или совсем не задействованы при ОДНТ: например, в результате более значительной разгрузки синокаротидных барорецепторов [24] или же активации вестибулосимпатического рефлекса [25]. По всей видимости, влияние этих факторов на амплитуду низкочастотных колебаний систолического АД не проявляется при умеренном уровне симпатической активности (до “сухой” иммерсии), но может становиться заметным в условиях, когда средний уровень симпатической активности заметно возрастает (после иммерсии).

Амплитуда низкочастотных колебаний RR-интервала снижалась при проведении ОТ и теста ОДНТ, но незначительно, что в целом согласуется с данными о небольшом снижении [37] или отсутствии изменений [4, 36] таких колебаний RR-интервала при центральной гиповолемии. Согласно “классической” точке зрения, низкочастотные колебания сердечного ритма представляют собой результат сочетанного влияния симпатического и парасимпатического отделов автономной нервной системы на сердце, причем при снижении АД и/или центрального объема крови вклад симпатических влияний растет, а парасимпатических, напротив, снижается [5, 38]. Однако более поздние данные свидетельствуют о том, что низкочастотные колебания сердечного ритма в основном имеют парасимпатическую природу [39–41], в таком случае основной причиной их подавления при ОТ или ОДНТ должно быть снижение вагусных кардиотропных влияний. После “сухой” иммерсии амплитуда низкочастотных колебаний RR-интервала в покое была ниже, чем до иммерсии, что согласуется с представлениями о подавлении вагусной регуляции сердечного ритма при гравитационной разгрузке [9]. Однако относительное снижение (в % от фонового уровня) амплитуды низкочастотных колебаний RR-интервала после иммерсии при обоих воздействиях статистически значимо не изменялось, что может быть связано со снижением фонового уровня этого показателя под действием гравитационной разгрузки.

Поскольку амплитуда низкочастотных колебаний RR-интервала уменьшалась, а низкочастотных колебаний систолического АД увеличивалась, их отношение – α -коэффициент, характеризующий чувствительность “спонтанного” сердечного барорефлекса, снижался как при ОТ, так и при ОДНТ. По данным литературы, характер изменения чувствительности сердечного барорефлекса при ортостазе зависит от метода ее оценки. Так, барорефлекторную зависимость RR-интервала от систолического АД можно оценить с использованием методики шейной камеры (механическое воздействие на барорецепторы каротидного синуса) или “Оксфордского метода” (оценка изменений RR-интервала, возникающих в ответ на изменения уровня АД при введении вазоактивных веществ) [27, 42]. Эта зависимость имеет сигмоидную форму, чувствительность барорефлекса оценивают по значению первой производной, максимум которой соответствует “центральной точке” (точке перегиба). С использованием такого подхода было показано, что чувствительность сердечного барорефлекса при ортостазе не изменяется или даже увеличивается [27, 42]. Однако функционирование “спонтанного” барорефлекса проявляется в области “рабочей точки”, абсцисса и ордината которой соответствуют средним уровням RR-интервала и систолического АД в текущем физиологическом состоянии и могут отличаться от координат “центральной точки”. В положении лежа “рабочая точка” барорефлекса близка к “центральной точке”. В условиях ортостазы происходит перенастройка работы сердечного барорефлекса: зависимость RR-интервала от систолического АД смещается вправо и немного вниз, а “рабочая точка” – к нижнему плато этой зависимости, то есть в область меньших значений первой производной, в связи с чем чувствительность барорефлекса оказывается сниженной [27]. Сходным образом снижение чувствительности “спонтанного” сердечного барорефлекса наблюдается при ОДНТ [28]. Таким образом, наши результаты согласуются с данными литературы о влиянии центральной гиповолемии на чувст-

вительность “спонтанного” сердечного барорефлекса, полученными с использованием различных методик ее оценки, включая вычисление α -коэффициента [6, 27, 28, 36, 42].

Известно, что после космического полета происходит нарушение барорефлекторной регуляции сердечного ритма, это было показано как с использованием методики шейной камеры [9, 10], так и при оценке чувствительности “спонтанного” сердечного барорефлекса [11]. Сходные изменения наблюдаются при моделировании условий гравитационной разгрузки в “сухой” иммерсии: нарушение барорефлекторной регуляции сердечного ритма при ортостазе наблюдается уже на 3-и сутки иммерсии [6] и сохраняется на 7-, 14- и 21-е сутки без видимых различий между первой и третьей неделями воздействия [13]. Таким образом, наши данные о более выраженном уменьшении α -коэффициента при ортостазе после гравитационной разгрузки в целом находятся в соответствии с данными литературы.

Интересно, что 7-суточная “сухая” иммерсия не оказала влияния на степень снижения α -коэффициента при создании ОДНТ. Мы полагаем, что неодинаковое влияние гравитационной разгрузки на барорефлекторную регуляцию сердечного ритма при ортостазе и ОДНТ связано с различным влиянием этих тестов на механизмы регуляции сердечно-сосудистой системы. Как было рассмотрено выше, в реакции на ортостаз задействовано большее количество регуляторных механизмов, активность которых может вызывать более значительное, по сравнению с ОДНТ, повышение эфферентной симпатической активности [24, 25]. Вероятно, это может приводить к более выраженному изменению зависимости RR-интервала от систолического АД, в том числе, к смещению “рабочей точки” сердечного барорефлекса еще ближе к нижнему плато и, соответственно, к дополнительному снижению оцениваемой таким способом чувствительности “спонтанного” барорефлекса.

Таким образом, влияние 7-дневной гравитационной разгрузки на барорефлекторную регуляцию ритма сердца проявляется только при ортостазе, но не при ОДНТ, что может объясняться взаимодействием барорефлекса с другими механизмами, задействованными только при ортостазе. Следует отметить, что ортостатический тест более физиологичен, поскольку в наземных условиях регуляторные системы организма человека адаптированы к ортостазу, а при гравитационной разгрузке такая адаптация постепенно утрачивается. В связи с этим проведение ортостатического теста может служить более информативным подходом к изучению механизмов послеполетной ортостатической неустойчивости и разработке методик ее коррекции.

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 Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 594 от 06.09.2021 г.). Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Программы фундаментальных научных исследований Института медико-биологических проблем РАН (тема 64.1) и при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00536). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Р.Ю.Ж., О.С.Т., А.С.Б., О.Л.В.), сбор данных (Р.Ю.Ж., Ю.С.С. и А.С.Б.), обработка данных (Р.Ю.Ж., О.С.Т., Ю.С.С., А.С.Б. и О.Л.В.), написание и редактирование статьи (Р.Ю.Ж., О.С.Т., Ю.С.С., А.С.Б. и О.Л.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Julien C* (2020) An update on the enigma of Mayer waves. *Cardiovasc Res* 116: E210–E211. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVZ327>
2. *Julien C* (2006) The enigma of Mayer waves: Facts and models. *Cardiovasc Res* 70: 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.11.008>
3. *Tanaka K, Nishimura N, Sato M, Kanikowska D, Shimizu Y, Inukai Y, Abe C, Iwata C, Morita H, Iwase S, Sugeno Y* (2013) Arterial pressure oscillation and muscle sympathetic nerve activity after 20 days of head-down bed rest. *Auton Neurosci Basic Clin* 177: 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.02.025>
4. *Furlan R, Porta A, Costa F, Tank J, Baker L, Schiavi R, Robertson D, Malliani A, Mosqueda-Garcia R* (2000) Oscillatory patterns in sympathetic neural discharge and cardiovascular variables during orthostatic stimulus. *Circulation* 101: 886–892. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.8.886>
5. *Elghozi J-L, Julien C* (2007) Sympathetic control of short-term heart rate variability and its pharmacological modulation. *Fundam Clin Pharmacol* 21: 337–347. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00502.x>
6. *de Abreu S, Amirova L, Murphy R, Wallace R, Twomey L, Gauquelin-Koch G, Raverot V, Larcher F, Custaud MA, Navasolava N* (2017) Multi-system deconditioning in 3-day dry immersion without daily raise. *Front Physiol* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00799>
7. *Baisch F, Beck L, Blomqvist G, Wolfram G, Drescher J, Rome JL, Drummer C* (2000) Cardiovascular response to lower body negative pressure stimulation before, during, and after space flight. *Eur J Clin Invest* 30: 1055–1065. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00750.x>
8. *Pagani M, Somers V, Furlan R, Dell'Orto S, Conway J, Baselli G, Cerutti S, Sleight P, Malliani A* (1988) Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 12: 600–610. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.12.6.600>
9. *Eckberg DL, Halliwill JR, Beightol LA, Brown TE, Taylor JA, Goble R* (2010) Human vagal baroreflex mechanisms in space. *J Physiol* 588: 1129–1138. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2009.186650>
10. *Fritsch-Yelle JM, Charles JB, Jones MM, Beightol LA, Eckberg DL* (1994) Spaceflight alters autonomic regulation of arterial pressure in humans. *J Appl Physiol* 77: 1776–1783. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.1994.77.4.1776>
11. *Hughson RL, Shoemaker JK, Blaber AP, Arbeille P, Greaves DK, Pereira-Junior PP, Xu D* (2012) Cardiovascular regulation during long-duration spaceflights to the International Space Station. *J Appl Physiol* 112: 719–727. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01196.2011>
12. *Tomilovskaya E, Shigueva T, Sayenko D, Rukavishnikov I, Kozlovskaya I* (2019) Dry immersion as a ground-based model of microgravity physiological effects. *Front Physiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00284>
13. *Borovik AS, Orlova EA, Tomilovskaya ES, Tarasova OS, Vinogradova OL* (2020) Phase coupling between baroreflex oscillations of blood pressure and heart rate changes in 21-day dry immersion. *Front Physiol* 11: 455. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00455>
14. *Navasolava NM, Custaud MA, Tomilovskaya ES, Larina IM, Mano T, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Kozlovskaya IB* (2011) Long-term dry immersion: Review and prospects. *Eur J Appl Physiol* 111: 1235–1260.
15. *Iwase S, Sugiyama Y, Miwa C, Kamiya A, Mano T, Ohira Y, Shenkman B, Egorov AI, Kozlovskaya IB* (2000) Effects of three days of dry immersion on muscle sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in humans. *J Auton Nerv Syst* 79: 156–164. [https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(99\)00076-4](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(99)00076-4)
16. *Vinogradova OL, Popov DV, Saenko IV, Kozlovskaya IB* (2002) Muscle transverse stiffness and venous compliance under conditions of simulated supportlessness. In: *Eur Space Agency (Special Publication) ESA SP*. 65–67.

17. *Eckberg DL* (2003) Bursting into space: alterations of sympathetic control by space travel. *Acta Physiol Scand* 177: 299–311.
<https://doi.org/10.1046/J.1365-201X.2003.01073.X>
18. *Fu Q, Shibata S, Hastings JL, Prasad A, Palmer MD, Levine BD* (2009) Evidence for unloading arterial baroreceptors during low levels of lower body negative pressure in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00184.2008>
19. *Goswami N, Blaber AP, Hinghofer-Szalkay H, Convertino VA* (2019) Lower Body Negative Pressure: Physiological Effects, Applications, and Implementation. *Physiol Rev* 99: 807–851.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00006.2018>
20. *Stewart JM* (2012) Mechanisms of sympathetic regulation in orthostatic intolerance. *J Appl Physiol* 113: 1659–1668.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00266.2012>
21. *Zhedyayev RY, Tarasova OS, Sharova AP, Tomilovskaya ES, Vinogradova OL, Borovik AS* (2023) Diverse effects of seven-day dry immersion on hemodynamic responses in head-up tilt and lower body negative pressure tests. *Acta Astronaut* 208: 105–110.
<https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2023.04.005>
22. *Levine BD, Pawelczyk JA, Ertl AC, Cox JF, Zuckerman JH, Diedrich A, Biaggioni I, Ray CA, Smith ML, Iwase S, Saito M, Sugiyama Y, Mano T, Zhang R, Iwasaki K, Lane LD, Buckley JC, Cooke WH, Baisch FJ, Robertson D, Eckberg DL, Blomqvist CG* (2002) Human muscle sympathetic neural and haemodynamic responses to tilt following spaceflight. *J Physiol* 538: 331–340.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2001.012575>
23. *Ertl AC, Diedrich A, Biaggioni I, Levine BD, Robertson RM, Cox JF, Zuckerman JH, Pawelczyk JA, Ray CA, Buckley JC, Lane LD, Shiavi R, Gaffney FA, Costa F, Holt C, Blomqvist CA, Eckberg DL, Baisch FJ, Robertson D* (2002) Human muscle sympathetic nerve activity and plasma noradrenaline kinetics in space. *J Physiol* 538: 321–329.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.012576>
24. *Smit AAJ, Timmers HJLM, Wieling W, Wagenaar M, Marres HAM, Lenders JWM, van Montfrans GA, Karemaker JM* (2002) Long-term effects of carotid sinus denervation on arterial blood pressure in humans. *Circulation* 105: 1329–1335
25. *Tanaka K, Abe C, Awazu C, Morita H* (2009) Vestibular system plays a significant role in arterial pressure control during head-up tilt in young subjects. *Auton Neurosci* 148: 90–96.
<https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2009.03.007>
26. *Harms MPM, Finucane C, Pérez-Denia L, Jurachek S, van Wijnen VK, Lipsitz LA, van Lieshout JJ, Wieling W* (2021) Systemic and cerebral circulatory adjustment within the first 60 s after active standing: An integrative physiological view. *Auton Neurosci* 231.
<https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2020.102756>
27. *Schwartz CE, Medow MS, Messer Z, Stewart JM* (2013) Spontaneous fluctuation indices of the cardiovagal baroreflex accurately measure the baroreflex sensitivity at the operating point during upright tilt. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 304: R1107–R1113.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00559.2012>
28. *Xiang L, Hinojosa-Laborde C, Ryan KL, Rickards CA, Convertino VA* (2018) Time course of compensatory physiological responses to central hypovolemia in high- and low-tolerant human subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315: R408–R416.
<https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00361.2017>
29. *Sugawara J, Tanabe T, Miyachi M, Yamamoto K, Takahashi K, Iemitsu M, Otsuki T, Homma S, Maeda S, Ajisaka R, Matsuda M* (2003) Non-invasive assessment of cardiac output during exercise in healthy young humans: Comparison between Modelflow method and Doppler echocardiography method. *Acta Physiol Scand* 179: 361–366.
<https://doi.org/10.1046/j.0001-6772.2003.01211.x>
30. *Kozlovskaya IB, Grigoriev AI, Stepanzov VI* (1995) Countermeasure of the negative effects of weightlessness on physical systems in long-term space flights. *Acta Astronaut* 36: 661–668.
[https://doi.org/10.1016/0094-5765\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0094-5765(95)00156-5)
31. *Negulyaev VO, Orlova EA, Sharova AP, Tarasova OS, Vinogradova OL, Borovik AS* (2021) Increase in the strength of synchronization between the baroreflex waves of blood pressure and heart rate due to the lower body negative pressure effect. *Hum Physiol* 47: 398–403.
<https://doi.org/10.1134/S0362119721040125>
32. *Lilly JM, Olhede SC* (2012) Generalized Morse Wavelets as a Superfamily of Analytic Wavelets. *IEEE Trans Signal Process* 60: 6036–6041.
<https://doi.org/10.1109/TSP.2012.2210890>
33. *Buckley JC, Lane LD, Levine BD, Watenpugh DE, Wright SJ, Moore WE, Gaffney FA, Blomqvist CG* (1996) Orthostatic intolerance after spaceflight. *J Appl Physiol* 81: 7–18.
<https://doi.org/10.1152/JAPPL.1996.81.1.7>

34. *Herault S, Fomina G, Alferova I, Kotovskaya A, Poliakov V, Arbeille P* (2000) Cardiac, arterial and venous adaptation to weightlessness during 6-month MIR spaceflights with and without thigh cuffs (bracelets). *Eur J Appl Physiol* 81: 384–390.
<https://doi.org/10.1007/s004210050058>
35. *Pump B, Gabrielsen A, Christensen NJ, Bie P, Bestle M, Norsk P* (1999) Mechanisms of inhibition of vasopressin release during moderate antiorthostatic posture change in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: 229–235.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.1.r229>
36. *Barbic F, Heusser K, Minonzio M, Shiffer D, Cairo B, Tank J, Jordan J, Diedrich A, Gauger P, Zamuner RA, Porta A, Furlan R* (2019) Effects of prolonged head-down bed rest on cardiac and vascular baroreceptor modulation and orthostatic tolerance in healthy individuals. *Front Physiol* 10: 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01061>
37. *Taylor JA, Eckberg DL* (1996) Fundamental relations between short-term RR interval and arterial pressure oscillations in humans. *Circulation* 93: 1527–1532.
38. *Camm A, Malik M, Bigger J* (1996) Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 17: 354–381.
39. *Yokobori Y, Nakane H, Uehara C, Nagasawa T, Mitsuyama S, Ohkawa K, Kario K, Ozawa S* (2023) Temporal relationships among changes in the RR-interval and the powers of the low- and high-frequency components of heart rate variability in normal subjects. *Physiol Rep* 11.
<https://doi.org/10.14814/PHY2.15557>
40. *Clemson PT, Hoag JB, Cooke WH, Eckberg DL, Stefanovska A* (2022) Beyond the baroreflex: a new measure of autonomic regulation based on the time-frequency assessment of variability, phase coherence and couplings. *Front Netw Physiol* 2.
<https://doi.org/10.3389/FNETP.2022.891604>
41. *Ogoh S, Yoshiga CC, Secher NH, Raven PB* (2006) Carotid-cardiac baroreflex function does not influence blood pressure regulation during head-up tilt in humans. *J Physiol Sci* 56: 227–233.
<https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP001306>
42. *Akimoto T, Sugawara J, Ichikawa D, Terada N, Fadel PJ, Ogoh S* (2011) Enhanced open-loop but not closed-loop cardiac baroreflex sensitivity during orthostatic stress in humans. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 301: R1591–R1598.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00347.2011>

The change in Baroreflex Regulation of Heart Rhythm after “Dry” Immersion Appears during Orthostasis, but not Lower Body Negative Pressure Test

**R. Yu. Zhedyaev^{a,*}, O. S. Tarasova^{a,b}, Yu. S. Semenov^a, A. S. Borovik^a,
and O. L. Vinogradova^a**

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

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

**e-mail:zhedyaev-r@mail.ru*

The ratio of low-frequency (LF, ~0.1 Hz) waves of RR interval duration (RRI) and systolic blood pressure (SAP) reflects the cardiac baroreflex sensitivity (BRS). Gravitational unloading (GU) may alter BRS during the passive orthostatic test (HUT) and lower body negative pressure (LBNP) test. Both effects cause blood redistribution to the lower body, but HUT is accompanied by greater unloading of sinocarotid baroreceptors than LBNP and activation of the vestibul sympathetic reflex but GU effects on BRS in these tests have not been directly compared previously. In this study we tested the hypothesis that the effect of “dry” immersion (DI, on-ground model of GU) on BRS in the same subjects will be more pronounced during HUT than during LBNP, which causes a comparable decrease in stroke volume. Nine healthy men participated in two test sessions (before and after 7-day DI) consisting of five 3-min HUT (65°) and five 3-min LBNP (–35 mmHg) with averaging the parameters in each test. Wavelet analysis was used to determine the amplitude of the RRI and SAP waves in the range of 0.05–0.13 Hz. The amplitude of

LF waves of SAP increased in both tests, after DI - more significantly in HUT. The amplitude of LF RRI waves decreased in the two tests; the degree of decrease did not differ between tests and did not change under the influence of DI. The α -coefficient (the ratio of the amplitudes of RRI and SAP LF waves) decreased equally in the two tests before DI, but after DI, the degree of α -coefficient reduction increased in HUT test but did not change in LBNP test. Thus, the effect of DI on BRS is evident in HUT, but not in LBNP, which may be explained by the more pronounced influence of HUT on the mechanisms of neural control of heart rhythm.

Keywords: baroreflex, gravitational unloading, systolic blood pressure, RR-interval duration, α -coefficient

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*
И *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS*
НА РАЗМЕР ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС С СИНДРОМОМ
СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА**

© 2024 г. Ю. Ю. Борщев^{1,3}, Д. Л. Сонин^{1,2}, И. Ю. Буровенко^{1,*},
Е. С. Процак¹, В. Ю. Борщев², О.В. Борщева¹, М. М. Галагудза^{1,2}

¹Институт экспериментальной медицины, “Национальный медицинский
исследовательский центр им. В.А. Алмазова” Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

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

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: burovenko.inessa@gmail.com

Поступила в редакцию 21.09.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

В рамках концепции оси “кишечник-сердце” появляются новые работы, подтверждающие эффективность применения пробиотических штаммов для повышения устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП) в условиях коморбидности. Остается открытым вопрос о том, является ли присутствие живых пробиотических бактерий необходимым условием реализации их кардиопротективного эффекта. Целью работы стало определение выраженности кардиопротективного эффекта живых и инактивированных пастеризацией пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) у крыс с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО). Оценка устойчивости миокарда к ИРП проводилась на модели окклюзии-реперфузии левой коронарной артерии *in vivo*. Эксперименты выполнены на самцах крыс стока Wistar с улучшенным конвенциональным статусом, с висцеральным ожирением, химически индуцированным колитом и антибиотик-индуцированным дисбиозом, что в совокупности обеспечивало формирование ССВО на фоне перорального введения живых и инактивированных пробиотических бактерий. Размер инфаркта в группе с моделированием ССВО был значимо выше, чем в контрольной группе (43% (39; 44) и 31% (28; 35), ($p < 0.05$). В группе ССВО с введением инактивированных пробиотических бактерий размер инфаркта составлял 45% (37; 48), не отличался от группы ССВО и был значимо выше, чем в контроле ($p < 0.05$). При этом размер инфаркта в группе с введением живых пробиотиков не отличался от такового в контроле и составлял 32% (28; 37). Делается заключение, что у животных с ССВО имеются специфические особен-

ности действия живых и инактивированных пробиотических микроорганизмов с сохранением кардиопротективного эффекта при использовании живых лакто- и бифидобактерий.

Ключевые слова: миокард, ишемия-реперфузия, кардиопротекция, полиморбидность, синдром системного воспалительного ответа, лейкоциты, цитокины, пробиотики

DOI: 10.31857/S0869813924010062, **EDN:** WPWNKV

ВВЕДЕНИЕ

Кардиопротективные воздействия в широком смысле включают различные фармакологические и нефармакологические стимулы, повышающие устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП) и уменьшающие размер инфаркта миокарда при обратимой ишемии [1]. В экспериментальных исследованиях описаны сотни кардиопротективных воздействий, обеспечивающих уменьшение ИРП миокарда при применении до наступления длительной ишемии, во время ее индукции и в периоде реперфузии. В то же время ни один из препаратов, продемонстрировавших в эксперименте прямой инфаркт-лимитирующий эффект, не подтвердил свою эффективность в клинических исследованиях и не вошел в клинические рекомендации по ведению пациентов с острым коронарным синдромом [2, 3]. Учитывая, что в период с 1993 по 2019 гг. распространенность сердечно-сосудистых заболеваний в мире увеличилась практически в 2 раза [4], продолжение работ по поиску новых безопасных и эффективных способов повышения устойчивости миокарда к ИРП представляет собой актуальную задачу.

В последние годы интенсивно изучаются различные аспекты взаимодействия кишечной микробиоты с макроорганизмом, причем указанные исследования касаются как физиологических условий, так и роли микробиоты в развитии разнообразных заболеваний [5]. Неудивительно, что в рамках набирающей популярность концепции оси “кишечник-сердце” появились первые работы, посвященные влиянию изменений состава кишечной микробиоты на устойчивость миокарда к ИРП [6]. Так, Lam и соавт. показали, что внутрижелудочное введение крысам ванкомицина и пробиотического штамма *L. plantarum* 299V сопровождалось уменьшением размера инфаркта на 27 и 29% соответственно [7]. Danilo и соавт. продемонстрировали, что введение *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 420 (B420) вызывало уменьшение размера инфаркта у мышей с кишечным дисбиозом, индуцированным высокожировой диетой [8]. Изучение эффективности новых кардиопротективных воздействий в условиях коморбидности отвечает требованиям современных рекомендаций и повышает трансляционный потенциал полученных результатов. В нашем исследовании было показано, что внутрижелудочное введение крысам с ожирением, химически индуцированным колитом и антибиотик-индуцированным дисбиозом смеси лиофилизированных *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* в количестве 1.2×10^8 КОЕ/животное в течение 15 дней приводило к значимому уменьшению размера инфаркта миокарда [9]. Важно отметить, что размер инфаркта при этом был значимо выше в группе животных с индуцированной патологией по сравнению со здоровыми животными, а пробиотическая терапия снижала размер инфаркта до значения, не отличавшегося от такового в группе здоровых контрольных животных. Существенный интерес представляют молекулярные механизмы пробиотик-индуцированной кардиопротекции. На сегодняшний день мы не располагаем убедительными данными по этому вопросу, поскольку во всех проведенных исследованиях авторами были отмечены только ассоциации инфаркт-лимитирующего эффекта с уровнями гормонов, цитокинов и микробных метаболитов в плазме крови [10].

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что все исследования, в которых был показан кардиопротективный эффект тех или иных пробиотиков, были выполнены

с применением препаратов, содержащих живые бактерии. В то же время есть основания полагать, что кардиопротективный ответ, прямо или опосредованно индуцированный пробиотиками, может запускаться молекулами микробного происхождения, относящимися к классу патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, которые содержатся в инактивированной культуре микроорганизмов. Другими словами, реализация пробиотик-индуцированной кардиопротекции может не требовать присутствия в препарате живых микроорганизмов. Подтверждение возможности использования инактивированных пробиотиков (или метабиотиков) для индукции кардиопротекции может способствовать повышению безопасности применения препаратов у пожилых полиморбидных пациентов и облегчает поиск молекулярных эффекторов, являющихся триггерами кардиопротекции. В связи с этим в настоящей работе была поставлена задача сравнить выраженность кардиопротективного эффекта живых и инактивированных путем пастеризации пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) у крыс с висцеральным ожирением, химически индуцированным колитом и антибиотик-индуцированным дисбиозом (АИД). Указанные воздействия в совокупности отвечали критериям синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). Кардиотропные эффекты живых и инактивированных штаммов сопоставляли с изменениями уровней некоторых цитокинов и гормонов в плазме крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на самцах крыс стока Wistar с улучшенным конвенциональным статусом, массой 320 ± 20 г. Моделирование ССВО подробно описано ранее [11]. Животные случайным образом распределялись в одну из четырех групп ($n = 10$ в каждой группе) (рис.1): 1) контроль (КТР) – крысы получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*; 2) синдром системного воспалительного ответа (ССВО) – животным с первичным висцеральным ожирением (ПВО), индуцированным диетой с повышенным содержанием жиров и углеводов, под комбинированным наркозом (золетил 20 мг/кг в/м, изофлуран 1.5%) однократно ректально вводили 1 мл смеси 3%-ного раствора уксусной кислоты и 3%-ного этанола, индуцируя острый колит. Начиная с этого дня, этим же животным внутривенно вводили смесь антимикробных препаратов (АМП) (амоксциллин, метронидазол и кларитромицин). А именно, вводили 1 мл раствора АМП в суточной дозе по 15 мг каждого АМП на крысу в течение 3 дней и 1 мл физиологического раствора (ФР) в течение 8 дней; 3) ССВО + ЛБС – крысам, прошедшим процедуры, описанные для предыдущей группы, вместо 1 мл ФР вводили 1 мл раствора смеси пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), в дозе 10×8 КОЕ на одно животное; 4) ССВО + ИНП – крысам данной группы вводили смесь пробиотических штаммов после пастеризации. В остальном все процедуры были аналогичны описанным для группы ССВО + ЛБС.

Ишемию миокарда в течение 30 мин. с последующей реперфузией в течение 120 мин. моделировали путем обратимой окклюзии левой коронарной артерии (ЛКА) в условиях искусственной вентиляции легких и ингаляционной анестезии изофлураном (2–3%). В ходе эксперимента регистрировали ЭКГ, артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Также вычисляли двойное произведение (ДП) по формуле $ДП = АД \times ЧСС$. Оценку размера зоны риска и инфаркта миокарда производили дифференциальным индикаторным методом путем последовательного окрашивания синим Эванса и трифенилтетразолием хлоридом (ТТС). Данные о размерах зоны риска (синий Эванс – негативные участки) и зоны инфаркта (ТТС-негативные участки) приводили в виде отношения объема зоны риска (ЗР) к общему объему левого желудочка, а также в виде отношения объема зоны инфаркта (ЗИ) к объему зоны риска (в %).

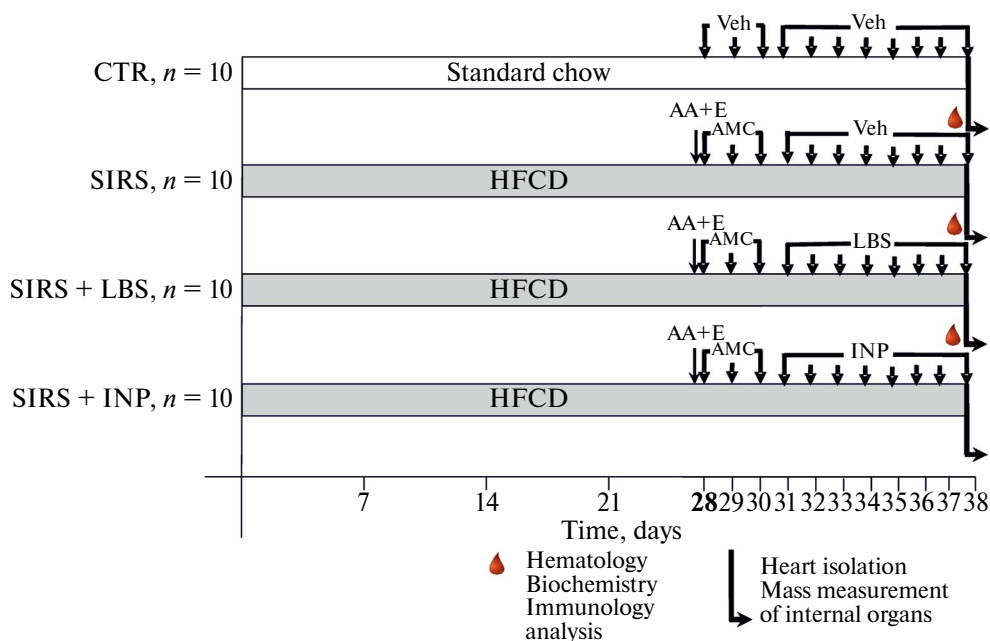


Рис. 1. Дизайн эксперимента. CTR – контроль; SIRS (CCBO) – синдром системного воспалительного ответа; SIRS + LBS – CCBO и смесь LA-5 и BB-12; SIRS + INP – CCBO и инактивированный пробиотик. AA + E – смесь 3%-ного раствора уксусной кислоты и 3%-ного этанола. AMC – смесь антимикробных препаратов, HFCD – диета с повышенным содержанием жиров и углеводов, Veh – физиологический раствор. Детали эксперимента подробно описаны в тексте.

За день до завершения опыта у крыс под краткосрочным наркозом (изофлуран 1.5%) брали цельную кровь (1.5 мл) из большой подкожной вены для анализа гематологических и иммунологических параметров. Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, URIT Medical Electronic, Китай). Анализ лейкоцитов в крови в данной работе проведен на трех популяциях лейкоцитов – LYM, MID, GRAN. Уровень липополисахарида (ЛПС), трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$), интерферона- γ (ИФН- γ), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-2 (ИЛ-2), лептина, кортизола и лактоферрина оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай).

Посмертно вычисляли массовые коэффициенты (МК) слепой кишки как характеристики АИД; селезенки как индикатора иммуногенеза; депозитов висцерального жира как показателя ПВО. На протяжении всего эксперимента, ежедневно с 9 до 10 ч, проводили оценку клинического статуса животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программного пакета STATISTICA 12.0. Статистический анализ дискретных значений проводился с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса для обнаружения статистически значимых различий, с последующим апостериорным сравнением с использованием *U*-критерия Манна-Уитни. В таблицах приведены значения медианы (Me), а также нижнего и верхнего квартиля (25;75%). Гемодинамические показатели в динамике представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

Таблица 1. Массовые коэффициенты органов, Ме (25%;75%)

Группа Орган	КТР	ССВО	ССВО + ЛБС	ССВО + ИНП
Слепая кишка	1.9 (1.8; 2.1)	5.8 (5.4; 6.0)*↑	5.0 (4.3; 5.3)*↑	4.7 (4.5; 5.4)*↑
Печень	3.0 (2.9; 3.1)	2.9 (2.8; 3.0)	2.8 (2.7; 3.0)	2.8 (2.7; 3.0)
Селезенка	0.17 (0.16; 0.19)	0.22 (0.20; 0.23) *↑	0.17 (0.16; 0.19)	0.18 (0.16; 0.20)
Почки	0.62 (0.61; 0.65)	0.66 (0.64; 0.67)	0.70 (0.67; 0.72)*↑	0.64 (0.62; 0.68)
Висцеральный жир	2.11 (1.91; 2.12)	0.89 (0.71; 1.10) *↓	1.28 (0.99; 1.33)*↓	1.63 (1.32; 1.96)

* – $p < 0.05$ по отношению к КТР (U критерий). ↑ – увеличение показателя, ↓ – уменьшение показателя. Забор органов с 13 до 15 ч. КТР – контроль, ССВО – синдром системной воспалительной реакции, ССВО + ЛБС – ССВО и смесь LA-5 и BV-12, ССВО + ИНП – ССВО и инактивированные пробиотики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела и внутренних органов, потребление корма и воды

Масса тела крыс в группе КТР в течение всего периода наблюдения в среднем увеличивалась на 0.57 ± 0.05 г/сутки, тогда как в группах ССВО, ССВО + ЛБС и ССВО + ИНП наблюдали уменьшение массы тела животных на 1.61 ± 0.91 , 1.38 ± 0.81 и 0.78 ± 0.49 г/сутки соответственно ($p < 0.05$ в сравнении с группой КТР для всех групп). Потребление воды за этот же период из расчета на 100 г массы тела в группе КТР составило 10.9 ± 1.3 мл/сутки, что существенно меньше показателей в остальных группах (15.4 ± 2.1 , 13.7 ± 2.2 и 14.7 ± 0.5 мл/сутки для групп ССВО, ССВО + ЛБС, ССВО + ИНП соответственно, $p < 0.05$ для всех групп). Потребление корма составило в группах ССВО, ССВО + ЛБС и ССВО + ИНП 2.3 ± 0.9 , 1.9 ± 0.5 и 2.3 ± 0.3 г/сутки соответственно и уменьшилось в 2.3, 2.8 и 2.3 раза ($p < 0.05$), по сравнению с группой КТР (5.3 ± 0.5 г/сутки). Отмечено увеличение МК селезенки в группе ССВО на 29% ($p < 0.05$) по отношению к КТР. В группе ССВО + ЛБС, в сравнении с КТР, МК почек увеличился на 13% ($p < 0.05$). Значимое увеличение массы слепой кишки наблюдали в группах ССВО, ССВО + ЛБС и ССВО + ИНП ($p < 0.05$ по сравнению с КТР). МК депозитов висцерального жира в группе ССВО был меньше, чем в КТР на 138% ($p < 0.05$), а в группе ССВО + ЛБС – на 64% ($p < 0.05$) (табл. 1).

Клинический анализ крови

В группе ССВО показано увеличение общего числа лейкоцитов (WBC) на 45%, причем основной вклад внесла популяция гранулоцитов (GRAN), с увеличением их количества на 111% по отношению к группе КТР ($p < 0.05$), с уменьшением популяции средних лейкоцитов (MID) на 40% ($p < 0.05$) и лимфоцитов (LYM) на 36% ($p < 0.05$). В группе ССВО+ЛБС число WBC увеличилось на 30%, а GRAN – на 89%, при уменьшении MID на 75 и LYM на 36% по отношению к КТР ($p < 0.05$). В группе ССВО + ИНП по отношению к КТР произошло увеличение WBC на 23% и GRAN на 71% ($p < 0.05$), а количество LYM и MID уменьшилось на 36 и 133% ($p < 0.05$) соответственно. В группах ССВО и ССВО + ИНП по отношению к КТР увеличилось число тромбоцитов на 21 и 43% соответственно ($p < 0.05$). Значимых изменений числа эритроцитов в подопытных группах по отношению к контролю не отмечено (табл. 2).

Таблица 2. Гематологические показатели крыс, Ме (25%; 75%)

Группа Параметр	КТР	ССВО	ССВО + ЛБС	ССВО + ИНП
WBC 10 ⁹ /L	5.3 (5.1; 6.0)	7.7 (6.3; 9.9)*↑	6.9 (5.1; 9.2)*↑	6.5 (5.1; 9.9)*↑
LYM 10 ⁹ /L	1.9 (1.3; 2.2)	1.4 (0.8; 2.1)*↓	1.4 (0.9; 1.6)*↓	1.4 (0.9; 2.2)*↓
MID 10 ⁹ /L	0.7 (0.5; 0.8)	0.5 (0.4; 0.7)*↓	0.4 (0.3; 0.5)*↓	0.3 (0.2; 0.4)*↓
GRAN 10 ⁹ /L	2.8 (2.4; 3.2)	5.9 (5.1; 6.3)*↑	5.3 (4.6; 5.8)*↑	4.8 (4.3; 6.1)*↑
RBC 10 ¹² /L	6.3 (6.1; 7.3)	6.6 (6.0; 6.7)	6.5 (5.9; 6.8)	6.8 (6.5; 7.4)
PLT 10 ⁹ /L	545 (502; 566)	662 (584; 694)*↑	618 (605; 655)	782 (760; 799)*↑

* – $p < 0.05$ по отношению к КТР (U критерий). Забор крови с 13 до 15 ч. КТР – контроль, ССВО – синдром системной воспалительной реакции, СВО + ЛБС – ССВО и смесь LA-5 и ВВ-12, ССВО + ИНП – ССВО и инактивированный пробиотик.

Таблица 3. Содержание цитокинов, гормонов, лактоферрина и липополисахарида в плазме крови, Ме (25%; 75%)

Группа Аналит	КТР	ССВО	ССВО + ЛБС	ССВО + ИНП
ИЛ-1β, пг/мл	5.2 (3.8; 6.8)	11.1 (9.4; 13.7)*↑	5.5 (5.0; 6.8)#↓	6.1 (5.6; 7.6)#↓
ИЛ-2, пг/мл	4.68 (3.21; 6.02)	9.13 (8.07; 9.85)*↑	4.11 (2.98; 5.58)#↓	7.34(5.66; 8.92)*↑
Кортизол, пг/мл	301 (265; 350)	364 (244; 437)	293 (238; 369)	229 (188; 289)#↓
Лактоферрин, пг/мл	81 (48; 87)	99 (86; 120)*↑	58 (37; 55)	102 (82; 125)*↑
ИФН-γ, пг/мл	24 (21; 28)	124 (35; 191)*↑	174 (113; 217)*↑	97 (40; 124)
Лептин, пг/мл	3.10 (2.71; 3.75)	6.30 (6.19; 8.46)*↑	3.45 (3.22; 4.53)#↓	2.76 (2.65; 3.20)#↓
ФНО-α, пг/мл	14 (11; 15)	23 (19; 30)*↑	16 (14; 22)	17 (14; 21)
ТФР-β1, пг/мл	3.08 (2.26; 3.67)	6.94 (4.57; 9.06)*↑	5.54 (3.06; 7.62)	4.48 (3.49; 5.58)
ЛПС, пг/мл	42 (30; 55)	133 (91; 166)*↑	31 (26; 34)#↓	37 (24 ;49)#↓

* – $p < 0.05$ по отношению к группе КТР, # – $p < 0.05$ по отношению к группе ССВО. Забор крови с 13 до 15 ч. КТР – контроль, ССВО – синдром системной воспалительной реакции, СВО + ЛБС – ССВО и смесь LA-5 и ВВ-12, ССВО + ИНП – ССВО и инактивированный пробиотик.

Уровень маркеров воспаления и гормонов в плазме крови

В табл. 3 показаны результаты оценки уровня маркеров воспаления и гормонов в плазме крови. Отмечено значимое увеличение концентрации ЛПС в крови животных в группе ССВО по отношению к контролю (на 217%, $p < 0.05$). Введение живым животным живых и инактивированных пробиотиков сопровождалось значимым уменьшением уровня ЛПС в крови по сравнению с группой ССВО. Уровень ТФР-β1 в крови в группах ССВО, ССВО + ЛБС и ССВО + ИНП увеличился на 125, 80 и 46% ($p <$

Таблица 4. Гемодинамические показатели ($Me \pm SD$)

Группа	Показатели гемодинамики	Исх. сост.	Реперфузия					
			5 мин	30 мин	40 мин	60 мин	90 мин	120 мин
КТР	АД	80 ± 12	76 ± 12	87 ± 12	81 ± 11	81 ± 8	80 ± 11	82 ± 10
	ЧСС	384 ± 44	384 ± 45	385 ± 26	384 ± 25	392 ± 23	372 ± 23	386 ± 28
ССВО	АД	81 ± 15	74 ± 14	79 ± 9	76 ± 6	75 ± 12	78 ± 9	79 ± 11
	ЧСС	360 ± 26	336 ± 35	360 ± 16	348 ± 24	348 ± 24	348 ± 20	364 ± 16
ССВО + ЛБС	АД	85 ± 12	82 ± 6	81 ± 14	87 ± 12	86 ± 19	82 ± 12	84 ± 9
	ЧСС	351 ± 27	356 ± 27	360 ± 24	371 ± 22	384 ± 26	378 ± 30	376 ± 29
ССВО + ИНП	АД	84 ± 19	78 ± 12	79 ± 8	79 ± 13	79 ± 13	78 ± 13	77 ± 9
	ЧСС	360 ± 11	348 ± 29	351 ± 27	360 ± 29	357 ± 30	354 ± 31	361 ± 28

Исследование проводилось с 10 до 13 ч. КТР – контроль, ССВО – синдром системной воспалительной реакции, СВО + ЛБС – ССВО и смесь LA-5 и ВВ-12, ССВО + ИНП – ССВО и инактивированный пробиотик.

0.05) соответственно. Значение ФНО- α было больше на 64% в группе ССВО в сравнении с КТР ($p < 0.05$). Концентрация ИЛ-1 β была больше на 113% в группе ССВО ($p < 0.05$ против КТР). Показатели ИЛ-2 в группах ССВО и ССВО + ИНП по отношению к КТР увеличились на 95 и 56% соответственно ($p < 0.05$). При этом уровень ИЛ-2 в группе ССВО + ЛБС был значимо ниже, чем в группе ССВО. В группе ССВО отмечено увеличение концентрации лептина на 103% ($p < 0.05$). При этом уровень лептина в группах ССВО + ЛБС и ССВО + ИНП был значимо ниже, чем в группе ССВО, и не отличался от контроля. Уровень интерферона в группах ССВО, ССВО + ЛБС и ССВО + ИНП по отношению к КТР был выше на 416, 625 и 305% соответственно ($p < 0.05$).

Гемодинамические параметры, размер зоны риска и зоны инфаркта

Значения АД и ЧСС в экспериментальных группах в исходном состоянии, а также в ходе периода реперфузии представлены в табл. 4. ДП в группе ССВО + ЛБС на протяжении всего периода наблюдения статистически не отличалось от контроля, в отличие от групп ССВО и ССВО + ИНП, в которых ДП в определенных точках реперфузионного периода было значимо меньше, чем в КТР (рис. 2). Размер инфаркта в группе с моделированием ССВО был значимо выше, чем в контрольной группе 43% (39; 44) и 31% (28; 35), $p < 0.05$ (рис. 2). В группе ССВО с введением инактивированных пробиотических бактерий размер инфаркта составлял 45% (37; 48), не отличался от группы ССВО и был значимо выше, чем в контроле ($p < 0.05$). При этом размер инфаркта в группе с введением живых пробиотиков не отличался от такового в контроле и составлял 32% (28; 37). Во всех группах зона риска не имела существенных отличий (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные нами ранее экспериментальные исследования на модели ССВО у крыс показали значимое увеличение размера инфаркта по сравнению со здоровыми

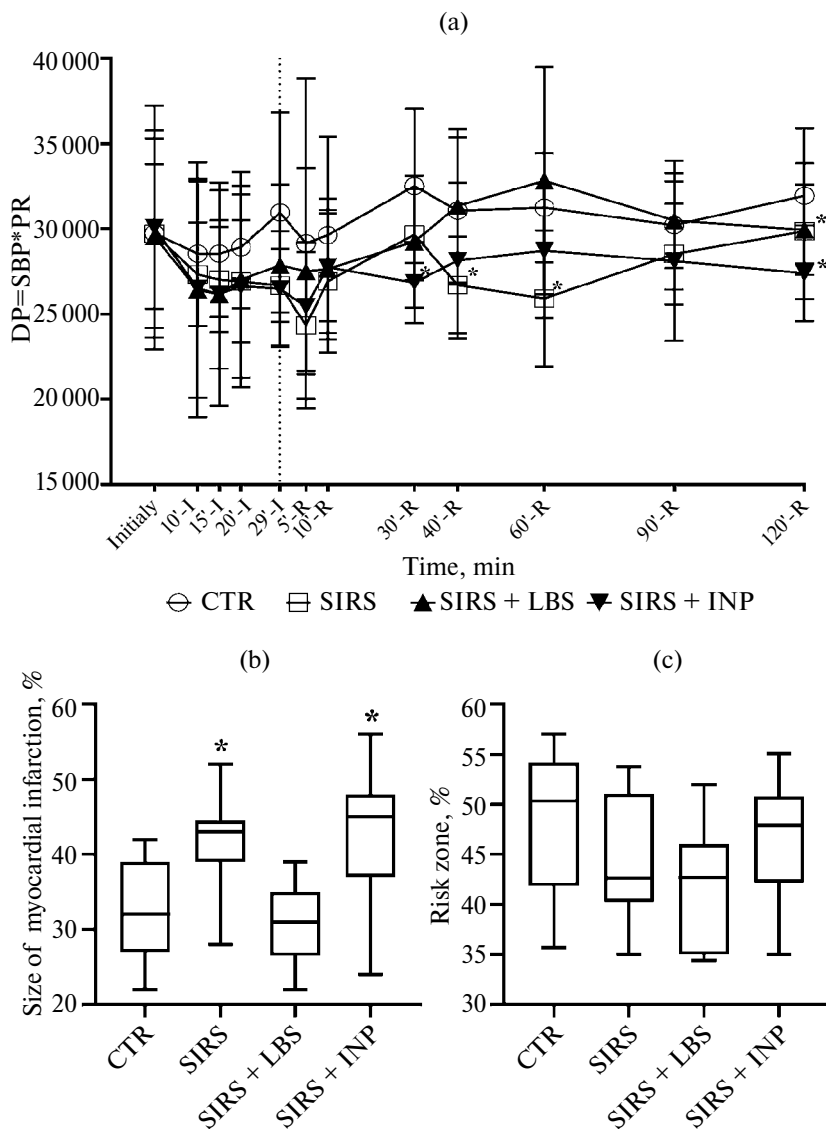


Рис. 2. Двойное произведение ЧСС и АД (а), *Mean* $\pm$ *SD*, размер инфаркта миокарда (б) и размер зоны риска (с), %, Ме [25%; 75%]. * – $p < 0.05$ по отношению к группе КТР. КТР – контроль; ССВО – синдром системного воспалительного ответа; ССВО + ЛБС – ССВО и смесь *LA-5* и *BB-12*; ССВО + ИНП – ССВО и инактивированный пробиотик.

животными на модели изолированного сердца с возможностью уменьшения размера инфаркта с помощью пробиотиков [8]. В настоящей работе показано, что введение смеси живых пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) животным с ССВО сопровождалось уменьшением размера инфаркта до значения, которое не отличалось от такового в контроле. При этом было продемонстрировано отсутствие кардиопротективного эффекта в группе с введением инактивированного пробиотика, что требует детального анализа для дальнейшего определения молекулярных механизмов выявленного феномена. Следует отметить, что

рецепторные механизмы кардиопротекции, опосредованной изменениями состава кишечной микробиоты, в настоящее время изучены недостаточно. Тем не менее данные литературы позволяют выдвинуть на роль кардиопротективных лигандов некоторые молекулы, уровень которых в крови прямо или опосредованно связан с активностью кишечной микрофлоры. Эти сигнальные молекулы целесообразно разделить на образующиеся клетками макроорганизма в результате стимуляции со стороны продуктов кишечных бактерий и образующиеся ферментативным путем в результате метаболической активности самой микробиоты.

Пробиотики — это живые культуры, аналогичные естественной микрофлоре, тогда как метабитами являются структурные компоненты пробиотических микроорганизмов и/или их метаболиты, а также сигнальные молекулы с определенной химической структурой, которые способны оптимизировать специфичные для организма хозяина физиологические функции, регуляторные, метаболические и/или поведенческие реакции, связанные с деятельностью индигенной микробиоты организма хозяина [12]. В отличие от пробиотических микробов метабитами не вступают в антагонистические взаимоотношения с собственной микробиотой пациента и начинают действовать “здесь и сейчас” [13]. Терапия метабитами представляется более физиологичной, поскольку осуществляет регулирующее влияние на симбионтные отношения хозяина и его микрофлоры и теоретически способна сводить к минимуму возможность побочных эффектов проводимого лечения от воздействия живых пробиотических микроорганизмов [14]. Однако в дискуссии об эффективности и безопасности метабитиков по сравнению с пробиотиками необходимо учитывать не только данные об их влиянии на относительно здоровый организм с сохраненной барьерной функцией ЖКТ, но и влияние в условиях полиморбидных состояний, связанных с нарушениями функции пищеварительной, иммунной и сердечно-сосудистой системы.

Валидность использованной нами модели ССВО была подтверждена значимым повышением количества лейкоцитов в крови за счет нейтрофилов с сопутствующим уменьшением мононуклеаров. В настоящей работе обращает на себя внимание синергичное увеличение уровня провоспалительных цитокинов, ЛПС и лактоферрина в группе ССВО с частичной или полной нормализацией их уровней в группах с пробиотической коррекцией. Клетками-продуцентами ФНО- α служат лейкоциты [15, 16] и другие типы клеток, включая кардиомиоциты, стромальные клетки костного мозга, клетки нейроглии и адипоциты [15, 17]. Наличие обширного воспаления в сердце мышей после перевязки коронарной артерии было показано ранее в сочетании с увеличением уровней экспрессии мРНК ФНО- α , MCP-1, IL-6 и IL-1 β , а также уровней белков IL-6 и ФНО- α , с максимумом через 1 неделю после лигирования левой коронарной артерии и последующим снижением [18]. ФНО- α может оказывать защитное эндозологическое действие, так как способствует фагоцитозу патогенных микроорганизмов активированными нейтрофилами и макрофагами. С другой стороны, ФНО- α подавляет активность липопротеиновой липазы в адипоцитах, что приводит к нарушению липогенеза. Этот эффект может способствовать истощению организма — кахексии [19], что подтверждается наибольшим снижением массы тела животных в группе ССВО.

Повышение проницаемости эпителиальной выстилки кишечника при воспалении сопровождается бактериальной транслокацией, т.е. интенсификацией переноса бактерий и патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) в собственную пластинку слизи, где происходит распознавание ПАМП различными типами паттерн-распознающих рецепторов, локализованных как на клетках врожденного иммунитета, так и на эпителиоцитах. Активация клеток приводит к NF κ B-зависимой экспрессии многих генов, участвующих в воспалении, включая адгезионные молекулы, белки острой фазы и провоспалительные цитокины. Применительно к вопросу о кардиопротекции следует подчеркнуть, что значительное повышение концентрации в крови таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- α , ИЛ-1 β и др. сопровождается

индукцией апоптоза кардиомиоцитов, угнетением сократительной функции миокарда, усилением хемотаксиса и активацией лейкоцитов в зоне ишемического повреждения. В экспериментальных исследованиях убедительно показаны кардиопротективные эффекты антицитокиновых препаратов. Таким образом, любые изменения состава кишечной микробиоты, способствующие нормализации проницаемости эпителия и уменьшению проявлений системного и локального воспаления, имеют кардиопротективную направленность.

Циркулирующий лептин участвует в регуляции энергетического гомеостаза и обмена веществ. На животных-биомоделях с генетически обусловленным дефицитом лептина было показано, что лептин также может регулировать нейроэндокринные и иммунные функции организма [20]. Лептин повышает концентрацию таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- α и ИЛ-6, формируя инсулинорезистентность и компенсаторную гиперинсулинемию и, таким образом, увеличивает риск развития сахарного диабета 2-го типа [21]. В нашей работе в группе ССВО отмечено существенное увеличение показателя лептина по отношению к контролю при отсутствии этого эффекта в группах с введением живых и инактивированных пробиотиков. С учетом известной связи гиперлептинемии и ожирения [22] наличие гиперлептинемии в группе ССВО является парадоксальным, т.к. именно в этой группе отмечены минимальные показатели МК висцерального жира. В литературе обсуждается роль лептина в развитии инфаркта миокарда и его осложнений; высокий уровень лептина в плазме крови рассматривают как предиктор развития данной патологии независимо от индекса массы тела [23]. Кроме того, показано, что уровень лептина повышен у пациентов с ишемической болезнью сердца и сердечной недостаточностью [24], а хроническая гиперлептинемия в эксперименте ассоциирована с увеличением размера инфаркта и системным воспалением [25]. Ранее уже было показано, что снижение концентрации лептина в плазме крови может являться механизмом кардиопротекции при модуляции микробиоты [7]. Однако некоторые исследования показывают кардиопротективный эффект лептина. Так, отмечено, что лептин повышает фагоцитарную активность макрофагов, а также стимулирует хемотаксис, что важно для формирования рубцовой зоны и активации репаративных процессов в миокарде [26].

Во всех группах с моделированием ССВО наблюдалось значительное увеличение концентрации ИФН- γ , что может косвенно указывать на компенсаторную иммунную реакцию. Учитывая ведущую роль химически индуцированного колита в данной модели, представляется естественной центральной роль в регуляции защитных реакций организма посредством ФНО- α и ИФН- γ при разнообразии биологических активностей этих цитокинов. Очевидно, что их гиперпродукция определяет развитие патологических состояний, сопровождающихся хроническими воспалительными и/или аутоиммунными реакциями. Увеличение показателя ИФН- γ являлось значимым во всех подопытных группах по отношению к контролю, но в группе ССВО + ИНП отмечено существенное его снижение по отношению к уровню в группе ССВО, что важно, учитывая перспективы применения ФНО- α и ИФН- γ связывающих белков, способных стать основой для создания новых терапевтических цитокин-связывающих препаратов.

Сывороточный лактоферрин – это ферропротеин, который продуцируют нейтрофилы и макрофаги, а секреторный лактоферрин – клетки эпителия. Именно из-за способности связывать ионы металлов лактоферрин проявляет бактериостатическую и бактерицидную активность, а также антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства и относится к факторам неспецифической защиты [27, 28]. Кроме того, макромолекула лактоферрина обладает участками связывания для бактериальных токсинов, липополисахарида, гепарина и других макромолекул. Как иммунотропный белок, лактоферрин участвует в регуляции клеточного и гуморального звена иммунитета, воздействуя через рецепторы иммунокомпетентных клеток, интерлейкины и систему комплемента [29, 30]. Концентрация сывороточного лактоферрина, уровень которого

коррелирует с уровнем лейкоцитов в крови, повышается как при локальных, так и при генерализованных деструктивно-воспалительных процессах (сепсис, пневмония, панкреатит), а определение повышенных уровней лактоферрина в сыворотке крови является надежным тестом воспалительного процесса любой этиологии [31]. В данном исследовании во всех группах по отношению к КТР произошло увеличение показателя GRAN, в котором преобладают нейтрофилы; при этом в группе ССВО + ИНП отмечено значимое увеличение по отношению к ССВО и ССВО + ЛБС не только лимфоцитов, но и популяции MID, включающей эозинофилы, базофилы и моноциты. Учитывая увеличение GRAN во всех группах, но увеличение показателя лактоферрина только в группе ССВО + ИНП при сопутствующем уменьшении в других группах, можно отнести его к активности макрофагов и предположить возможную связь с результатом инактивации живых пробиотиков.

ДП как характеристика работы сердца показало существенное снижение ее эффективности по сравнению с контролем в группах ССВО и ССВО + ИНП, что обратно коррелирует с размером инфаркта, который был значимо выше в этих группах по сравнению с группой КТР. В группе ССВО + ЛБС отмечено сохранение ДП на уровне контрольной группы, что может служить дополнительным функциональным критерием кардиопротекции.

Несмотря на широкий круг исследованных параметров, достаточных аргументов для однозначных объяснений ассоциативной связи изменений показателей ИЛ-1 β , ИЛ-2, кортизола и лактоферрина в крови с изменениями размеров зоны инфаркта пока недостаточно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у животных с ССВО имеются специфические особенности действия живых и инактивированных пробиотических микроорганизмов с отсутствием кардиопротективного эффекта при использовании инактивированных лакто- и бифидобактерий.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных Национальным медицинским исследовательским центром им. В.А. Алмазова Минздрава России (протокол-заявка № ПЗ 23_9_V2 от 06.09.2023 г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 23-15-00139), <https://rscf.ru/project/23-15-00139>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Ю.Ю.Б., М.М.Г.), сбор данных (Ю.Ю.Б., Д.Л.С., И.Ю.Б., Е.С.П., В.Ю.Б., О.В.Б.), анализ и обработка данных (Ю.Ю.Б., И.Ю.Б., М.М.Г.), написание и редактирование манускрипта (Ю.Ю.Б., И.Ю.Б., М.М.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шляхто ЕВ, Петрищев НН, Галагудза ММ, Власов ТД, Нифонтов ЕМ* (2013). Кардиопротекция: фундаментальные и клинические аспекты. СПб. ООО Студия "НП-Принт".

- [Shlyakhto EV, Petrishchev NN, Galagudza MM, Vlasov TD, Nifontov EM (2013) Cardioprotection: fundamental and clinical aspects. SPb. OOO Studiya "NP-Print". (In Russ)].
2. Heusch G (2017) Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circul Res* 120(9): 1477–1486.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310820>
3. Wang Q, Zuurbier CJ, Huhn R, Torregroza C, Hollmann MW, Preckel B, van den Brom CE, Weber NC (2023) Pharmacological Cardioprotection against Ischemia Reperfusion Injury-The Search for a Clinical Effective Therapy. *Cells* 12(10): 1432.
<https://doi.org/10.3390/cells12101432>
4. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V (2020) GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 76(25): 2982–3021.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
5. Kundu P, Blacher E, Klinav E, Pettersson S (2017) Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell* 171(7): 1481–1493.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.024>
6. Forkosh E, Ilan Y (2019) The heart-gut axis: new target for atherosclerosis and congestive heart failure therapy. *Open Heart* 6(1): e000993.
<https://doi.org/10.1136/openhrt-2018-000993>
7. Lam V, Su J, Koprowski S, Hsu A, Tweddell JS, Rafiee P, Gross GJ, Salzman N H, Baker JE (2012) Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. *FASEB J: official publication of the Federation of Am Soc Exp Biol* 26(4): 1727–1735.
<https://doi.org/10.1096/fj.11-197921>
8. Danilo CA, Constantopoulos E, McKee LA, Chen H, Regan JA, Lipovka Y, Lahtinen S, Stenman LK, Nguyen TV, Doyle KP, Slepian MJ, Khalpey ZI, Konhilas JP (2017) Bifidobacterium animalis subsp. lactis 420 mitigates the pathological impact of myocardial infarction in the mouse. *Benefic Microbes* 8(2): 257–269.
<https://doi.org/10.3920/BM2016.0119>
9. Borshchev YY, Burovenko IY, Karaseva AB, Minasian SM, Protsak ES, Borshchev VY, Semenova NY, Borshcheva OV, Suvorov AN, Galagudza MM (2022) Probiotic Therapy with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis Results in Infarct Size Limitation in Rats with Obesity and Chemically Induced Colitis. *Microorganisms* 10(11): 2293.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10112293>
10. Gan XT, Ettinger G, Huang CX, Burton JP, Haist JV, Rajapurohitam V, Sidaway JE, Martin G, Gloor GB, Swann JR, Reid G, Karmazyn M (2014) Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ Heart Fail* 7(3): 491–499.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000978>
11. Борщев ЮЮ, Буровенко ИЮ, Карасева АБ, Минасян СМ, Борщев ВЮ, Семенова НЮ, Борщева ОВ, Половинкин ВВ, Родионов ГГ, Суворов АН, Галагудза ММ (2020). Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс. *Мед. иммунол.* 22(1): 87–98. [Borshev YuYu, Burovenko IYu, Karaseva AB, Minasyan SM, Borshev VYu, Semenova NYu, Borshcheva OV, Polovinkin VV, Rodionov GG, Suvorov AN, Galagudza MM (2020) Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats. *Med Immunol* 22(1): 87–98. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-MOS-1839>
12. Шендеров БА (2014). Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья. *Метаморфозы* 5: 72–80. [Shenderov BA (2014) Human microbial ecology and its role in maintaining health. *Metamorfozy* 5: 72–80. (In Russ)].
13. Ардатская МД (2015). Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микрорэкологических нарушений кишечника. *Мед. совет* 13: 94–99. [Ardatskaya MD (2015) Probiotics, prebiotics and metabiotics in the management of microecological bowel disorders. *Med Sovet* 13: 94–99. (In Russ)].
<https://doi.org/10.21518/2079-701X-2015-13-94-99>

14. *Бондаренко ВМ* (2005). Метаболические пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях. *Consil Med* 7: 437–443. [*Bondarenko VM* (2005) Metabolic probiotics: mechanisms of therapeutic effect in microecological disorders. *Consil Med* 7: 437–443. (In Russ)].
15. *Alfano M, Poli G* (2005) Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol* 42(2): 161–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.016>
16. *Godfried MH, Romijn JA, van der Poll T, Weverling GJ, Corssmit EP, Endert E, Eeftink Schattenkerk, JK, Sauerwein HP* (1995) Soluble receptors for tumor necrosis factor are markers for clinical course but not for major metabolic changes in human immunodeficiency virus infection. *Metabol: Clin and Exp* 44(12): 1564–1569. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90076-4)
17. *Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW* (1992) Genomic structure, induction, and production of TNF- α . *Immunol Series* 56: 3–34.
18. *Wang X, Guo Z, Ding Z, Mehta JL* (2018) Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc* 7(9): e008024. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008024>
19. *Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM* (1985) A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science (New York)* 229(4716): 867–869. <https://doi.org/10.1126/science.3839597>
20. *Breslow MJ, Min-Lee K, Brown DR, Chacko VP, Palmer D, Berkowitz DE* (1999) Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *Am J Physiol* 276(3): E443–E449. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.3.E443>
21. *Ghadge AA, Khaira AA* (2019) Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine* 121: 154735. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154735>
22. *Liu W, Zhou X, Li Y, Zhang S, Cai X, Zhang R, Gong S, Han X, Ji L* (2020) Serum leptin, resistin, and adiponectin levels in obese and non-obese patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: A population-based study. *Medicine* 99(6): e19052. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019052>
23. *Khafaji HA, Bener AB, Rizk NM, Al Suwaidi J* (2012) Elevated serum leptin levels in patients with acute myocardial infarction; correlation with coronary angiographic and echocardiographic findings. *BMC Res Notes* 5: 262. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-262>
24. *Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S, Erbs S, Moebius-Winkler S, Schuler G* (2003) Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 5(1): 33–40. [https://doi.org/10.1016/s1388-9842\(02\)00177-0](https://doi.org/10.1016/s1388-9842(02)00177-0)
25. *Polyakova EA, Mikhaylov EN, Galagudza MM, Shlyakhto EV* (2021) Hyperleptinemia results in systemic inflammation and the exacerbation of ischemia-reperfusion myocardial injury. *Heliyon* 7(11): e08491. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08491>
26. *Smith CC, Yellon DM* (2011) Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol & Therap* 129(2): 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.09.003>
27. *Кузнецов ИА, Потиевская ВИ, Качанов ИВ, Куралева ОО* (2017). Роль лактоферрина в биологических средах человека. *Совр. пробл. науки и образов.* 3. [*Kuznetsov IA, Potievskaya VI, Kachanov IV, Kuraleva OO* (2017) The role of lactoferrin in human biological media. *Sovr Probl Nauki Obrazov* 3. (In Russ)]. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26522>
28. *Бойко ОВ, Ахминеева АХ, Гудинская НИ, Бойко ВИ, Козак ДМ, Бендюг ВА* (2013). Биохимические и иммунологические маркеры в диагностике патологических состояний. *Фундамент исслед.* 9(3): 327–329. [*Boyko OV, Akhmineeva AKh, Gudinskaya NI, Boyko VI, Kozak DM, Bendyug VA* (2013) Biochemical and immunological markers in the diagnosis of pathological conditions. *Fundament Issled* 9: 327–329. (In Russ)]. <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32347>
29. *Коханов АВ, Мяснянкин АА, Метелкина ЕВ, Мусатов ОВ, Луцева ОА, Белопасов ВВ* (2010). Фетальные и острофазовые белки как маркеры репаративных процессов. *Международ. журн. экспер. образов.* 11: 89. [*Kokhanov AV, Myasnyankin AA, Metelkina EV, Musatov OV, Lutseva OA, Belopasov VV* (2010) Fetal and acute phase proteins as markers of reparative processes. *Mezhdunar zhurn eksper obrazov* 11: 89. (In Russ)]. <https://expeducation.ru/ru/article/view?id=964>

30. Михайличенко ВЮ, Трофимов ПС, Кчибеков ЭА, Самарин СА, Топчиев МА, Биркун АА (2018). Оценка динамики уровня лактоферрина сыворотки крови в послеоперационном мониторинге больных, прооперированных по поводу распространенного перитонита. Тавр. мед.-биол. вестн. 21(1): 98–103. [Mikhaylichenko VYu, Trofimov PS, Kchibekov EA, Samarin SA, Topchiev MA, Birkun AA (2018) Assessment of the lactoferrin level in blood serum in the postoperative monitoring of patients operated on diffused peritonitis. Tavr Med-Biol Vestn 21(1): 98–103. (In Russ)].
31. Луцева ОА, Коханов АВ, Воронкова МЮ, Иримиа РН, Зеленцова ЯВ (2019). Уровни лактоферрина в сыворотке крови и фекальном экстракте при некоторых воспалительных заболеваниях кишечника. Совр. пробл. науки и образов. 1: 46. [Lutseva OA, Kokhanov AV, Voronkova MYu, Irimia RN, Zelentsova YaV (2019) Serum and fecal extract lactoferrin levels in some inflammatory bowel diseases. Sovr Probl Nauki Obrazov 1: 46. (In Russ)]. <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28541>

Effect of live and inactivated probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on myocardial infarction size in rats with systemic inflammatory response syndrome

**Y. Y. Borshchev^{a,c}, D. L. Sonin^{a,b}, I. Y. Burovenko^{a,*}, E. S. Protsak^a, V. Y. Borshchev^b,
O. V. Borshcheva^a, and M. M. Galagudza^{a,b}**

^aAlmazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

^bPavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

^cNational Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

*e-mail: burovenko.inessa@gmail.com

Within the concept of a heart-gut axis, new works are emerging to support the efficacy of probiotic strains to increase myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury (IRI) in comorbidity. The question remains open whether the presence of live probiotic bacteria is a necessary condition for the realization of their cardioprotective effect. The aim of this work was to determine the manifestation of cardio-protective effect of living and pasteurized probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) in rats with systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Myocardial resistance to IRI was assessed using an *in vivo* model of left coronary artery occlusion-reperfusion. Experiments were performed on male Wistar rats with improved conventional status with visceral obesity, chemically induced colitis and antibiotic-induced dysbiosis, which together provided the formation of (SIRS) against the background of oral administration of live and inactivated probiotic bacteria. Myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury was assessed using the technique of left coronary artery occlusion *in vivo*. The infarct size in the group with simulated SIRS was significantly higher than in the control group 43% (39; 44) and 31% (28; 35), ($p < 0.05$). In the SIRS group with the introduction of inactivated probiotic bacteria, the infarct size 45% (37; 48) did not differ from the SIRS group and was significantly higher than in the control ($p < 0.05$). At the same time, the size of the infarction in the group with the introduction of live probiotics did not differ from that in the control group and amounted to 32% (28; 37). There are specific features of the action of live and inactivated probiotic microorganisms with preservation of cardioprotective effect when using live lacto- and bifidobacteria in animals with SIRS.

Keywords: myocardium, ischemia-reperfusion, cardiac protection, polymorbidity, systemic inflammatory response syndrome, white blood cells, cytokine, probiotics

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИНВЕРСИОННЫЙ
АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПИНА АКТИВЕН
КАК ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ,
ТАК И ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ**

© 2024 г. К. В. Деркач^{1,*}, А. А. Бахтюков¹, В. Н. Сорокоумов^{1,2}, И. А. Лебедев¹,
Е. А. Диденко^{1,2}, А. О. Шпаков¹

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

²Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: derkatch_k@list.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Аутоиммунный гипертиреоз (болезнь Грейвса), причиной которого являются стимулирующие аутоантитела к рецептору тиреотропного гормона (ТТГ), и опухоли щитовидной железы, обусловленные конститутивно повышенной активностью этого рецептора, имеют широкое распространение и неблагоприятный прогноз. Препараты, используемые для их лечения, малоэффективны и имеют множество побочных эффектов. Одним из подходов для лечения этих заболеваний может стать применение аллостерических регуляторов рецептора ТТГ с активностью инверсионных агонистов. Цель работы состояла в изучении эффектов ранее разработанного нами соединения TP48 и нового соединения TPY5, относящихся к классу тиено[2,3-d]-пиримидинов, на базальные и стимулированные тиролиберин (TRH) уровни тиреоидных гормонов (ТГ) в крови крыс и на экспрессию генов, ответственных за синтез ТГ в щитовидной железе. Эффективность TP48 и TPY5 изучали как при внутрибрюшинном (в/б, 20 мг/кг), так и при пероральном (40 мг/кг) введении. С помощью иммуноферментного анализа оценивали уровни свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина в крови, в том числе при стимуляции TRH (интраназально, 300 мкг/кг), с помощью ПЦР – экспрессию генов тиреопероксидазы (*Thpo*), тиреоглобулина (*Tg*), Na⁺/I⁻-симпортера (*Nis*), дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) и рецептора ТТГ (*Tshr*) в щитовидной железе. TPY5 при обоих способах введения снижал как базальные, так и стимулированные TRH уровни ТГ, в то время как TP48 подавлял продукцию ТГ только при в/б введении. Перорально вводимый TPY5 в значительной степени снижал базальную экспрессию гена *Thpo* и TRH-стимулированную экспрессию генов *Tg* и *Dio2*. Внутрибрюшинно вводимый TP48 снижал только TRH-стимулированную экспрессию генов *Tg* и *Dio2*. Достаточно неожиданно, что TPY5 (перорально) и TP48 (в/б) снижали базальную экспрессию гена *Tshr* и не предотвращали ее ингибирование, вызываемое TRH. Тем самым разработанное нами соединение TPY5 наделено активностью инверсионного агониста рецептора ТТГ, эффективно при пероральном способе доставки, который

в большей степени востребован в медицине, и может рассматриваться как прототип фармакологических препаратов для лечения аутоиммунного гипертиреоза и опухолей щитовидной железы.

Ключевые слова: рецептор тиреотропного гормона, инверсионный агонист, аллостерический регулятор, тиенопиримидин, тироксин, тиролиберин.

DOI: 10.31857/S0869813924010078, **EDN:** WJZCXE

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения функций щитовидной железы в настоящее время имеют широкое распространение, вызывают большое число осложнений со стороны нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой и других систем организма, приводят к инвалидизации и преждевременной смерти пациентов, вследствие чего поиск эффективных путей для их лечения является одной из актуальных проблем современной медицины [1, 2]. Для коррекции гипотиреоидных состояний, в том числе аутоиммунного тиреоидита, наиболее часто применяют заместительную терапию препаратами тиреоидных гормонов (ТГ), которая обычно хорошо переносится пациентами [3]. В то же время антигипотиреоидные препараты, в том числе наиболее широко применяемые в клинике производные тионамидов (мерказолил, метилтиоурацил и др.), которые используются для предотвращения тиреотоксикоза при аутоиммунном тиреоидите (болезни Грейвса), не столь эффективны и приводят к ряду серьезных побочных эффектов [4]. Вследствие этого для лечения такой тиреоидной патологии часто прибегают к терапии радиоактивным йодом и хирургическим вмешательствам [5]. Не менее острую проблему представляет лечение токсических аденом и опухолей щитовидной железы, причиной которых являются активирующие мутации в рецепторе тиреотропного гормона (ТТГ). Эти мутации вызывают значительное повышение базальной активности рецептора и делают его нечувствительным к регуляции эндогенным ТТГ. Для лечения аденом и опухолей щитовидной железы, практически безальтернативно, используют радиоизотопные и хирургические методы, которые несут в себе серьезные риски для здоровья пациентов [6, 7].

Одним из перспективных подходов для лечения болезни Грейвса, а также токсических аденом и опухолей щитовидной железы, обусловленных конститутивно повышенной активностью рецептора ТТГ, является применение низкомолекулярных инверсионных агонистов, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, локализованным в трансмембранном канале рецептора [8–11]. Поскольку этот сайт топологически отделен от ортостерического сайта, который расположен во внеклеточном домене, то связывание с ним аллостерического инверсионного агониста не препятствует взаимодействию ТТГ с рецептором [8]. В настоящее время разработано несколько инверсионных агонистов рецептора ТТГ, которые были активны как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, подавляя активацию рецептора как гормоном, так и стимулирующими аутоантителами и снижая конститутивно повышенную базальную активность рецептора [12–15]. Нами было разработано соединение TP48, производное тиено[2,3-d]-пиримидина, наделенное свойствами инверсионного агониста, которое при внутривенном (в/в) введении крысам не только ингибировало продукцию ТГ, стимулированную тиролиберином (TRH), релизинг-фактором ТТГ, но и снижало, хотя и в небольшой степени, базовые уровни ТГ [16, 17].

Низкомолекулярные аллостерические регуляторы G-белок-сопряженных рецепторов имеют целый ряд преимуществ в сравнении с лигандами ортостерических сайтов. Они имеют более умеренную активность, и тем самым их применение не приводит к гиперстимуляции (в случае полных агонистов) или избыточному ингибированию (в случае инверсионных агонистов) рецептора. Кроме того, они характеризуются более

высокой селективностью регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов (“предвзятостью” сигналинга). В ряде случаев низкомолекулярные аллостерические регуляторы активны не только при парентеральных, но и при пероральном способе введения, будучи устойчивыми и хорошо всасываясь в желудочно-кишечном тракте, как это продемонстрировано нами для тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных с активностью агонистов рецептора лютеинизирующего гормона [18]. В этой связи следует отметить, что пероральный способ доставки более востребован в медицине.

В соответствии с вышесказанным нами была поставлена цель разработать инверсионные агонисты рецептора ТГ, способные снижать как стимулированную, так и базальную его активность не только при парентеральном (в/б), но и при пероральном способе доставки. Исследовали регуляторные эффекты ранее разработанного соединения TP48 и нового соединения TPY5, также относящегося к классу тиено[2,3-*d*]-пиримидинов, на базовые и стимулированные TRH уровни ТГ в крови крыс, а также влияние этих соединений на экспрессию генов, ответственных за синтез ТГ в щитовидной железе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении экспериментов были использованы самцы крыс линии Wistar в возрасте 3–4-х месяцев. Крыс содержали в режиме 12 ч день/12 ч ночь, при температуре $22 \pm 3^\circ\text{C}$, со свободным доступом к питьевой воде и гранулированному сухому корму.

Соединение TP48 (5-амино-N-(*трет*-бутил)-4-(4-иодфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид) получали, как описано ранее, из 5-амино-4-(4-иодфенил)-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоновой кислоты как предшественника [16]. Структуру подтверждали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с помощью спектрометра “Bruker micrOTOF” (Германия). Масса иона $[M+K^+]$ для TP48 составила 536.9868 (вычислено 536.9886; $C_{18}H_{19}IN_4OS_2K$).

Соединение TPY5 (5-амино-N-(*трет*-бутил)-4-(4-(3-(2,3-дигидроксипропокси)проп-1-ин-1-ил)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид) получали из TP48 по реакции Соногаширы с 2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)оксираном с последующим кислотным гидролизом оксиранового цикла. По данным масс-спектрометрического анализа масса иона $[M+Na^+]$ для TPY5 составила 523.1443 (вычислено 523.1444; $C_{24}H_{28}N_4O_4S_2Na$).

Оба соединения растворяли в ДМСО и однократно вводили крысам, в/б в дозе 20 мг/кг и перорально в дозе 40 мг/кг. Выбор доз основывался на результатах предварительных исследований зависимости доза–эффект, а в случае TP48 был продиктован результатами, полученными ранее при его в/б введении [16, 17]. При в/б введении соединения растворяли в объеме 200 мкл ДМСО. При пероральном введении соединения, растворенные в том же объеме ДМСО, вводили с помощью назогастрального зонда. Контрольной группе вместо тиено[2,3-*d*]-пиримидинов в/б вводили ДМСО в объеме 200 мкл. TRH производства фирмы “Sigma” (США) вводили крысам интраназально, однократно, в дозе 300 мкг/кг, как описано ранее [19]. Для этого животных переворачивали на спину и осторожно, по каплям, вводили раствор TRH в физиологическом растворе в носовую полость (общий объем 20 мкл, по 10 мкл в каждую ноздрю, поочередно, порциями по 5 мкл). Контрольным животным вместо раствора TRH вводили в том же объеме физиологический раствор.

В общей сложности были сформированы 10 групп: контрольные крысы (группа С), получавшие только растворители TRH и тиено[2,3-*d*]-пиримидинов; крысы, которые были обработаны либо с помощью TRH (группа TRH), либо с помощью TP48 при в/б и пероральном введении (группы TP48ip и TP48or), либо с помощью TPY5 при в/б и пероральном введении (группы TPY5ip и TPY5or); крысы, которые были последовательно обработаны тиено-[2,3-*d*]-пиримидинами, TP48 и TPY5 при различных способах введения и затем TRH (группы TRH-TP48ip, TRH-TP48or, TRH-TPY5ip

Таблица 1. Прямые и обратные праймеры для генов, кодирующих рецептор ТТГ и белки, ответственные за синтез ТГ, а также референсные гены

Ген	Последовательности прямого (For) и обратного (Rev) праймеров	Индексация в Genbank
<i>Tshr</i>	(For) CTCGGACAAGACATGAGCCC	NM_012888.1
	(Rev) GGTCCAGGGACTTGCTCAA	
<i>Tg</i>	(For) GCCCTAACTCATCCGTCCA	NM_005106.4
	(Rev) TGTGTGATAAGCCCATCGTCCT	
<i>Dio2</i>	(For) CGTCATCCTCAAGTGTCCTCC	NM_031720.5
	(Rev) TGGTACGCGCACATTACCTT	
<i>Tpo</i>	(For) TTGGATCTGGCATCACTGAACTT	NM_005105.4
	(Rev) ATCTTGTGACCATGCTTCTGTTG	
<i>Nis</i>	(For) AAGTGACCGGGTTGGACATC	NM_052983.2
	(Rev) AGCCAACGAGCATTACCACA	
<i>18S rRNA</i>	(For) GGACACGGACAGGATTGACA	NM_046237.1
	(Rev) ACCCACGGAATCGAGAAAGA	
<i>Actb</i>	(For) CTGGCACCACACCTTCTACA	NM_031144.3
	(Rev) AGGTCTCAAACATGATCTGGGT	

Tshr – ген рецептора ТТГ; *Tg* – ген тиреоглобулина; *Dio2* – ген дейодиназы 2-го типа; *Tpo* – ген тиреопероксидазы; *Nis* – ген Na⁺/I⁻-симпортера; *18S rRNA* и *Actb* – гены *18S-pPHK* и β-актина, используемые как референсные гены.

и TRH-ТРУ5 α). В/б введение тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных осуществляли в 10.30, пероральное – в 10.15, в то время как TRH во всех случаях вводили в 11.00. Первый забор крови осуществляли в 10.00 (до введения препаратов), второй забор – в 14.00, через 3 ч. после введения TRH. Соответственно со времени в/б введения ТР48 и ТРУ5 проходило 3 ч. 30 мин., со времени их перорального введения – 3 ч. 45 мин. В каждой группе было по шесть животных. Образцы крови получали из хвостовой вены, используя местный наркоз – 2%-ный раствор лидокаина (2–4 мг/кг).

Для определения концентрации в крови крыс ТГ – свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина использовали ИФА-наборы фирмы “Иммунотех” (Россия).

Количественную ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией осуществляли, как описано ранее [16,17]. Для этого из ткани щитовидной железы выделяли тотальную РНК, используя реагент “ExtraRNA”, обратную транскрипцию проводили с помощью набора “MMLV RT Kit” фирмы “Eurogen” (Россия). Процедуру амплификации осуществляли в инкубационной смеси, содержащей 10 нг продукта ПЦР, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реагент “qPCRmix-HS SYBR+LowROX” (“Eurogen”, Россия). Сигнал детектировали с помощью прибора “7500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для оценки экспрессии генов использовали последовательности комплементарных кДНК прямого и обратного праймеров,

а также референсные гены, кодирующие 18S-pPHK (18S rRNA) или β -актин (*Actb*). Структура праймеров для генов, кодирующих тиреопероксидазу (*Tpo*), тиреоглобулин (*Tg*), Na^+/I^- -симпортер (*Nis*), дейодиназу 2-го типа (*Dio2*) и рецептор ТТГ (*Tshr*), а также для референсных генов представлена в табл. 1. Полученные данные рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta\text{C}_t$, значения RQ рассчитывали по отношению к экспрессии гена в контрольной группе, которую принимали за единицу.

Статистический анализ проводили с помощью компьютерной программы “IBM SPSS Statistics 26” (“IBM”, США). Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки равенства дисперсий применяли критерий Ливиня. Все данные имели нормальное распределение, вследствие чего для сравнения групп при оценке влияния препаратов, включая комбинации TRH и тиено-[2,3-d]-пиримидинов, на уровни ТГ и экспрессию генов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки. Для сравнения уровней ТГ в одной группе, в исходной точке и после обработки TP48 или TPY5, использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm SEM$. Все различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соединение TP48 при в/б введении самцам крыс снижало у них базовые уровни ТГ, причем уровни общего и свободного трийодтиронина, основного эффекторного гормона тиреоидной системы, снижались на 27 и 43% соответственно (табл. 2). Предобработка животных с помощью TP48 при его в/б введении снижала стимулирующий эффект интраназально вводимого TRH на продукцию fT4 и tT4, в меньшей степени ослабляя TRH-индуцированную стимуляцию продукции трийодтиронина (табл. 3). TRH в отсутствие TP48 повышал уровень fT4 на 38%, в то время как после предобработки TP48 только до 21%. Однако при пероральном введении ингибирующее влияние TP48 на базальные и стимулированные TRH уровни ТГ полностью утрачивалось. На это указывает отсутствие влияния TP48, вводимого перорально, на базовые уровни обоих ТГ (табл. 2), а также сохранение в его присутствии стимулирующего эффекта TRH (табл. 3). Таким образом, TP48 функционирует как инверсионный агонист рецептора ТТГ только при в/б введении этого соединения.

Новое соединение TPY5, производное TP48, было активным как при в/б, так и при пероральном введении (табл. 2). На это указывает снижение у крыс с обработкой TPY5 базового уровня всех изученных форм ТГ (за исключением tT3 в группе TPY5ip), причем ингибирующие эффекты TPY5 в изученных дозах при обоих способах введения были сопоставимыми. Так, уровни fT3 при в/б и пероральном введении TPY5 снижались на 34 и 31% соответственно. Стимулирующий эффект TRH на продукцию ТГ у крыс с предобработкой в/б вводимым TPY5 снижался для tT4 и fT3, в то время как в случае перорально вводимого TPY5 отмечали снижение уровней всех изученных форм ТГ, причем, за исключением tT3, они не отличались от таковых в контрольной группе (табл. 3). Тем самым, в отличие от TP48, соединение TPY5 проявляло свойства инверсионного агониста при обоих способах введения.

На заключительном этапе исследования в ткани щитовидной железы крыс изучали влияние TP48 и TPY5 на экспрессию генов, кодирующих рецептор ТТГ и основные белки, ответственные за синтез ТГ. Оценивали эффекты перорально вводимого TPY5 на генную экспрессию, а также соответствующие эффекты TP48 при его в/б введении, поскольку при пероральном введении TP48 утрачивал активность.

Достаточно неожиданным был тот факт, что в/б вводимый TP48 и перорально вводимый TPY5 снижали базальную экспрессию гена *Tshr*, кодирующего рецептор ТТГ, в ткани щитовидной железы (рис. 1). Обработка TRH, который, стимулируя тиреоид-

Таблица 2. Влияние тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных на базовые уровни ТГ в крови при их внутривнутрибрюшинном и пероральном введении самцам крыс

Группа	Общий Т4, нмоль/л	Свободный Т4, пмоль/л	Общий Т3, нмоль/л	Свободный Т3, пмоль/л
TP48ip-0	71.9 ± 2.0	36.6 ± 0.9	4.01 ± 0.15	3.86 ± 0.19
TP48ip	56.9 ± 2.7 ^a	29.0 ± 1.6 ^a	2.92 ± 0.26 ^a	2.20 ± 0.23 ^a
TP48or-0	69.3 ± 2.6	36.4 ± 2.2	3.84 ± 0.24	4.13 ± 0.19
TP48or	65.6 ± 2.9	33.3 ± 1.5	3.71 ± 0.24	3.93 ± 0.17
TPY5ip-0	68.0 ± 2.8	35.9 ± 1.1	3.72 ± 0.23	4.24 ± 0.16
TPY5ip	49.9 ± 1.2 ^a	27.3 ± 1.3 ^a	2.89 ± 0.19	2.79 ± 0.15 ^a
TPY5or-0	67.2 ± 3.3	35.0 ± 0.8	3.70 ± 0.22	3.90 ± 0.25
TPY5or	54.9 ± 3.0 ^a	26.5 ± 1.0 ^a	2.62 ± 0.23 ^a	2.69 ± 0.20 ^a

^a – различия статистически значимы с исходной точкой (до введения TP48 или TPY5, а также их растворителя ДМСО) при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения уровней ТГ в исходной точке и после обработки препаратами использовали *t*-критерий Стьюдента.

Таблица 3. Влияние тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных, вводимых внутривнутрибрюшинно или перорально, на стимулированные тиролиберином уровни ТГ в крови самцов крыс

Группа	Общий Т4, нмоль/л	Свободный Т4, пмоль/л	Общий Т3, нмоль/л	Свободный Т3, пмоль/л
TRH-0	69.1 ± 1.6	39.4 ± 1.3	3.79 ± 0.21	3.55 ± 0.15
TRH	96.5 ± 3.8 ^a	54.5 ± 2.6 ^a	5.43 ± 0.26 ^a	5.44 ± 0.38 ^a
TRH-TP48ip-0	67.7 ± 3.1	36.7 ± 2.1	3.99 ± 0.22	3.60 ± 0.20
TRH-TP48ip	79.6 ± 4.6 ^{a,b}	44.5 ± 2.9 ^{a,b}	4.75 ± 0.25 ^a	4.41 ± 0.34 ^a
TRH-TP48or-0	66.1 ± 2.9	40.2 ± 1.9	4.06 ± 0.22	3.49 ± 0.14
TRH-TP48or	90.7 ± 5.2 ^a	54.3 ± 2.4 ^a	5.38 ± 0.21 ^a	4.94 ± 0.26 ^a
TRH-TPY5ip-0	70.9 ± 2.9	38.5 ± 1.9	3.95 ± 0.21	3.77 ± 0.19
TRH-TPY5ip	80.0 ± 2.5 ^{a,b}	46.7 ± 3.5 ^a	4.51 ± 0.30 ^a	4.11 ± 0.29 ^b
TRH-TPY5or-0	69.4 ± 1.5	35.8 ± 1.5	3.70 ± 0.31	3.63 ± 0.26
TRH-TPY5or	76.3 ± 3.6 ^b	42.2 ± 3.8 ^b	4.13 ± 0.30 ^{a,b}	4.17 ± 0.23 ^b

Различия с исходной точкой (до введения TRH или совместно TRH и тиено[2,3-d]-пиримидинового производного) (^a) и между группами с обработкой одним TRH и комбинацией TRH и тиено[2,3-d]-пиримидинового производного (^b) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения уровней ТГ в исходной точке и после обработки препаратами использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения групп TRH, TRH-TP48ip и TRH-TP48or, а также для сравнения групп TRH, TRH-TPY5ip и TRH-TPY5or использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

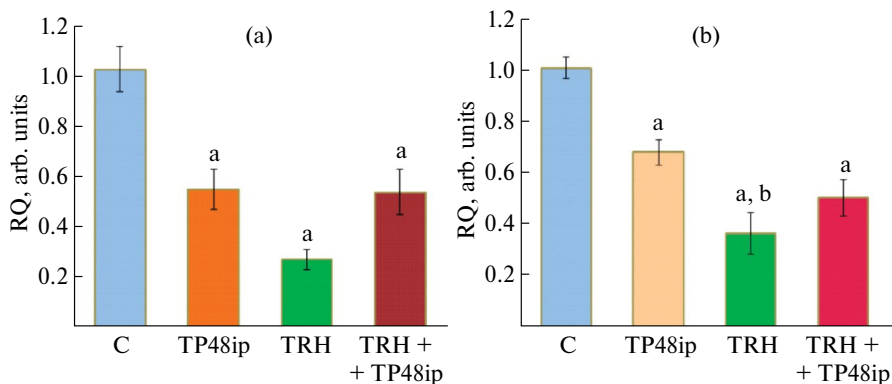


Рис. 1. Влияние внутрибрюшинно вводимого TP48 (а) и перорально вводимого TPY5 (б) на экспрессию гена рецептора ТТГ (*Tshr*) в щитовидной железе крыс с обработкой тиролиберинем и без таковой. Различия статистически значимы при $p < 0.05$ при сравнении с контролем (*) и группами TP48ip или TPY5or (b). Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

ную ось, усиливал продукцию ТГ, в значительной степени подавляла экспрессию гена *Tshr*, причем соединения TP48 и TPY5 хотя и смягчали ингибирующий эффект TRH, но не вызывали нормализации экспрессии этого гена (рис. 1).

Соединение TP48 существенно не влияло на базальный уровень экспрессии генов, вовлеченных в синтез ТГ, за исключением тенденции к снижению экспрессии гена *Nis*, кодирующего Na^+/I^- -симпортер, но различия с контролем в этом случае не были достоверными (рис. 2). В то же время соединение TPY5 значимо снижало базальный уровень экспрессии гена *Tpo*, кодирующего тиреопероксидазу (рис. 3). Предобработка крыс как с помощью TP48, так и TPY5 ослабляла стимулирующие эффекты TRH на экспрессию генов *Tg* и *Dio2*, кодирующих тиреоглобулин, прекурсор ТГ и дейодиназу 2-го типа, осуществляющую конверсию тироксина в трийодтиронин (рис. 2, 3). Ослабление экспрессии этих генов может быть одним из механизмов ингибирующего влияния тиено-[2,3-d]-пиримидиновых производных на продукцию ТГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные демонстрируют, что соединения TP48 и TPY5 по характеру их влияния на синтез ТГ являются инверсионными агонистами рецептора ТТГ, которые не только снижают базальный уровень ТГ, но и их уровни, стимулированные TRH. Необходимо отметить, что стимулирующее действие TRH на тиреоидный статус, в том числе при интраназальном введении, обусловлено активацией синтеза и секреции ТТГ тиреотрофами гипофиза. Это приводит к ТТГ-индуцированной стимуляции рецептора ТТГ и усилению синтеза ТГ в тироцитах [20]. TP48 при обработке им крыс был эффективен только при парентеральном способе введения (в/б), но терял активность при пероральном введении, в то время как TPY5 был в одинаковой степени эффективен как при в/б, так и при пероральном введении. Это указывает на устойчивость и хорошую всасываемость TPY5 в желудочно-кишечном тракте, что существенно расширяет возможности его применения в клинике.

Снижение стимулированной TRH продукции ТГ в тироцитах щитовидной железы, осуществляемое на уровне рецептора ТТГ, представляет значительный интерес для лечения аутоиммунного гипертиреоза (болезни Грейвса), который составляет 60–80% от всех патологических форм гипертиреоза, а также для предотвращения ассоциирован-

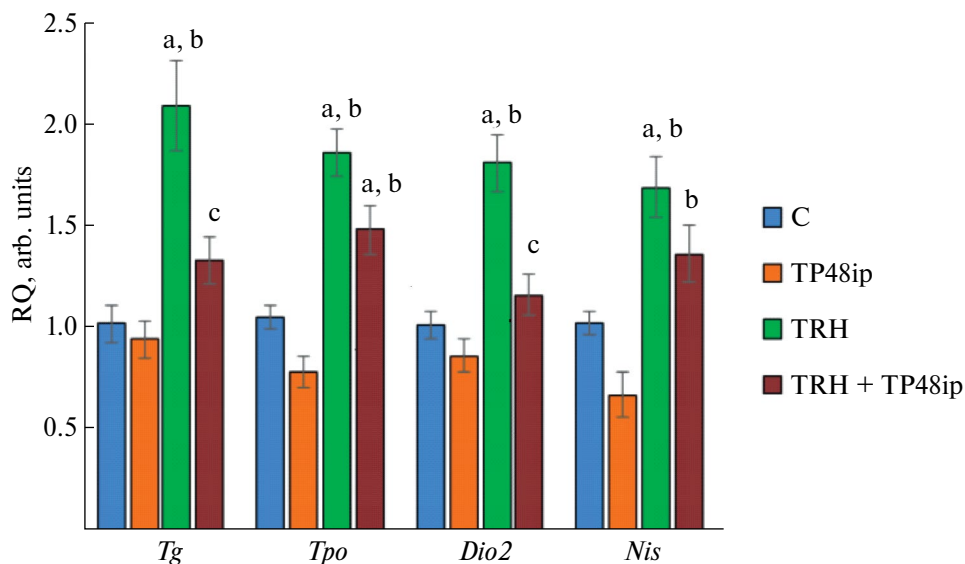


Рис. 3. Влияние TPY5 при его пероральном введении на экспрессию генов тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*Tpo*), дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) и Na^+/I^- -симпортера (*Nis*) в щитовидной железе крыс с обработкой тиролиберином и без таковой. Различия статистически значимы при $p < 0.05$ при сравнении с контролем (^a), группами TPY5or (^b) или TRH (^c). Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

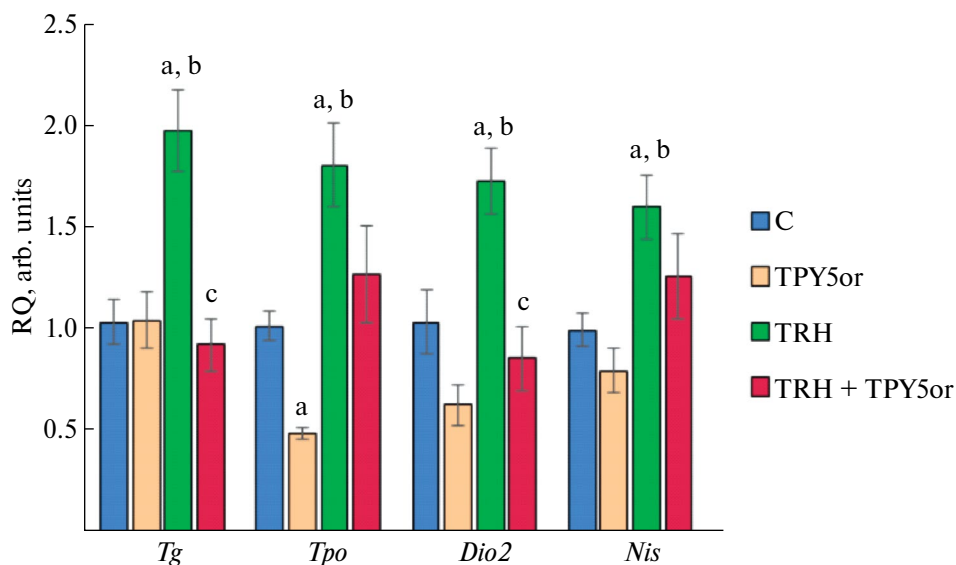


Рис. 2. Влияние TP48 при его внутрибрюшинном введении на экспрессию генов тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*Tpo*), дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) и Na^+/I^- -симпортера (*Nis*) в щитовидной железе крыс с обработкой тиролиберином и без таковой. Различия статистически значимы при $p < 0.05$ при сравнении с контролем (^a), группами TP48ip (^b) или TRH (^c). Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

ной с аутоиммунным гипертиреозом офтальмопатии Грейвса – тяжелого воспалительного заболевания глаз, угрожающего зрению изъязвлением роговицы и сдавлением зрительного нерва [21]. В основе развития аутоиммунного гипертиреоза лежит гиперпродукция ТГ тироцитами щитовидной железы в ответ на стимуляцию рецептора ТТГ стимулирующими аутоантителами. В свою очередь, основной причиной офтальмопатии Грейвса является вызываемая теми же аутоантителами гиперактивация рецепторов ТТГ, локализованных в соединительной ткани орбиты, и это приводит к усилению в ней воспалительных процессов и последующему фиброзу. Стимулирующие аутоантитела с высокой аффинностью связываются с локализованными в эктодомене рецептора сайтами, которые взаимно перекрываются с ортостерическим сайтом, мишенью ТТГ и мимикрируют стимулирующее действие гормона на рецептор ТТГ.

В настоящее время для нормализации тиреоидного статуса при аутоиммунном гипертиреозе применяют тотальную или частичную резекцию ткани щитовидной железы, терапию радиоактивным йодом и фармакотерапию анти тиреоидными препаратами. Однако все эти подходы характеризуются множеством побочных эффектов, что во многом обусловлено острым дефицитом ТГ при хирургических операциях, высоким риском нарушений функционирования паращитовидных желез при проведении тиреоидэктомии, развитием агранулоцитоза, васкулитов, поражения печени, кожных реакций при использовании фармакотерапии тионамидами [4, 5, 22, 23]. Значимой проблемой является низкая эффективность этих подходов для предотвращения офтальмопатии Грейвса [22, 23]. Последнее обусловлено тем, что патогенетические механизмы развития аутоиммунного гипертиреоза и офтальмопатии Грейвса различаются. В первом случае в тироцитах аутоантитела активируют цАМФ-зависимые сигнальные пути, ответственные за синтез ТГ. Во втором случае в фибробластах орбиты и периорбитальных тканей они воздействуют на сигнальные пути, в первую очередь на цАМФ-зависимые и β -аррестининовые, обеспечивающие функциональное взаимодействие между рецепторами ТТГ и инсулиноподобного фактора роста-1, что и является пусковым механизмом для развития офтальмопатии Грейвса [24, 25].

Поскольку механизмы активации рецептора ТТГ гормоном и стимулирующими аутоантителами и передача генерируемого ими сигнала к внутриклеточным мишеням как в тироцитах, так и в ретроорбитальных фибробластах реализуются с участием пути рецептор ТТГ–аденилатциклаза–цАМФ–протеинкиназа А [25,26], который является основной мишенью для разрабатываемых нами тиено-[2,3-d]-пиримидинов [16, 27, 28], то инверсионные агонисты TP48 и TPY5 могут быть эффективны не только для нормализации уровня ТГ в условиях гипертиреоза, но и для предотвращения офтальмопатии Грейвса. В пользу этого свидетельствуют и данные других авторов, исследовавших специфическую активность других аллостерических лигандов рецептора ТТГ с активностью инверсионных агонистов [13, 14]. Соединение NCGC00229600, производное 2,3-дигидрохиназолин-4-она, снижало стимулирующий аденилатциклазу эффект аутоантител к рецептору ТТГ в культуре тироцитов человека и соответствующий эффект ТТГ и аутоантител в культуре ретроорбитальных фибробластов, полученных от пациентов с офтальмопатией Грейвса [13, 14]. Соединение S37a подавляло стимуляцию аденилатциклазы, вызванную ТТГ и ауто-ТТГР-антителами (стимулирующими моноклональными антителами TSAb M22 человека и олигоклональными антителами TSAb, полученными от пациентов с болезнью Грейвса) [15]. Следует, однако, отметить, что эти инверсионные агонисты были изучены только в условиях *in vitro*, с использованием клеточных культур, что не позволяет оценить их возможный терапевтический потенциал. Только в случае соединения S37a были проведены пилотные исследования по его токсичности и биодоступности, но влияние S37a на тиреоидный статус и компоненты ТТГ-зависимых систем не оценивалось [15].

Ранее нами было показано, что TP48 при в/б введении в дозе 25 мг/кг снижает в щитовидной железе крыс базальный уровень экспрессии гена Na^+/I^- -симпортера, осу-

ществляющего транспорт йода в фолликулярные клетки, и подавляет TRH-стимулированную экспрессию всех изученных в том исследовании генов тиреоидогенеза – *Tg*, *Tpo* и *Nis* [16, 17]. В настоящем исследовании мы показали сходный паттерн ингибирующего влияния TP48, вводимого в более низкой дозе 20 мг/кг, на экспрессию генов, вовлеченных в синтез ТГ, но значимое снижение было обнаружено только в отношении экспрессии генов *Tg* и *Dio2* (рис. 2). Соединение TPY5 при пероральном введении снижало базальную экспрессию гена *Tpo* и подавляло TRH-стимулированную экспрессию генов *Tg* и *Dio2*, причем в большей степени в сравнении с TP48 (рис. 3). Это является одной из ключевых причин снижения базальных и стимулированных TRH уровней ТГ у крыс с обработкой TP48 и TPY5. В свою очередь, снижение экспрессии генов тиреоидогенеза в щитовидной железе при обработке животных TP48 и TPY5 обусловлено вызываемым этими соединениями ослаблением стимуляции рецептора гормоном. Установлено, что стимуляция экспрессии генов тиреоглобулина, тиреопероксидазы и других компонентов системы синтеза ТГ реализуется через цАМФ-зависимый каскад, активируемый связыванием гормона с рецептором ТТГ, который включает в качестве конечного эффекторного звена транскрипционный фактор CREB (cAMP response element binding protein) [29-31]. Другими авторами было показано, что соединение NCGC00229600, наделенное активностью инверсионного агониста, подавляло и базальную, и стимулированную аутоантителами экспрессию гена *Tpo* с эффективностью, сходной с таковой TP48 и TPY5, но эти исследования были проведены в условиях *in vitro*, в первичной культуре тироцитов человека [13]. Еще один аллостерический регулятор, NCGC00242364, при введении мышам в 4–5 раз снижал TRH-стимулированную экспрессию генов *Nis* и *Tpo*, но не влиял на базальную, в том числе на конститутивно повышенную, активность рецептора ТТГ, функционируя как нейтральный антагонист [32].

Снижение содержания йода в организме, приводящее к его дефициту и к снижению продукции ТГ, повышает экспрессию транскрипционных факторов TTF-1 и PAX8, которые положительно регулируют экспрессию гена *Tshr* [33]. В нашем исследовании у крыс, обработанных TRH, на фоне повышения продукции ТГ отмечали снижение экспрессии гена *Tshr* в среднем в 3–4 раза (рис. 1), что обусловлено запуском отрицательных обратных связей в тиреоидной оси. В связи с этим достаточно неожиданными оказались результаты влияния TP48 и TPY5 на экспрессию гена *Tshr*, которая в их присутствии снижалась (рис. 1). Одним из возможных объяснений этого может быть стабилизирующее или модулирующее влияние TP48 и TPY5 на интернализацию и внутриклеточный эндосомальный транспорт рецептора ТТГ, поскольку низкомолекулярные аллостерические регуляторы могут функционировать как шапероны для рецепторов гликопротеиновых гормонов [34]. Однако это требует дополнительных исследований, в том числе включающих изучение влияния TP48 и TPY5 на экспрессию и активность транскрипционных факторов TTF-1 и PAX8, регуляторов транскрипционной активности гена *Tshr*.

Таким образом, разработано новое соединение TPY5 – производное тиено-[2,3-d]-пиримидина, которое при различных способах введения, в том числе при пероральном способе доставки, снижало как базальный, так и стимулированный TRH уровни ТГ, действуя как инверсионный агонист рецептора ТТГ. В основе эффекта TPY5 лежит его ингибирующее влияние на экспрессию генов, вовлеченных в синтез ТГ в щитовидной железе, а также снижение экспрессии рецептора ТТГ. Несмотря на то, что ранее разработанный нами инверсионный агонист TP48 при его в/б введении сопоставим по активности с TPY5, он оказался неактивным при пероральном способе введения, что ограничивает его возможное применение в медицине. Тем самым, TPY5 может рассматриваться как прототип для создания лекарственных препаратов, предназначенных для лечения аутоиммунного гипертиреоза и офтальмопатии Грейвса, обусловленных выработкой в организме пациента стимулирующих аутоантител

к рецептору ТТГ, а также для лечения и профилактики токсических аденом и опухолей щитовидной железы, обусловленных конститутивно повышенной активностью рецептора ТТГ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены биоэтическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, протокол заседания № 4-2/2023 от 25.04.2023 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 19-75-20122). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.О.Ш. и К.В.Д.), сбор данных (А.А.Б., И.А.Л., В.Н.С.), химический синтез (Е.А.Д., В.Н.С.), обработка данных (А.А.Б., И.А.Л., В.Н.С., К.В.Д., А.О.Ш.), написание и редактирование манускрипта (К.В.Д., А.О.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Biondi B, Cappola AR, Cooper DS* (2019) Subclinical Hypothyroidism: A Review. *JAMA* 322(2): 153–160.
<https://doi.org/10.1001/jama.2019.9052>
2. *Vanderpump MP* (2011). The epidemiology of thyroid disease. *British medical bulletin* 99: 39–51.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldr030>
3. *Bekkering GE, Agoritsas T, Lytyn L, Heen AF, Feller M, Moutzouri E, Abdulazeem H, Aertgeerts B, Beecher D, Brito JP, Farhoumand PD, Singh Ospina N, Rodondi N, van Driel M, Wallace E, Snel M, Okwen PM, Siemieniuk R, Vandvik PO, Kuijpers T, Vermandere M* (2019) Thyroid hormones treatment for subclinical hypothyroidism: a clinical practice guideline. *BMJ* 365: l2006.
<https://doi.org/10.1136/bmj.l2006>
4. *Hoang TD, Stocker DJ, Chou EL, Burch HB* (2022) Update on Clinical Management of Graves Disease and Thyroid Eye Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 51(2): 287–304.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.12.004>
5. *Vos XG, Endert E, Zwinderman AH, Tijssen JG, Wiersinga WM* (2016) Predicting the Risk of Recurrence Before the Start of Antithyroid Drug Therapy in Patients With Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 101(4): 1381–1389.
<https://doi.org/10.1210/jc.2015-3644>
6. *Whitmer D, Phay JE, Holt S, O'Donnell B, Nguyen J, Joseph D, Chi A, Wu S, Hao Y, Huang J, Klopper JP, Kloos RT, Kennedy GC, Shin J* (2022) Risk of malignancy in cytologically indeterminate thyroid nodules harboring thyroid stimulating hormone receptor mutations. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1073592.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1073592>
7. *Langdon J, Gupta A, Sharbidre K, Czeyda-Pommersheim F, Revzin M* (2023) Thyroid cancer in pregnancy: diagnosis, management, and treatment. *Abdom Radiol (NY)* 48(5): 1724–1739.
<https://doi.org/10.1007/s00261-023-03808-1>
8. *Jäschke H, Neumann S, Moore S, Thomas CJ, Colson AO, Costanzi S, Kleinau G, Jiang JK, Paschke R, Raaka BM, Krause G, Gershengorn MC* (2006) A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). *J Biol Chem* 281(15): 9841–9844.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C600014200>

9. Kleinau G, Worth CL, Kreuchwig A, Biebermann H, Marcinkowski P, Scheerer P, Krause G (2017) Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 86.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00086>
10. Mezei M, Latif R, Das B, Davies TF (2021) Implications of an Improved Model of the TSH Receptor Transmembrane Domain (TSHR-TMD-TRIO). *Endocrinology* 162(7): bqab051.
<https://doi.org/10.1210/endo/bqab051>
11. Fokina EA, Shpakov AO (2022) Thyroid-stimulating hormone receptor: role in the development of thyroid pathology and its correction. *J Evol Biochem Physiol* 58(5): 1439–1454.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050143>
12. Neumann S, Huang W, Eliseeva E, Titus S, Thomas CJ, Gershengorn MC (2010) A small molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 151(7): 3454–3459.
<https://doi.org/10.1210/en.2010-0199>
13. Neumann S, Eliseeva E, McCoy JG, Napolitano G, Giuliani C, Monaco F, Huang W, Gershengorn MC (2011) A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): 548–554.
<https://doi.org/10.1210/jc.2010-1935>
14. Neumann S, Pope A, Geras-Raaka E, Raaka BM, Bahn RS, Gershengorn MC (2012) A drug-like antagonist inhibits thyrotropin receptor-mediated stimulation of cAMP production in Graves' orbital fibroblasts. *Thyroid* 22(8): 839–843.
<https://doi.org/10.1089/thy.2011.0520>
15. Marcinkowski P, Hoyer I, Specker E, Furkert J, Rutz C, Neuenschwander M, Sobottka S, Sun H, Nazare M, Berchner-Pfannschmidt U, von Kries JP, Eckstein A, Schülein R, Krause G (2019) A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 29(1): 111–123.
<https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
16. Derkach KV, Bakhtuykov AA, Sorokoumov VN, Shpakov AO (2020) New Thieno-[2,3-d]pyrimidine-Based Functional Antagonist for the Receptor of Thyroid Stimulating Hormone. *Dokl Biochem Biophys* 491(1): 77–80.
<https://doi.org/10.1134/S1607672920020064>
17. Derkach KV, Fokina EA, Bakhtuykov AA, Sorokoumov VN, Stepanchikina AM, Zakharova IO, Shpakov AO (2022) The Study of Biological Activity of a New Thieno[2,3-D]-Pyrimidine-Based Neutral Antagonist of Thyrotropin Receptor. *Bull Exp Biol Med* 172(6): 713–717.
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05462-x>
18. Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS, Shpakov AO (2014) Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl Biol Sci* 459: 326–329.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
19. Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47(12): 916–924.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
20. Chiamolera MI, Wondisford FE (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 150(3): 1091–1096.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-1795>
21. Ginsberg J (2003) Diagnosis and management of Graves' disease. *CMAJ* 168(5): 575–585.
22. Catania A, Guaitoli E, Carbotta G, Bianchini M, Di Matteo FM, Carbotta S, Nardi M, Fabiani E, Grani G, D'Andrea V, Fumarola A (2013) Total thyroidectomy for Graves' disease treatment. *Clin Ter* 164(3): 193–196.
<https://doi.org/10.7417/CT.2013.1548>
23. Ma C, Xie J, Wang H, Li J, Chen S (2016) Radioiodine therapy versus antithyroid medications for Graves' disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2(2): CD010094.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD010094.pub2>
24. Krieger CC, Boutin A, Jang D, Morgan SJ, Banga JP, Kahaly GJ, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC (2019) Arrestin- β -1 Physically Scaffolds TSH and IGF1 Receptors to Enable Crosstalk. *Endocrinology* 160(6): 1468–1479.
<https://doi.org/10.1210/en.2019-00055>
25. Cui X, Wang F, Liu C (2023) A review of TSHR- and IGF-1R-related pathogenesis and treatment of Graves' orbitopathy. *Front Immunol* 14: 1062045.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1062045>
26. Wiersinga WM (2011) Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: the result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *J Clin Endocrinol Metab* 96(8): 2386–2394.
<https://doi.org/10.1210/jc.2011-0307>

27. Шпаков АО, Деркач КВ, Дарьин ДВ, Лобанов ПС (2014). Активация аденилатциклазы тиенопиримидиновыми производными в семенниках и яичниках крыс. Цитология 56(5): 346–352. [Shpakov AO, Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS (2014) Activation of adenylyl cyclase in the testes and ovaries of rats using thienopyrimidine derivatives. Tsitologiya 56(5): 346–352. (In Russ)].
28. Деркач КВ, Легкодух АС, Дарьин ДВ, Шпаков АО (2016). Стимулирующее влияние тиенопиримидинов, структурных аналогов Org43553, на активность аденилатциклазы в семенниках и на продукцию тестостерона у самцов крыс. Цитология 58(8): 602–609. [Derkach KV, Legkodukh AS, Dar'in DV, Shpakov AO (2016) The stimulating effect of thienopyrimidines, the structural analogs of Org 43553, on the activity of adenylyl cyclase in the testes and on the testosterone production in male rats. Tsitologiya 58(8): 602–609. (In Russ)].
29. Chu YD, Yeh CT (2020) The Molecular Function and Clinical Role of Thyroid Stimulating Hormone Receptor in Cancer Cells. Cells 9(7): 1730. <https://doi.org/10.3390/cells9071730>
30. Jang D, Marcus-Samuels B, Morgan SJ, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC (2020) Thyrotropin regulation of differentiated gene transcription in adult human thyrocytes in primary culture. Mol Cell Endocrinol 518: 111032. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111032>
31. Jang D, Eliseeva E, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC (2022) TSH stimulation of human thyroglobulin and thyroid peroxidase gene transcription is partially dependent on internalization. Cell Signal 90: 110212. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110212>
32. Neumann S, Nir EA, Eliseeva E, Huang W, Marugan J, Xiao J, Dulcey AE, Gershengorn MC (2014) A selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. Endocrinology 155(1): 310–314. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1835>
33. Huang H, Chen L, Liang B, Cai H, Cai Q, Shi Y (2016) Upregulation of TSHR, TTF-1, and PAX8 in Nodular Goiter Is Associated with Iodine Deficiency in the Follicular Lumen. Int J Endocrinol 2016: 2492450. <https://doi.org/10.1155/2016/2492450>
34. Newton CL, Whay AM, McArdle CA, Zhang M, van Koppen CJ, van de Lagemaat R, Segaloff DL, Millar RP (2011) Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. Proc Natl Acad Sci U S A 108(17): 7172–7176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>

Low molecular inverse agonist of the thyrotropin receptor is active both intraperitoneal and oral administration

**K. V. Derkach^{a,*}, A. A. Bakhtyukov^a, V. N. Sorokoumov^{a,b}, I. A. Lebedev^a,
E. A. Didenko^{a,b}, and A. O. Shpakov^a**

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

^b*Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: derkach_k@list.ru

Autoimmune hyperthyroidism (Graves' disease), which is caused by stimulating autoantibodies to the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor, and thyroid gland (TG) tumors, caused by constitutively increased activity of this receptor, are widespread and have a poor prognosis. The drugs used to treat them are not very effective and have many side effects. One of the approaches for the treatment of these thyroid diseases may be the use of allosteric regulators of the TSH receptor with the activity of inverse agonists. The purpose of the work was to study the effects of our previously developed compound TP48 and the new compound TPY5, belonging to the class of thieno[2,3-d]-pyrimidines, on the basal and thyrotropin-releasing hormone (TRH)-stimulated levels of thyroid hormones (THs) in the blood of rats and on the expression of genes responsible for the synthesis of THs in the TG. The effectiveness of TP48 and TPY5 was studied both with intraperitoneal (i.p., 20 mg/kg) and oral (40 mg/kg) administration. Using ELISA, the levels of free

(fT4) and total (tT4) thyroxine and free (fT3) and total (tT3) triiodothyronine in the blood were assessed, including during TRH stimulation (intranasally, 300 µg/kg). The gene expression for thyroid peroxidase (*Tpo*), thyroglobulin (*Tg*), Na⁺/I⁻-symporter (*Nis*), type 2 deiodinase (*Dio2*) and TSH receptor (*Tshr*) in the TG was assessed using PCR. TPY5, with both routes of administration, reduced both basal and TRH-stimulated TH levels, while TP48 suppressed TH production only with i.p. administration. Orally administered TPY5 significantly reduced basal *Tpo* gene expression and TRH-stimulated *Tg* and *Dio2* gene expression. I.p. administered TP48 reduced only TRH-stimulated expression of the *Tg* and *Dio2* genes. Quite surprisingly, TPY5 (oral) and TP48 (i.p.) reduced basal *Tshr* gene expression and did not prevent its inhibition by TRH. Thus, the TPY5 compound we developed has the activity of an inverse agonist of the TSH receptor, is effective when administered orally, which is more in demand in medicine, and can be considered as a prototype of drugs to treat autoimmune hyperthyroidism and thyroid tumors.

Keywords: thyroid-stimulating hormone receptor, inverse agonist, allosteric regulator, thienopyrimidine, thyroxin, thyroliberin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ИНТЕРВАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК
В РАЗНЫХ РЕЖИМАХ НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС**

© 2024 г. К. А. Баранова¹, М. Ю. Зенько¹, Е. А. Рыбникова¹ *

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

*E-mail: rybnikovaea@infran.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Разработка способов повышения адаптационных резервов организма и устойчивости к негативным факторам продолжает оставаться для физиологии актуальной проблемой, имеющей значительный трансляционный потенциал в сферах здравоохранения, спорта, космонавтики и народного хозяйства. Многолетние исследования авторов доказали перспективность в этом отношении гипоксического гипобарического кондиционирования в барокамере. В настоящем исследовании принципы гипобарического кондиционирования были перенесены на модель нормобарической прерывистой гипоксии/нормоксии, обусловленной вдыханием газовых смесей, которая широко используется в практике для интервальных гипоксических тренировок человека. С использованием автоматизированной установки проведен сравнительный экспериментальный анализ молекулярно-клеточных изменений крови крыс в ответ на трехдневные интервальные гипоксические тренировки при 9, 12 или 16% O₂ в смеси. Показано, что наибольшее по длительности и амплитуде влияние на показатели клинического анализа крови крыс оказывал наиболее интенсивный и эффективный режим 3 × 9% O₂, индуцируя увеличение числа эритроцитов, снижение вариативности их объемов, а также сдвигая баланс лимфокиновых и монокиновых эффектов в сторону реакции спокойной активации. В первые сутки после тренировок при 9 и 12% кислорода достоверно снижалась общая антиоксидантная способность сыворотки с последующей быстрой нормализацией, что укладывается в динамику реакции про- и антиоксидантных систем на неповреждающую гипоксию. Выявлен характерный для кондиционирования стимулирующий эффект всех изученных режимов интервальных тренировок на базальную и стрессорную кортикостероидную активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. Все обнаруженные посттренировочные изменения могут быть отнесены к базисным адаптивным реакциям, способствующим повышению устойчивости к неблагоприятным факторам.

Ключевые слова: гипоксическое прекодиционирование, нормобарическая гипоксия, интервальная гипоксическая тренировка, клинический анализ крови, общая антиоксидантная способность сыворотки, кортикостерон

ВВЕДЕНИЕ

Интервальная гипоксическая тренировка (ИГТ) – это воздействие повторяющимися эпизодами умеренной гипоксии, чередующимися с эпизодами нормоксии или гипероксии [1]. В нормобарических условиях гипоксия достигается вдыханием газовых смесей с пониженным содержанием кислорода, обычно 10–16% [2]. Согласно многочисленным исследованиям и накопленному клиническому и санаторно-курортному опыту, ИГТ оказывает мощное неспецифическое терапевтическое действие на организм и соответственно может успешно использоваться в лечебных, оздоровительных и профилактических целях, а также применяться для повышения силы и выносливости здоровых людей и спортсменов. Несмотря на это, практический потенциал ИГТ в медицине до сих пор остается нереализованным, очевидно, вследствие недостаточности доказательной базы. Восполнить этот пробел в значительной степени могут экспериментальные исследования в моделях на животных, чем и обусловлена их актуальность.

Многолетние исследования нашей лаборатории, посвященные изучению нейропротективного и адаптогенного действия гипоксии, позволили создать и валидизировать режимы периодической гипобарической гипоксии, оказывающие широкий спектр превентивных и проадаптивных эффектов, обусловленных срочной многоуровневой мобилизацией адаптационных механизмов и повышением общей и специфической резистентности организма [см. обзор 3]. Наиболее протективным режимом оказалось трехкратное гипоксическое гипобарическое прекондиционирование с имитацией подъемов на высоту 5 000 м (эквивалентно 10% кислорода, 2 ч) с интервалом 24 ч. Использование этого режима в экспериментах на крысах позволило детально изучить молекулярно-клеточные и нейроэндокринные механизмы повышения устойчивости мозга и всего организма к таким неблагоприятным факторам, как тяжелая гипоксия и психоэмоциональные стрессы [4]. Несмотря на очевидную эффективность гипоксического гипобарического прекондиционирования, внедрение этого метода в медицинскую практику затруднено по ряду причин, среди которых риски высотной болезни и баротравм, потребность в соответствующих по характеристикам барокамерах, несоответствие рекомендациям Минздрава РФ, согласно которым разрешен “подъем” человека на высоту не выше 3500 м, и др. Вследствие этого нами была поставлена задача – разработать режимы гипоксического прекондиционирования в парадигме нормобарической гипоксии, осуществив синтез подходов ИГТ и принципов прекондиционирования, отличающихся от ИГТ, в частности, большей интенсивностью гипоксического воздействия, меньшим числом сеансов и дней воздействия. С целью решения поставленной задачи в настоящем исследовании с использованием установки для нормобарической гипоксии у грызунов проведен сравнительный экспериментальный анализ эффектов прекондиционирующих режимов $3 \times 9\% \text{ O}_2$, $3 \times 12\% \text{ O}_2$, $3 \times 16\% \text{ O}_2$ на показатели клинического анализа крови крыс, общую антиоксидантную способность сыворотки и базальную и стрессорную выработку кортикостерона гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системой.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 72 взрослых самцах крыс линии Вистар массой около 230 г из ресурсов ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. Крыс, содержавшихся в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище, разделили на 4 группы по 18 животных – интактный контроль и 3 экспериментальные группы.

Интервальные гипоксические тренировки

Для проведения на лабораторных животных из экспериментальных групп исследований ИГТ использовали разработанное нами и изготовленное АО “Технопарк Санкт-Петербурга” устройство, моделирующее кратковременные состояния нормобарической гипоксии, чередующиеся с периодами нормоксии. Устройство представляло собой автоматическую установку, моделирующую нормобарическую гипоксию в полугерметичной камере с грызунами за счет вытеснения кислорода воздуха поступающим в камеру из баллона азотом, а нормоксию – за счет продувки атмосферным наружным воздухом. Установка была оснащена цифровым газоанализатором кислорода и управлялась программно с компьютера через регулирующий блок и систему клапанов и вентиляторов в соответствии с заданными параметрами и показаниями кислородного датчика, что позволило изучить ИГТ в разных режимах.

Ранее нами были протестированы на адаптационную эффективность несколько режимов ИГТ, различающихся длительностью, кратностью и интенсивностью, и для настоящего сравнительного исследования отобраны три близких к “прекондиционирующим” режима, условно ранжированных на наиболее, средне и наименее эффективный. Выбранные режимы одинаковы по длительности – 3 дня, по кратности – 3 эпизода гипоксии по 5 мин в день, различаются по интенсивности – концентрация кислорода в гипоксической смеси на уровне 9%, 12% или 16%. Таким образом, все крысы из экспериментальных групп подвергались тренировкам в установке в течение 3 дней, получая каждый день по 3 эпизода 5-минутной нормобарической гипоксии с последующей 15-минутной реоксигенацией при нормоксии (отсчет времени каждого интервала начинался с момента достижения заданного уровня кислорода). У животных из первой по интенсивности ИГТ группы содержание кислорода в газовой гипоксической смеси составляло $9\% - 3 \times 9\% \text{ O}_2$, у среднеэффективной группы при тренировках O_2 был на уровне $12\% - 3 \times 12\% \text{ O}_2$, и группа с наименее действенным режимом ИГТ – $3 \times 16\% \text{ O}_2$.

Забор и обработка крови

На большую часть исследования, кроме определения стрессорного уровня кортикостерона (пункт *c* ниже), взятие крови проводилось при декапитации. По 6 крыс из каждой из 4 групп были декапитированы через 24 ч, 3 и 6 суток после последнего сеанса гипоксии.

а) Немедленно после декапитации дозатором отбирали около 0.2 мл туловищной крови в охлажденные ЭДТА-К3 микропробирки, осторожно переворачивали пробирки 10 раз и оставляли на холоде, периодически аккуратно перемешивая для предотвращения образования сгустков, до проведения в этот же день клинического анализа (см. далее) *цельной крови*.

б) Для получения *сыворотки post mortem* основную порцию туловищной крови после декапитации помещали в пробирки, не содержащие антикоагулянта, и оставляли примерно на 30 мин при комнатной температуре для образования сгустка. Далее центрифугировали при 3500 g в течение 15 мин при температуре 4 °C и аккуратно отбирали супернатант, стараясь не задеть подлежащий слой. Полученную сыворотку алиquotировали, замораживали и хранили при –20 °C до проведения исследования базального уровня кортикостерона или общей антиоксидантной активности (см. далее).

с) Для изучения стрессорных уровней кортикостерона использовали сыворотку *in vivo*, для чего получали периферическую кровь через 1 сутки после последнего сеанса ИГТ из хвоста у живых животных из групп Контроль, $3 \times 9\% \text{ O}_2$, $3 \times 12\% \text{ O}_2$ и $3 \times 16\% \text{ O}_2$, $n = 6$ в каждой, трехкратно – во время процедурного стресса и через 30 и 60 мин после его начала (см. ниже). Далее выделяли сыворотку, как описано в (b).

Клинический анализ крови

Общий анализ крови проводился после декапитации в первые постгипоксические сутки у животных из контрольной и всех трех экспериментальных групп, а также через 3 и 6 дней после ИГТ у животных из группы $3 \times 9\% \text{ O}_2$. Клинический анализ крови осуществлен с использованием автоматизированного гематологического анализатора BC-30 Vet (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co.Ltd, КНР), который способен выполнять дифференцировку лейкоцитов на 3 субпопуляции и анализ проб, полученных у крыс, по 21 параметру – число лейкоцитов (WBC), лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и их процентное содержание, количество эритроцитов (RBC), тромбоцитов, крупных тромбоцитов, их относительное количество и средний объем, концентрация гемоглобина, среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроцитах, коэффициент вариации (RDW-CV) и стандартное отклонение (RDW-SD) ширины распределения эритроцитов, гематокрит и ширина распределения тромбоцитов, а также представляет гистограммы лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. При анализе использовался режим предварительного разведения, для чего цельную туловищную кровь с ЭДТА добавляли в специальный разбавитель непосредственно перед помещением в гемализатор в двух параллельных пробах.

Общая антиоксидантная способность

На общую антиоксидантную способность анализировали в двух параллельных пробах сыворотку туловищной крови каждого из 72 животных в данной работе, то есть всех крыс контрольной и трех ИГТ групп, декапитированных через 1, 3 и 6 суток после гипоксии. Для исследования использовали набор для колориметрического анализа (ABTS, химический метод) общей антиоксидантной способности (T-AOC) (Elabscience Biotechnology Inc., КНР). Для оценки антиоксидантной способности к пробе, согласно инструкции, добавляли ABTS и окислитель, окисляющий его до катион-радикала ABTS^{•+}, который может восстанавливаться антиоксидантами пробы. Затем содержание ABTS^{•+} в смеси измеряли по поглощению при 734 нм с помощью планшетного спектрофотометра FlexA-200 (Hangzhou Allsheng Instruments Co.Ltd., КНР). В качестве эталонного антиоксиданта использовался тролокс, T-AOC которого равна 1, результаты представлены в ммоль/л тролоксового эквивалента.

Базальный уровень кортикостерона

В течение 6 дней после последнего эпизода гипоксии/реоксигенации проводили мониторинг состояния конечного звена гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), которое оценивали на основании определения содержания основного глюкокортикоидного гормона крыс – кортикостерона – в сыворотке крови. Базальный уровень кортикостерона определяли у всех животных всех групп в туловищной крови, полученной при декапитации через 1, 3 и 6 дней после ИГТ. Содержание кортикостерона определяли методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с набором реагентов “Кортикостерон крыса/мышь” ИФА (ООО “Хема”, РФ) в двух параллельных пробах. Результаты окрашивания в микропланшетах анализировали с помощью спектрофотометра FlexA-200 (Hangzhou Allsheng Instruments Co.Ltd., КНР).

Стрессорные уровни кортикостерона

Анализ динамики нарастания уровня кортикостерона в ответ на несильный стресс является тестом на быструю обратную глюкокортикоидную связь ГГАС. Тест проводился через 1 день после последнего сеанса ИГТ, у 6 крыс из каждой группы в нулевой точке проводили взятие крови из хвоста, держа их при этом в руках, что является про-

цедурным стрессом невысокой интенсивности. Для определения стрессорного уровня кортикостерона затем производился забор периферической крови из хвоста через 30 и 60 мин. после первого взятия, $n = 6$ для каждой точки. Выделение сыворотки и анализ содержания гормона в пробах осуществляли, как описано ранее.

Анализ и представление данных

Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку среднего в подгруппах животных. В каждый срок было исследовано по 6 крыс из каждой группы соответственно, $n = 6$ для каждой точки, но при обработке показателей общего анализа крови были объединены данные подгрупп Контроль 1 сутки и Контроль 3 суток в единый массив Контроль с $n = 12$. Статистическую обработку проводили средствами однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (Statistica 7.0) с апостериорным сравнением методом Фишера, если распределение выборки являлось нормальным, а дисперсии групп равны. В противном случае использовали непараметрический тест ANOVA Kruskal-Wallis. Различия между группами считали достоверными при $p \leq 0.05$, они отмечены * на диаграммах. Результаты по экспериментальным подгруппам представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинический анализ и лейкоцитарная формула крови в первые сутки после ИГТ в разных режимах

С помощью ветеринарного геманализатора BC-30 Vet был выполнен клинический анализ крови, проведена дифференцировка лейкоцитов и измерена концентрация гемоглобина в пробах туловищной крови животных контрольной группы ($n = 12$) и трех групп, подвергавшихся трехкратным интервальным гипоксическим тренировкам различной интенсивности в течение трех дней ($3 \times 9\% O_2$, $3 \times 12\% O_2$ и $3 \times 16\% O_2$, $n = 6$ в каждой) через 24 ч после последней тренировки.

Для группы ИГТ $3 \times 9\% O_2$ в первые сутки наблюдался достоверный ($p = 0.02$) рост общего числа лейкоцитов (рис. 1а) до $12.4 \pm 1.1 \times 10^9$ клеток/л от контрольных 9.7 ± 0.5 , который происходил в основном за счет увеличения более чем на 25% количества лимфоцитов ($p < 0.01$, рис. 1б), содержание которых в трех пробах этой группы настолько превышало норму для здоровых крыс, что классифицировалось анализатором как лимфоцитоз. Общее количество моноцитов в ранние сроки после ИГТ в разных режимах изменялось незначительно ($F_{(3, 24)} = 1.12$; $p = 0.36$, рис. 1с), но варьировала их доля в общем лейкоцитарном пуле ($F_{(3, 24)} = 5.17$; $p < 0.01$). Такие показатели как общее и относительное количество гранулоцитов, тромбоцитов и крупных тромбоцитов, их объем, ширина распределения и тромбоцит изменений через 24 ч. после ИГТ не претерпели.

Показано достоверное относительно контрольной группы (144.5 ± 3.2 г/л) увеличение содержания гемоглобина (рис. 1д) в крови в 1-е сутки в ответ на ИГТ в интенсивных режимах ($3 \times 9\% O_2$: 159.8 ± 4.2 г/л, $p = 0.02$; $3 \times 12\% O_2$: 158.5 ± 6.6 г/л, $p = 0.03$) и заметное повышение числа эритроцитов (рис. 1е) в этих условиях, разница в среднем их количестве между контролем и ИГТ группой $3 \times 12\% O_2$ составляла 1.02×10^{12} красных кровяных клеток на литр. При этом не отмечалось значимых изменений в показателях гематокрита, среднего объема эритроцита или содержания в нем гемоглобина.

В рассматриваемые сроки отмечается позитивное влияние ИГТ на коэффициент вариации и стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (рис. 1ф), причем именно тренировка в средне- или малоинтенсивном режиме достаточно эф-

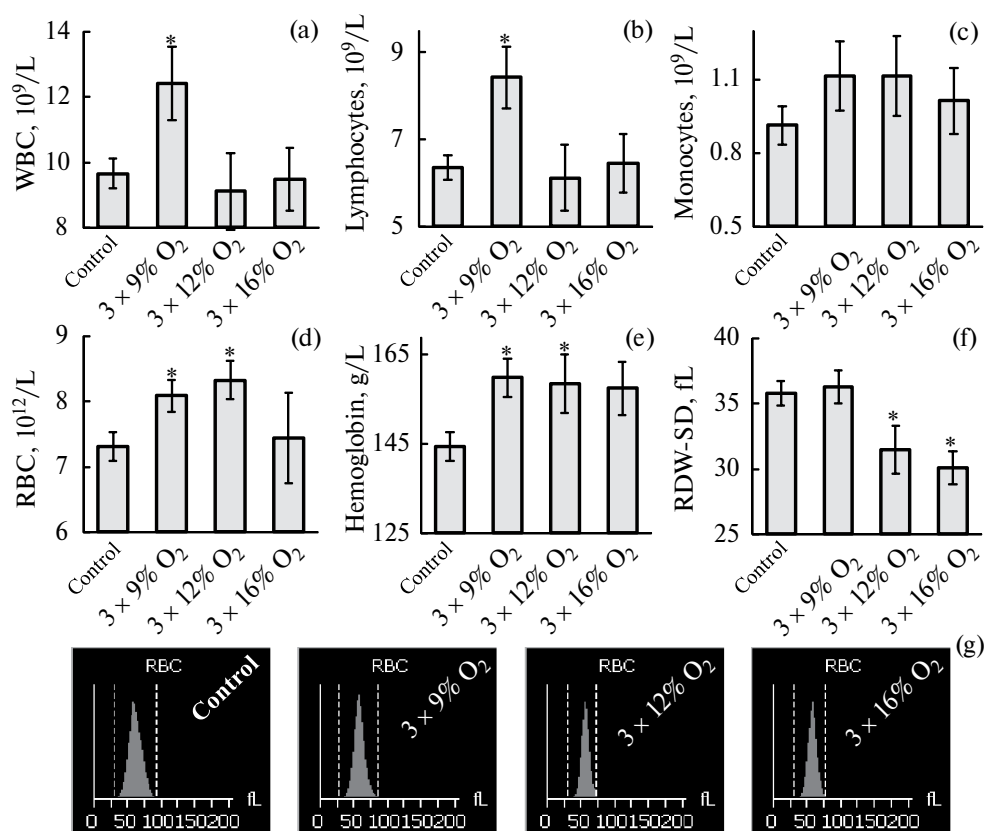


Рис. 1. Влияние ИГТ в различных режимах на показатели общего анализа крови крыс через 24 ч. после окончания тренировки. (а) – общее число лейкоцитов (WBC), 10⁹ клеток/л; (б) – количество лимфоцитов, 10⁹/л; (с) – число моноцитов, 10⁹/л; (д) – количество эритроцитов (RBC), 10¹²/л; (е) – концентрация гемоглобина, г/л; (ф) – стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (RDW-SD), фемтолитры. (г) – примеры гистограмм распределения эритроцитов (RBC) по размерам, фл. Control – контрольные интактные животные; 3 × 9% O₂, 3 × 12% O₂ и 3 × 16% O₂ – группы крыс, подвергавшихся ИГТ при содержании кислорода в смеси на уровне 9, 12 или 16% соответственно.

фективно воздействует на отклонения размеров эритроцитов от среднего нормального. Например, умеренная 3 × 16% O₂ ИГТ снижает RDW-SD (Red Cell Distribution Width – Standard Deviation), которое соответствует ширине гистограммы (рис. 1г) на уровне 20% (пик взят за 100%), с 35.76 ± 0.95 до 31.45 ± 1.82 фл., $p < 0.01$.

Динамика изменений показателей общего анализа крови на 1-е, 3-и и 6-е сутки после интенсивной 3 × 9% O₂ ИГТ

Следующим этапом работы стало проведение клинического анализа крови для группы крыс, подвергшихся наиболее эффективной интервальной тренировке при 9% кислорода в газовой смеси, через 1, 3 и 6 дней после последнего сеанса гипоксии ($n = 6$ для каждой точки).

Для изучаемого режима 3 × 9% O₂ показано постепенное снижение общего количества моноцитов к 6-м суткам после гипоксии ниже контрольного уровня и более выра-

женное снижение их процентного содержания в общем числе лейкоцитов (контроль: $9.44 \pm 0.62\%$; $3 \times 9\% \text{ O}_2$ 3-и сутки: $6.58 \pm 0.58\%$, $p < 0.01$; $3 \times 9\% \text{ O}_2$ 6-е сутки: $6.83 \pm 0.33\%$, $p < 0.01$, рис. 2с) и одновременно заметный рост общего числа лимфоцитов с первого постгипоксического дня, с отложенным на более поздние сроки увеличением их удельной доли (контроль: $65.96 \pm 1.48\%$; $3 \times 9\% \text{ O}_2$ 6-е сутки: $72.03 \pm 0.96\%$, $p < 0.01$, рис. 2б). Увеличение процентного содержания лимфоидных клеток в лейкоцитарном пуле происходило на фоне отсроченной нормализации общего количества белых кровяных телец в поздний посттренировочный период (рис. 2а). Так, если вплоть до 3 суток после $3 \times 9\% \text{ O}_2$ ИГТ программа гематологического анализа определяла превышение референсных интервалов по лейкоцитам в 30% проб, то к 6-м суткам средние значения опытной и контрольной групп сравнялись ($p = 0.9$). На 3-и и 6-е дни после ИГТ, как и в первые 24 ч, значительных изменений по гранулоцитам и тромбоцитам выявлено не было.

Показано, что рост числа эритроцитов (рис. 2д) и уровня гемоглобина (рис. 2е) в этой группе носил транзитный характер и к 3 суткам нивелировался. Напротив, достоверное снижение коэффициента вариации ширины распределения эритроцитов относительно контроля наблюдалось на 3-и – 6-е сутки после $3 \times 9\% \text{ O}_2$ ИГТ (рис. 2ф, г). У контрольных животных средний RDW-CV (Red Cell Distribution Width – Coefficient of Variation) составлял $15.7 \pm 0.3\%$, а у тренировавшихся при 9% кислорода животных уровень вариации на 3-и сутки снижался до $13.3 \pm 0.2\%$, $p < 0.01$, сходная тенденция прослеживалась и на 6-й день, но не в первый (рис. 2ф, г). Других эритроцитарных изменений в исследованный период времени выявлено не было.

Общая антиоксидантная способность сыворотки крови крыс на 1-е, 3-и и 6-е дни после ИГТ при 9, 12 и 16% кислорода

Сыворотка крови крыс контрольной и трех экспериментальных ИГТ групп, полученная на 1-е, 3-и и 6-е посттренировочные дни ($n = 6$ для каждой точки), была протестирована на так называемую общую антиоксидантную способность, что, по утверждению производителей ABTS набора реагентов, позволяет оценить условно суммарный эффект основных антиоксидантов плазмы.

На рис. 2h видно, что неэффективные тренировки в режиме $3 \times 16\% \text{ O}_2$ практически не оказывали влияния на антиоксидантную способность крови животных на протяжении всего периода наблюдений ($F_{(3, 19)} = 0.92$; $p = 0.45$, черные столбики). Т-АОС (Total Antioxidant Capacity) крови снижалась на 1.7–1.8 миллимоль эквивалента эталонного антиоксиданта тролокса на литр в ранний период после более интенсивных тренировок при 9% ($p < 0.01$, рис. 2h, серые столбики) и 12% ($p < 0.01$, рис. 2h, штрихованные столбики) кислорода в газовой смеси, но уже к 3-му дню антиоксидантная способность возвращалась к нормальным значениям и далее существенно не изменялась.

Базальный и стрессорный уровни кортикостерона крови после разных режимов ИГТ

Был проведен мониторинг базального уровня гормона кортикостерона в сыворотке туловищной крови в течение 6 суток после последнего сеанса ИГТ в экспериментальных группах $3 \times 9\% \text{ O}_2$, $3 \times 12\% \text{ O}_2$ и $3 \times 16\% \text{ O}_2$ и у контрольных животных ($n = 6$ в каждой точке). Выявлено, что нормобарические гипоксические тренировки во всех протестированных режимах сопровождались практически трехкратным повышением содержания данного глюкокортикоидного гормона выше контрольных значений в ранний постгипоксический период ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p = 0.02$, рис. 3а, первый день). В группе интенсивной ИГТ $3 \times 9\% \text{ O}_2$ наблюдалась незначительная тенденция к более градуальной нормализации уровня кортикостерона (Контроль 3-и сутки: 183 ± 71 нмоль/л; $3 \times 9\% \text{ O}_2$ 3-и сутки: 361 ± 84 нмоль/л, $p = 0.1$; Контроль 6-е сутки:

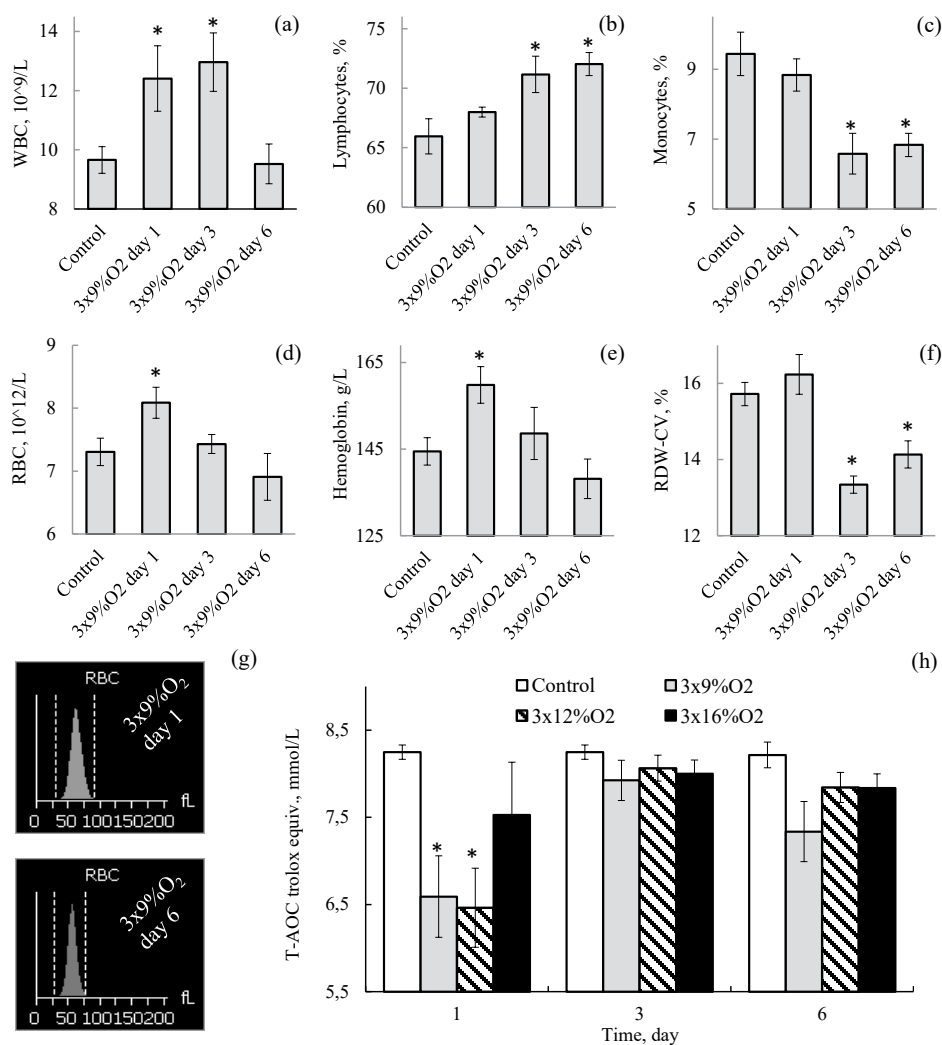


Рис. 2. Динамика изменений клеточной формулы крови на 1-е, 3-и и 6-е сутки после ИГТ в режиме $3 \times 9\% O_2$ (a-g) и общей антиоксидантной способности сыворотки после ИГТ при 9, 12 и 16% кислорода (f). (a) – общее количество лейкоцитов (WBC), 10^9 клеток/л. (b) – доля лимфоцитов от общего числа лейкоцитов, %. (c) – относительное процентное содержание моноцитов, %. (d) – количество эритроцитов (RBC), $10^{12}/л$. (e) – концентрация гемоглобина, г/л. (f) – коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов (RDW-CV), %. (g) – гистограммы распределения эритроцитов, фл. (h) – общая антиоксидантная способность (T-AOC) сыворотки крови в тролоховом эквиваленте, ммоль/л. Обозначения: Белые столбики – Control, контрольная группа, не проходившая ИГТ; серые – $3 \times 9\% O_2$, группа ИГТ при уровне кислорода 9%; штрихованные – $3 \times 12\% O_2$, крысы, тренировавшиеся при оксигенации 12%; черные – $3 \times 16\% O_2$, содержание кислорода в смеси для ИГТ животных составляло 16%.

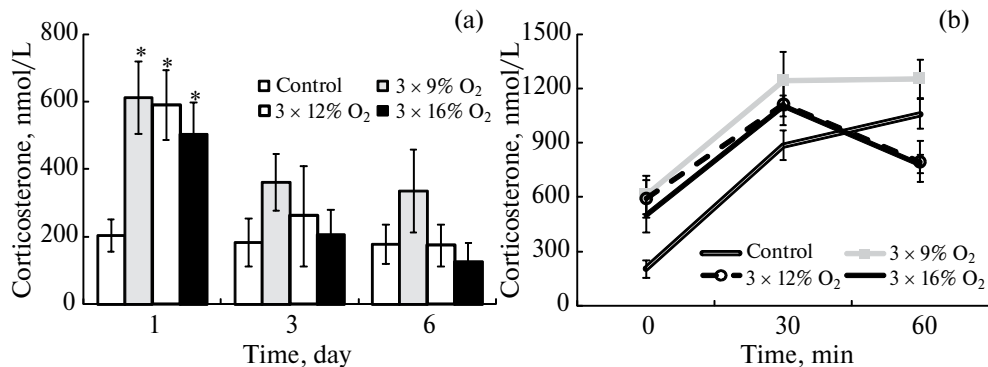


Рис. 3. Влияние ИГТ на базальный (а) и стрессорный (б) уровни кортикостерона в сыворотке крови. По оси абсцисс – дни после последнего сеанса ИГТ (а) или минуты от начала процедурного стресса (б); по оси ординат – содержание кортикостерона в сыворотке, нмоль/л. Остальные обозначения – как на рис. 2.

177 ± 57 нмоль/л; 3 × 9% O₂ 6-е сутки: 334 ± 122 нмоль/л, $p = 0.2$, рис. 3а, серые столбики), он до 6-го дня оставался недостоверно условно повышенным. У остальных животных постгипоксический выброс гормона носил еще более кратковременный характер.

Вторым этапом гормональных исследований последствий ИГТ стала оценка динамики постстрессорных изменений уровня кортикостерона в периферической крови крыс, проведенная через 24 ч после последней тренировки ($n = 6$ для каждой точки). Так называемый тест на глюкокортикоидную быструю обратную связь у контрольной группы продемонстрировал нормальную реактивность ГАС в ответ на процедурный стресс, что выражалось в нарастании стрессорного уровня кортикостерона с первой по 60-ю минуту наблюдения (рис. 3б, белая линия). У животных, подвергшихся ИГТ в режимах 3 × 12% O₂ и 3 × 16% O₂, уровень кортикостерона в сыворотке на 60-й минуте после начального взятия крови оказывался ниже, чем к 30-минутному сроку ($F_{(3, 20)} = 4.25$, $p = 0.02$), что может свидетельствовать о преждевременной инактивации ГАС и раннем включении быстрого глюкокортикоидного торможения (рис. 3б, черная и пунктирная линии). В группе ИГТ 3 × 9% O₂ содержание стрессорного гормона в часовой точке не снижалось относительно 30-минутной (рис. 3б, серая линия), то есть продолжалась фаза активации ГАС, что характерно для ее нормальной динамики в ответ на стресс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось выше, гипоксия является одним из факторов, который может быть эффективным инструментом для немедикаментозного повышения адаптационных возможностей и устойчивости организма человека. В настоящее время наиболее распространено применение гипоксического фактора в рамках подходов нормобариической ИГТ для индукции адаптивных изменений, повышающих физическую выносливость спортсменов, а также улучшающих общее состояние здоровья при санаторно-курортном лечении. Большой потенциал ИГТ для медицины остается практически нереализованным вследствие того, что индуцируемые ИГТ механизмы изучены достаточно слабо, в том числе мало внимания уделяется изменениям, индуцируемым гипоксическими тренировками в крови. На сегодня известно, что ИГТ увеличивает концентрацию в крови эритропоэтина, который способен стимулировать эритропоэз и гемопоэз, снижает уровень лактата и повышает содержание щелочной фосфатазы [по 5]. Однако стоит отметить, что каждое конкретное исследование и его результаты

зависят от многих факторов и, прежде всего, от протокола тренировок, сопутствующих нагрузок, а также от выборки испытуемых, их возраста, пола, здоровья и т.д. Наибольшее число обнаруженных работ посвящены тренировкам спортсменов в длительном режиме. Например, у спортсменов-велосипедистов через 2 суток после 10 дней ИГТ отмечен рост концентрации лактата в крови [6], после 3-недельной ИГТ у профессиональных гребцов достоверно снижался уровень лейкоцитов, остальные показатели крови не изменялись или совпадали с таковыми после тренировки при нормоксии [7], ИГТ в течение 6 недель приводили к повышению содержания эритропоэтина, гематокрита и числа нейтрофилов, снижая количество лимфоцитов у бегуний-любителей [8].

В данной работе было показано, что на ранних сроках после краткосрочной прекодиционирующей ИГТ в интенсивных режимах увеличивается число эритроцитов и концентрация гемоглобина, а наиболее адаптационно эффективный режим $3 \times 9\% \text{ O}_2$ индуцирует долгосрочные изменения в вариативности объемов эритроцитов. В целом, любое существенное снижение парциального давления кислорода активирует выброс эритроцитов из депо и повышает содержание гемоглобина крови, тем самым улучшая газотранспортную функцию крови и соответственно увеличивая степень насыщения клеток и тканей кислородом. Обнаруженное увеличение числа эритроцитов в крови после ИГТ обратно пропорционально содержанию кислорода в газовой смеси и носит временный характер, очевидно, не затрагивая эритропоэз, что относит этот эффект к срочной адаптации, в то время как уменьшение ширины распределения эритроцитов по объему ассоциируется с более длительным адаптационным эффектом, например, с адаптацией к продолжительной физической нагрузке [9], что требует некоторого времени для напряжения регуляторных механизмов, направленных на мобилизацию функциональных резервов.

К воздействиям разных по силе эндогенных и экзогенных раздражителей любого рода (физических и психологических) наибольшей среди всех субпопуляций лейкоцитов чувствительностью обладают лимфоциты. Выраженная и длительная реакция со стороны лимфоидного ростка отмечена исключительно на наиболее интенсивное гипоксическое воздействие. У человека повышение числа лимфоцитов с одновременным падением уровня моноцитов может трактоваться как усиление иммунных процессов. Индекс иммунореактивности по Иванову [10] отражает отношение содержания лимфоцитов и эозинофилов в крови к числу моноцитов, то есть баланс лимфокиновых и монокиновых эффектов, его длительное повышение у крыс группы $3 \times 9\% \text{ O}_2$ предположительно, как и у человека, может свидетельствовать о нарастании противовоспалительных медиаторов и о благоприятной динамике иммунных реакций. Повышенному уровню лимфокиновых эффектов сопутствовало умеренное повышение индекса напряженности адаптации (по Гаркави [11]), которое можно трактовать как реакцию спокойной активации, сопровождающуюся хорошим самочувствием, повышением резистентности организма в целом, ростом местного иммунитета, гормональной активности, основного обмена.

Ключевая роль в клеточной и тканевой адаптации к дефициту кислорода принадлежит фактору транскрипции HIF-1, важным механизмом действия которого является увеличение внеклеточных сигнальных эффектов аденозина, одного из центральных регуляторов воспаления, связанного с гипоксией. Рецепторы аденозина Adora2b, экспрессирующиеся на иммунных клетках, способны оказывать как противо-, так и провоспалительные эффекты в зависимости от срока действия и концентрации аденозина [12]. Таким образом, выявленные в данной работе особенности динамики уровня лимфоцитов могут быть обусловлены различиями в профилях активации HIF-1/аденозина после кондиционирующих трехдневных кратких ИГТ и 2–6-недельных длительных тренировок, описанных в литературе. Помимо изменений в лейкоцитарной формуле ИГТ способна повышать циркулирующие уровни некоторых воспалительных маркеров, являющихся потенциальными триггерами клеточного адаптивного перепрограм-

мирования, что приводит к терапевтическим эффектам против когнитивной дисфункции и нейропатологических изменений, как продемонстрировано для 3-недельных тренировок в режиме гипоксия/гипероксия [13] и требует дальнейшего изучения для прекондиционирующих режимов ИГТ.

Нейтрализация избыточного образования активных форм кислорода и свободных радикалов осуществляется многокомпонентной антиоксидантной системой; в плазме крови человека это, прежде всего, альбумин и мочевиная кислота, а также аскорбиновая кислота, витамин Е, аминокислоты, микроэлементы, промежуточные продукты обмена и др. Общая антиоксидантная способность сыворотки, определяемая в ABST системе, позволяет дать условную оценку эффекту от основных антиоксидантов, преимущественно альбумина, урата и аскорбата. Также к настоящему времени известно, что ИГТ активирует внутриклеточные гипоксические сигнальные пути, это приводит к увеличению концентрации активных форм кислорода, которые активируют обширную защитную программу, например, способствуют увеличению синтеза митохондрией, повышению их функциональной активности и улучшению окислительного метаболизма, а также стимулируют экспрессию генов, которые в дальнейшем обеспечивают антиоксидантную и противовоспалительную цитопротекцию [14–15]. Наблюдаемое нами снижение общей антиоксидантной способности крови в 24-часовой точке после ИГТ с последующей быстрой нормализацией укладывается в динамику адаптационной реакции про- и антиоксидантных систем на гипоксию, при которой на начальном этапе показатели T-AOC закономерно снижаются за счет оксидативного стресса, активирующего приспособительные сигнальные пути. В дальнейшем баланс восстанавливается, характеризуя достижение стадии устойчивой адаптации. Важнейшим следствием инициации редокс-сигналикации является активация факторов транскрипции HIF-1, NF-κB и AP-1, индуцирующих ферменты антиоксидантной защиты и репарации, белки теплового шока, Fe-регуляторы, эффекторы NO-синтазы, белки каналов митохондрий и др., обеспечивающих устойчивость клеток к стрессорным воздействиям и контроль процессов неспецифического и адаптивного иммунитета [16].

Нейроэндокринная система играет одну из ключевых ролей при формировании толерантности различной природы, в частности, степень резистентности организма, индуцируемая профилактическими воздействиями, зачастую коррелирует с амплитудой вызываемой ими активации ГГАС. Обнаруженный в данной работе характерный стимулирующий эффект ИГТ на базальную кортикостероидную активность ГГАС относится к базисным адаптивным механизмам. Сходное трехкратное на пике повышение уровня кортикостерона наблюдалось на раннем сроке при изучении эффективных режимов гипоксического гипобарического прекондиционирования, которые повышали устойчивость мозга к гипоксии и стрессам, в том числе за счет предотвращения гормональной дисфункции [17]. Постепенная нормализация базального уровня кортикостерона в течение нескольких дней также характерна для наиболее эффективного режима гипобарического воздействия. Помимо умеренного повышения базального уровня глюкокортикоидов у крыс в ранний период после воздействия, кондиционирующая гипобарическая гипоксия также сопровождалась возрастанием стрессореактивности ГГАС на ранних стадиях формирования гипоксической толерантности [17].

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что проведенное исследование доказало применимость принципов кондиционирования к парадигме нормобарической интервальной гипоксической тренировки. На основании сравнительного анализа протоколов разной интенсивности воздействия выявлен режим, вызывающий наибольшие проадаптивные сдвиги исследуемых показателей крови. Целесообразно дальнейшее исследование эффектов данного режима и запускаемых им физиологических реакций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 06/23 от 23 июня 2022 г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 22-25-00781). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и разработка концепции работы (Е.А.Р.), дизайн работы, планирование экспериментов, сбор и обработка данных (К.А.Б., М.Ю.З.), написание и редактирование манускрипта (К.А.Б., Е.А.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колчинская АЗ, Остапенко ЛА, Цыганова ТН (2003). Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте: Руководство для врачей. М. Медицина. [Kolchinskaja AZ, Ostapenko LA, Tsyganova TN (2003) Normobaric interval hypoxic training in medicine and sports: A guide for physicians. M. Meditsina. (In Russ)].
2. Карааш ЮМ, Стрелков РБ, Чижов АЯ (1988). Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации. М. Медицина. [Karash YM, Strelkov RB, Chizhov AY (1988) Normobaric hypoxia in treatment, prevention and rehabilitation. M. Meditsina. (In Russ)].
3. Samoilov MO, Rybnikova EA (2013) Molecular-cellular and hormonal mechanisms of induced tolerance of the brain to extreme environmental factors. *Neurosci Behav Physi* 43: 827–837. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9813-1>
4. Rybnikova E, Samoilov M (2015) Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre- and postconditioning using hypobaric hypoxia. *Front Neurosci* 9: 388. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00388>
5. Бондаренко НН, Хомутов ЕВ, Ряполова ТЛ, Кишеня МС, Игнатенко ТС, Толстой ВА, Евтушенко ИС, Туманова СВ (2023). Молекулярно-клеточные механизмы ответа организма на гипоксию. Ульяновск мед.-биол. журн. 2: 6–29. [Bondarenko NN, Homutov EV, Riapolova TL, Kishenia MS, Ignatenko TS, Tolstoi` VA, Evtushenko IS, Tumanova SV (2023) Molecular and cellular mechanisms of the body's response to hypoxia. *Ul'ianovsk med-biol zhurn* 2: 6–29. (In Russ)]. <https://doi.org/10.34014/2227-1848-2023-2-6-29>
6. Hamlin MJ, Marshall HC, Hellemans J, Ainslie PN, Anglem N (2010) Effect of intermittent hypoxic training on 20 km time trial and 30 s anaerobic performance. *Scand J Med Sci Sports* 20(4): 651–661. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.00946.x>
7. Teległow A, Mardyla M, Mysza K, Palka T, Maciejczyk M, Bujas P, Mucha D, Ptaszek B, Marchewka J (2022) Effect of Intermittent Hypoxic Training on Selected Biochemical Indicators, Blood Rheological Properties, and Metabolic Activity of Erythrocytes in Rowers. *Biology* 11(10): 1513. <https://doi.org/10.3390/biology11101513>
8. Park HY, Jung WS, Kim SW, Kim J, Lim K (2022) Effects of Interval Training Under Hypoxia on Hematological Parameters, Hemodynamic Function, and Endurance Exercise Performance in Amateur Female Runners in Korea. *Front Physiol* 13: 919008. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.919008>
9. Иванов ДГ, Александровская НВ, Афонькина ЕА, Ерошкин ПВ, Семенов АН, Бусыгин ДВ (2017). Адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении физической нагрузки в методике “Бег на treadmiller”. *Биомедицина* 2: 4–22. [Ivanov DG, Alexanderovskaia NV,

- Afon'kina EA, Eroshkin PV, Semenov AN, Busygin DV* (2017) Adaptive changes in rats during daily exercise in the "Treadmill Running" technique. *Biomedicina* 2: 4–22 (In Russ)].
10. *Иванов ДО, Шабалов НП, Шабалова НН, Курзина ЕА, Костючек ИИ* (2002). Лейкоцитарные индексы клеточной реактивности как показатель наличия гипо- и гиперэргического вариантов неонатального сепсиса. Электронный ресурс MedLinks. Ru Педиатрия и неонатология [*Ivanov DO, Shabalov NP, Shabalova NN, Kurzina EA, Kostjuchek IN* (2002) Leukocyte indices of cellular reactivity as an indicator of the presence of hypo- and hyperergic variants of neonatal sepsis. (In Russ)].
 11. *Гаркави ЛХ, Квакина ЕБ, Уколова МА* (1990). Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д. Изд-во Рост. ун-та. [*Garkavi LH, Kvakina EB, Ukolova MA* (1990) Adaptive reactions and resistance of the body. Rostov n/D. Izd-vo Rost. univer. (In Russ)].
 12. *Kiers D, Wielockx B, Peters E, van Eijk LT, Gerretsen J, John A, Janssen E, Groeneveld R, Peters M, Damen L, Meneses AM, Krüger A, Langereis JD, Zomer AL, Blackburn MR, Joosten LA, Netea MG, Riksen NP, van der Hoeven JG, Scheffer GJ, Eltzschig HK, Pickkers P, Cox M* (2018) Short-Term Hypoxia Dampens Inflammation *in vivo* via Enhanced Adenosine Release and Adenosine 2B Receptor Stimulation. *EBioMedicine* 33: 144–156.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.021>
 13. *Serebrovska ZO, Xi L, Tumanovska LV, Shysh AM, Goncharov SV, Khetsuriani M, Kozak TO, Pashevin DA, Dosenko VE, Virko SV, Kholin VA, Grib ON, Utko NA, Egorov E, Polischuk AO, Serebrovska TV* (2022) Response of Circulating Inflammatory Markers to Intermittent Hypoxia-Hyperoxia Training in Healthy Elderly People and Patients with Mild Cognitive Impairment. *Life (Basel)* 12(3): 432.
<https://doi.org/10.3390/life12030432>
 14. *Millet GP, Roels B, Schmitt L, Woors X, Richalet JP* (2010) Combining hypoxic methods for peak performance. *Sports Med* 40(1): 1–25.
<https://doi.org/10.2165/11317920-000000000-00000>
 15. *Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM* (2015) Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochem Res* 40(12): 2570–2582.
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1481-1>
 16. *Sazontova TG, Bolotova AV, Kostin NV* (2011) Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), HSPs, antioxidant enzymes and membrane resistance to ROS in endurance exercise performance after adaptive hypoxic preconditioning. *Adaptat Biol Med* 6: 161–179.
 17. *Rybnikova EA, Mironova VI, Pivina SG, Ordyan NE, Tulkova EI, Samoilov MO* (2008) Hormonal mechanisms of neuroprotective effects of the mild hypoxic preconditioning in rats. *Dokl Biol Sci* 421: 239–240.
<https://doi.org/10.1134/s0012496608040054>

Influence of Interval Hypoxic Training in Different Regimes on the Blood Parameters of Rats

K. A. Baranova^a, M. Y. Zenko^a, and E. A. Rybnikova^{a,*}

^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: rybnikovaea@infran.ru*

The development of ways to increase the adaptive reserves of the body and resistance to negative factors continues to be an urgent problem for physiology, which has a significant translational potential in the fields of healthcare, sports, cosmonautics and the national economy. Long-term authors studies have proved the promise in this respect of hypoxic hypobaric conditioning in a pressure chamber. In the present study, the principles of hypobaric conditioning were transferred to the model of normobaric intermittent hypoxia/normoxia caused by the inhalation of gas mixtures, which is widely used in practice for human interval hypoxic training. A comparative experimental analysis of molecular and cellular changes in the blood of rats in response to three-day interval hypoxic training at 9, 12, or 16% O₂ in the mixture was carried out using an automated setup. It was shown that the most intense and effective 3 × 9% O₂ regimen, in terms of duration and amplitude, had the greatest effect on the parameters of the clinical blood test of rats, initiating an

increase in the number of erythrocytes and a decrease in the variability of their volumes, and causing a shift in the balance of lymphokine and monokine effects towards a calm activation reaction. On the first day after training at 9 and 12% oxygen, the total antioxidant capacity of serum significantly decreased, followed by rapid normalization, which fits into the dynamics of the reaction of pro- and antioxidant systems to non-damaging hypoxia. The stimulating effect of all the studied regimens of interval training on the basal and stress activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system, characteristic of conditioning, was revealed. All detected post-training changes can be attributed to the basic adaptive mechanisms that increase resistance to adverse factors.

Keywords: hypoxic preconditioning, normobaric hypoxia, interval hypoxic training, clinical blood test, total serum antioxidant capacity, corticosterone

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ДЕЙСТВИЕ КАРДАРИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИХ
И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ
МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ У КРЫС**

© 2024 г. М. Р. Субханкулов¹, Д. С. Синяк¹, В. А. Гук¹, Т. Ю. Постникова¹,
А. И. Рогинская¹, О. Е. Зубарева^{1,*}

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

**E-mail: ZubarevaOE@mail.ru*

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

После доработки 27.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Эпилепсия – тяжелое нервно-психическое заболевание, сопровождающееся развитием спонтанных рецидивирующих судорог и сопутствующих нарушений поведения, трудно поддающихся лечению. В последние годы активно исследуются нейропротекторные свойства агонистов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR α , β/δ , γ) – ядерных транскрипционных факторов, участвующих в регуляции липидного и углеводного обмена, а также воспалительных сигнальных путей, вовлеченных в патогенез эпилепсии. Нейропротекторные свойства агонистов PPAR γ неоднократно описаны в моделях эпилепсии, эффекты агонистов PPAR β/δ в этих моделях исследованы недостаточно. Целью работы являлось изучение эффектов введений агониста PPAR β/δ кардарина (GW 501516) на формирование гистопатологических и поведенческих нарушений крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии (TLE). Литий-пилокарпиновая модель – одна из лучших экспериментальных моделей хронической височной эпилепсии. В данной работе эпилепсию индуцировали введением пилокарпина крысам самцам Вистар в возрасте 7 недель через сутки после инъекции LiCl. Кардарин (2.5 мг/кг) вводили ежедневно в течение 7 дней после пилокарпина, первая инъекция – через сутки после введения пилокарпина. Тестирование поведения проводили через 2–3 месяца после индукции модели в тестах: Открытое поле, Чужак-резидент, Обследование новых предметов, спонтанное чередование в Y-образном лабиринте и Водный лабиринт Морриса. Забор мозга для гистологических исследований (оценка гибели нейронов, окраска по Нисслю) производили после окончания поведенческих экспериментов, через 95 дней после индукции TLE. Показано, что у нелеченых крыс с TLE отмечается значительная гибель нейронов в гиппокампе и нарушения поведения: повышенная двигательная активность, тревожность, нарушения памяти, исследовательского и коммуникативного поведения. Кардарин не влиял на выживаемость нейронов гиппокампа, однако уменьшал проявление практически всех названных поведенческих нарушений за исключением гиперактивности. Таким образом, проведенное исследование показало перспективность использования агонистов PPAR β/δ для ослабления развития характерных для эпилепсии нарушений поведения.

Ключевые слова: височная эпилепсия; литий-пилокарпиновая модель; агонисты рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом; кардарин (GW 501516); поведение; память; гибель нейронов в гиппокампе

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия — это хроническое неврологическое заболевание, характеризующееся развитием спонтанных рецидивирующих судорог. На данный момент в мире эпилепсией страдает более 50 млн человек [1]. Одной из наиболее распространенных форм этого заболевания является височная эпилепсия, при которой эпилептогенный очаг располагается в височной доле. Для данной формы эпилепсии характерна перестройка нейронных сетей в лимбических областях мозга, астроглиозис, выраженная дегенерация гиппокампальных нейронов [2], что приводит не только к формированию эпилептиформной активности, но и к развитию сопутствующих когнитивных и психоэмоциональных нарушений [3], негативно влияющих на качество жизни пациентов. В частности, у больных височной эпилепсией часто отмечаются нарушения памяти [4], трудности в социальных взаимодействиях [5], высокий риск тревожных расстройств [6]. При этом некоторые из используемых в клинической практике препаратов не только не предотвращают развитие нервно-психических нарушений, но могут и усугублять их [7]. Это делает актуальным поиск новых методов лечения, способных предотвращать развитие различных связанных с эпилепсией нарушений, включая поведенческие изменения.

В качестве одной из новых стратегий в лечении эпилепсии рассматривается ограничение нейровоспаления, играющего важную роль в эпилептизации мозга и развитии коморбидных нарушений поведения [8]. Противовоспалительным и нейропротекторным действием обладают, в частности, агонисты рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs), их возможное использование в лечении различных неврологических заболеваний, включая эпилепсию, активно обсуждается в последние годы [9].

PPARs — это группа ядерных транскрипционных факторов, играющих важнейшую роль в метаболизме глюкозы и липидов [10]. Эти рецепторы обнаружены в различных клетках организма, включая клетки мозга [11], где они вовлечены в процессы окислительного стресса, в регуляцию энергетического гомеостаза, метаболизма жирных кислот в митохондриях, регуляцию нейровоспаления, гомеостаз глутамата [10].

Идентифицировано три типа PPARs: PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ , которые несколько различаются по локализации в тканях, лигандам и функциональным свойствам [10]. Они все присутствуют в мозге [11]. Нейробиология PPAR γ является наиболее изученной. Агонисты этих рецепторов могут контролировать нейровоспаление, подавляя синтез оксида азота, воспалительных цитокинов и хемокинов в микроглии и астроцитах [12, 13]. Их нейропротекторные свойства были выявлены в экспериментальных моделях различных видов нейропатологии [14], включая острые судороги и хроническую эпилепсию [15, 16]. Возможные защитные свойства двух других типов PPARs (PPAR α и PPAR β/δ) при эпилепсии исследованы значительно меньше, несмотря на то, что их агонисты также обладают противовоспалительными и нейропротекторными свойствами [17, 18].

Целью данной работы явилось изучение эффектов введений агониста PPAR β/δ -рецепторов кардарина (GW 501516) на формирование гистопатологических и поведенческих нарушений в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии (TLE). Данная экспериментальная модель хорошо воспроизводит патологические процессы, происходящие при формировании височной эпилепсии человека. После инициирующего события (в модели — введение конвульсанта пилокарпина) сначала имеет место латентный период, когда судороги не проявляются, но в мозге при этом происходит формирование сверхвозбудимых нейронных сетей, гибель нейронов и другие патологические перестройки, которые приводят к постепенному формированию спонтанных рецидивирующих судорог и сопутствующих нарушений поведения (хронический период модели) [19, 20]. Эффекты кардарина в TLE модели ранее не изучались.

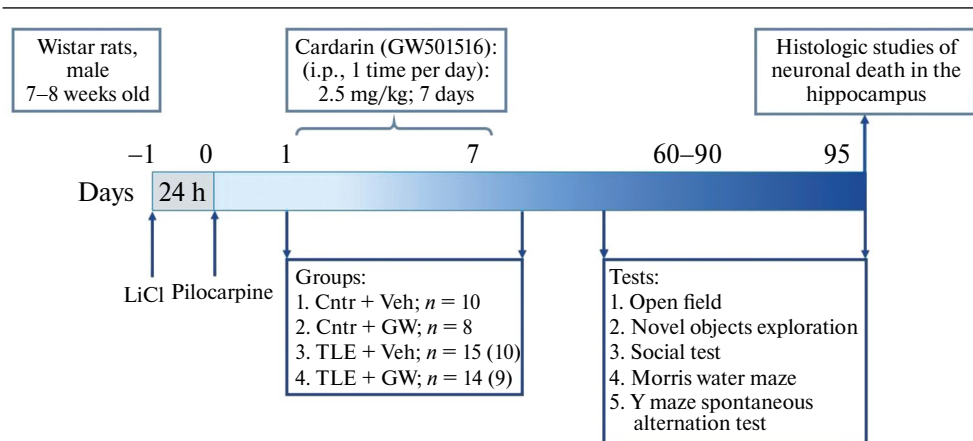


Рис. 1. Схема эксперимента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Животные

Исследования проводились на 7–8-недельных самцах крыс аутбредной линии Wistar, которые содержались в стандартных клетках по 5–6 животных в каждой. У крыс был свободный доступ к пище и воде, соблюдались условия 12-часового цикла дня (день – с 8:00 до 20:00; ночь – с 20:00 до 8:00).

2. Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии

Для моделирования височной эпилепсии (TLE, рис.1) крысам в/б вводили 127 мг/кг хлорида лития (LiCl) [20]. Спустя сутки делали инъекции агониста мускариновых рецепторов пилокарпина, в/б. Предварительное введение LiCl позволяет существенно уменьшить эффективную дозу пилокарпина и снизить смертность животных [20]. Для предотвращения периферических эффектов пилокарпина за 1 час до его введения производили инъекции (-)-скополамин-метилбромида (1 мг/кг, в/б). Пилокарпин вводили животным в дозе 20–40 мг/кг по 10 мг/кг каждые 30 мин до развития 4-й стадии судорог по шкале Racine [21]. Крысы, у которых после четвертой инъекции (40 мг/кг) не развились судороги, исключались из исследования. Судороги купировали через 75 мин после начала 4-й стадии введением диазепама (10 мг/кг, в/б).

Ранее нами было показано [22], что при использовании такого протокола у большинства экспериментальных крыс в хроническую фазу TLE развиваются спонтанные рецидивирующие судороги.

Всего в эксперименте использовано 47 крыс, разделенных на четыре группы случайным образом. 1) Контрольная группа крыс (Cntr+Veh; $n = 10$) получала LiCl и растворитель (диметилсульфоксид, DMSO) без введения пилокарпина. DMSO использовался в качестве растворителя, т.к. кардарин нерастворим в воде. 2) Вторая группа животных с курсовым введением кардарина (GW 501516; 2.5 мг/кг, в/б), растворенного в DMSO (Cntr+GW; $n = 8$), эта группа также получала LiCl без введения пилокарпина. 3) Экспериментальная группа без лечения – крысы, которым вводили пилокарпин с растворителем (TLE+Veh; $n = 15$, выжило 10). 4) Экспериментальная группа с лечением (TLE+GW; $n = 14$, выжило 9). Препараты вводили курсом в течение недели 1 раз в день в указанной дозе. Первая инъекция проводилась через 24 часа после введения пилокарпина.

3. Выживаемость и динамика массы тела

Выживаемость и динамику массы тела отслеживали ежедневно в течение 7 дней после инициирования TLE. В первые дни животные получали влажный корм, в случае сильной потери массы (более 10%) животным подкожно вводили 5%-ный раствор глюкозы (2–3 мл) для предотвращения истощения.

4. Оценка поведения

Оценка поведения проводилась в батарее тестов в хроническую фазу модели через 2–3 месяца после введения пилокарпина. Эксперименты проводились в период высокой активности животных (с 19 до 23 ч). Последовательность тестов во всех группах была одинаковой (рис. 1). Для оценки двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения проводились тесты Открытое поле и Обследование новых предметов. Для выявления нарушений коммуникативного поведения был использован Социальный тест. Также проводилось тестирование оперативной памяти (Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте), а также кратковременной и долгосрочной пространственной памяти (Водный лабиринт Морриса). Поведенческие эксперименты проводились в период высокой активности крыс (с 18 до 23 ч). Для уменьшения стрессовой нагрузки между тестами были сделаны перерывы в несколько дней. Все тесты записывались на видео и затем анализировались с помощью этологических программ Field4 и Pole_Krest, разработанных в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия). Обработка поведенческих тестов проводилась опытным экспериментатором, не осведомленным о том, к какой группе относились животные (слепой контроль).

4.1. Тест Открытое поле

Тест Открытое поле (ОП), как было сказано ранее, использовался для оценки двигательной и исследовательской активности [23]. Каждое животное помещалось в центр круглой арены диаметром 1 м со стенками высотой 30 см. В арене с освещенностью 8 Лк располагались отверстия диаметром 4 см в полу. Поведение каждой крысы в течение 5 мин записывалось на видеокamerу. Установка тщательно очищалась после каждого животного 30%-ным раствором этанола. При анализе поведения крыс оценивали локомоторную активность (пройденное расстояние, время локомоции), вертикальную активность (время стоек с упором), уровень тревожности (время, проведенное в центре арены, составляющего треть ее диаметра, время груминга и фризинга, вертикальных стоек), исследовательское поведение (время обследования норок).

4.2. Исследование новых предметов

Тест Исследование новых предметов проводился для оценки исследовательского поведения крыс [24]. Установкой являлась квадратная арена с высокими бортами ($60 \times 60 \times 45$ см), под полом которой были приклеены 2 магнита, к которым в дальнейшем крепились объекты исследования, магниты располагались по диагонали на расстоянии 20 см от ближайших стенок. Освещение равномерное – 8 люкс. В течение 3 последовательных дней до проведения эксперимента крыс помещали в камеру (без предметов) на 10 мин для угашения ориентировочной реакции на установку. В четвертый (тестовый) день крыса помещалась в центр арены, на полу которой были размещены 2 одинаковых объекта для исследования (детские игрушки – пирамидки), которые крепились на магнитах, расположенных под полом камеры. Тестирование проводилось в течение 5 мин. После каждой крысы установка и объекты тщательно промывались 30%-ным этанолом. При обработке анализировали время и число контактов с новыми предметами.

4.3. Социальный тест

Для оценки социального поведения проводился тест на социальное взаимодействие в условиях защиты животным своей территории [25, 26]. Сначала тестируемую крысу помещали в плексигласовую клетку (60 × 30 см, высота 40 см) на сутки для адаптации. Затем к ней на 5 мин. подсаживали взрослого незнакомого самца, масса тела которого была немного меньше, чем у тестируемой крысы. В ходе их взаимодействия оценивалось время агрессивного и коммуникативного поведения. Последнее включало обнюхивание и груминг тела, генитальной области и хвоста.

4.4. Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте

Данный тест использовался для оценки пространственной рабочей памяти. Y-образный лабиринт состоял из трех рукавов (каждый 50 × 10 см) с непрозрачными стенками высотой 30 см, расположенными под углом 120° друг от друга [27]. Крысу помещали в центр Y-образного лабиринта и давали ей возможность свободно исследовать рукава в течение 8 мин. Последовательность входов в лабиринт оценивалась с помощью коэффициента альтернаций (КА). Параметр КА рассчитывался по формуле: $КА = N \text{ правильных альтернаций} / N \text{ общее альтернаций} \times 100\%$. Правильными альтернациями считали три последовательных входа в рукава без повторов (например, 1 – 2 – 3 или 2 – 3 – 1 или 1 – 3 – 2), а N общее альтернаций – общее количество входов в рукава минус 2. Входом считали положение, при котором все четыре конечности животного находятся в пределах рукава. Для крыс, которые совершали менее 9 входов в различные рукава, КА не рассчитывали. В качестве показателя оперативной пространственной памяти рассматривался КА, а показатель общее количество заходов в рукава позволял судить о двигательной и исследовательской активности животных.

4.5. Водный лабиринт Морриса

Для оценки пространственной памяти и способности к обучению использовался Водный лабиринт Морриса [28]. Установка представляла собой круглый бассейн диаметром 150 см со стенками высотой 70 см. Бассейн заполнялся водой с добавлением молока для снижения прозрачности, температура воды поддерживалась на уровне $23 \pm 1^\circ\text{C}$. На стенках бассейна в позициях север, юг, запад, восток были размещены четыре картинки, служащие пространственными ориентирами (круг, квадрат, треугольник и крест). Крысы должны были найти платформу диаметром 10 см, скрытую под водой (на 1 см ниже поверхности воды), расположенную между двумя картинками на расстоянии 15 см от стенки бассейна. Положение платформы оставалось неизменным на всем протяжении экспериментов. Каждую крысу тренировали в течение четырех экспериментальных дней по четыре попытки в день с перерывом в 5 мин. между попытками. Точка старта для каждой попытки менялась случайным образом (по генератору случайных чисел) между четырьмя позициями (картинками) таким образом, чтобы все четыре позиции были задействованы в течение каждого тренировочного дня. После нахождения платформы крысу оставляли на ней в течение 30 с после чего животное удаляли из бассейна. Попытка считалась неудачной, если крыса не находила платформу за 180 с. В этом случае исследователь помогал крысе найти платформу, направляя животное рукой. На пятый день тестирования платформу убрали, а крысу помещали в бассейн на 120 с. По итогу тестирования оценивалось время, проведенное в целевой области, где ранее находилась платформа (круг диаметром 30 см).

5. Гистологические исследования

Поскольку ранее в литий-пилокарпиновой модели была показана существенная гибель нейронов в гиппокампе (сопровождающаяся астроглиозисом) [29], мы оцени-

ли данный показатель в нашем исследовании. Гистологические исследования проведены на животных контрольной (Cntr+Veh) и экспериментальных групп (TLE+Veh и TLE+GW) после окончания поведенческих экспериментов, через 95 суток после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса. Крыс анестезировали изофлураном, затем декапировали и извлекали мозг. Далее мозг фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 3–7 дней при 4°C, проводили криопротекцию в 30%-ном растворе сахарозы, замораживали при –50°C в изопентане и хранили при температуре –80°C. Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм, содержащие гиппокамп, были получены с одного полушария (правого или левого) от каждого животного с использованием криостата Bright OTF5000 (Bright Instrument Co Ltd., Huntingdon, Великобритания). Срезы прикрепляли к предметным стеклам с адгезивным покрытием Superfrost Plus (J1800AMNZ, Thermo Fisher Scientific, США). Далее срезы окрашивали по Нисслю в 0.05%-ном растворе тионина, как было описано ранее [29]. Анализ срезов проводили на микроскопе Leica AF 7000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия) при увеличении $\times 400$. Для морфологического анализа подсчет нейронов проводили на каждом 8-ом срезе (всего 8–10 срезов из одного гиппокампа крысы). Расстояние между анализируемыми срезами составляло 160 мкм. Количество нейронов на цифровых микрофотографиях подсчитывали в программе ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, США) вручную с помощью Mult-point tool в пересчете на 100 мкм длины клеточного слоя в двух областях гиппокампа: CA1 и CA3.

6. Методы статистического анализа

Статистический анализ был проведен с использованием программ IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Armonk, NY, США) и GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, США). Выбросы определялись квартильным методом. Нормальность распределения устанавливалась с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Равенство дисперсий определялось с помощью критерия Ливиня. Эффекты TLE и лечения определялись с помощью 2-факторного дисперсионного анализа (при нормальном распределении и равенстве дисперсий) или непараметрического Н-критерия Крускала-Уоллеса (при ненормальном распределении или значимых различиях в дисперсиях). Апостериорные попарные сравнения проводились с помощью теста Шидака либо Данна соответственно. Для оценки динамики массы тела с учетом лечения и модели использовался 3-факторный смешанный (Mixed) дисперсионный анализ. Для оценки динамики обучения в разных группах в водном лабиринте Морриса в связи с ненормальностью распределения данных применяли непараметрический X^2 тест Фридмана. Смертность анализировалась с помощью кривых дожития Каплана-Мейера на основе Logrank статистики. Частота встречаемости агрессивного поведения в группах анализировалась с помощью углового преобразования Фишера (критерий ϕ^*). Различия считались значимыми при $p \leq 0.05$. Данные на графиках представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение при параметрической обработке данных или медианы и межквартильного размаха при использовании непараметрических методов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика массы тела и выживаемость

Часть экспериментальных животных погибала в первые дни после введения пилокарпина. В нелеченой группе с TLE гибель составила 33%, в леченой с TLE – 36% (рис. 2а). Кардарин значимо не повлиял на выживаемость. (Log Rank test, $X^2 = 0.017$; $p = 0.9$).

После индукции TLE у экспериментальных животных наблюдалась активная потеря массы тела, в первые 3 дня после введения пилокарпина она составляла око-

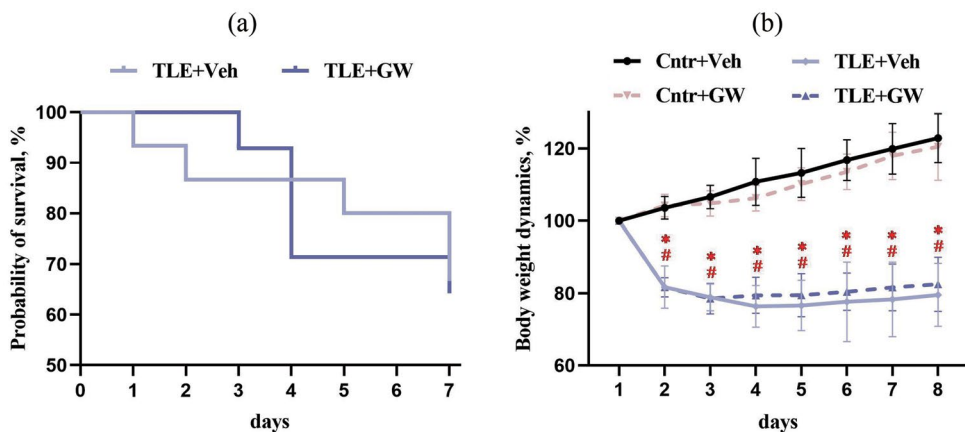


Рис. 2. (а) – Кривые выживаемости Каплана-Мейера. (б) – Динамика массы тела. Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. * – $p < 0.05$ разница между группами Cntr+Veh и TLE+Veh; # – $p < 0.05$ разница между группами Cntr+GW и TLE+GW, тест Шидака.

ло 20 – 25% массы тела, после 4-го дня начиналось ее медленное восстановление. На динамику массы тела (рис. 2b) повлияли фактор времени ($\text{time} - F_{(7,252)} = 23.68$; $p < 0.001$) и взаимодействие факторов времени и модели ($\text{time} \times \text{TLE} - F_{(7,252)} = 78.43$; $p < 0.001$), влияние фактора лечения, взаимодействия факторов TLE и лечения, а также взаимодействие факторов времени, лечения и модели статистически незначимо ($\text{GW} - F_{(1,36)} = 0.007$; $p = 0.93$; $\text{TLE} \times \text{GW} - F_{(1,36)} = 2.18$; $p = 0.15$; $\text{time} \times \text{TLE} \times \text{GW} - F_{(7,252)} = 1.12$; $p = 0.34$). Попарные сравнения выявили межгрупповые различия при сравнении нелеченых и леченых контрольных групп с соответствующими TLE группами для дней со 2-го по 8-й ($p < 0.05$). Таким образом, кардарин не влиял на динамику массы тела экспериментальных и контрольных животных.

Гибель нейронов в гиппокампе крыс с височной эпилепсией

TLE приводила к гибели значительного числа нейронов CA1 и CA3 областей гиппокампа (рис. 3а–с соответственно, $F_{(2, 12)} = 49.38$; $p < 0.0001$ и $F_{(2, 12)} = 49.28$; $p < 0.0001$), кардарин не влиял на эти нарушения, достоверные отличия от контроля ($p < 0.0001$) наблюдались как у нелеченых, так и у леченых крыс.

Действие кардарина на формирование нарушений поведения в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии

Тест Открытое поле

Тест Открытое поле проводится для оценки горизонтальной и вертикальной двигательной активности (пройденное расстояние и время стоек с упором), уровня тревожности (время, проведенное в центральной области, время вертикальных стоек, груминга и фризинга) и исследовательского поведения (время исследования норок).

Длина пути, пройденного в Открытом поле (рис. 4а, б), значимо зависела от фактора модели ($\text{TLE} - F_{(1,32)} = 27.72$; $p < 0.001$), влияние факторов лечения и взаимодействие факторов было статистически незначимо (соответственно, $\text{GW} - F_{(1, 32)} = 1.91$; $p = 0.18$; $\text{TLE} \times \text{GW} - F_{(1, 32)} = 1.49$; $p = 0.23$). Аналогичные нарушения выявлены для времени локомоции (рис. 4с): $\text{TLE} - F_{(1,32)} = 18.75$; $p < 0.001$; $\text{GW} - F_{(1,32)} = 0.35$;

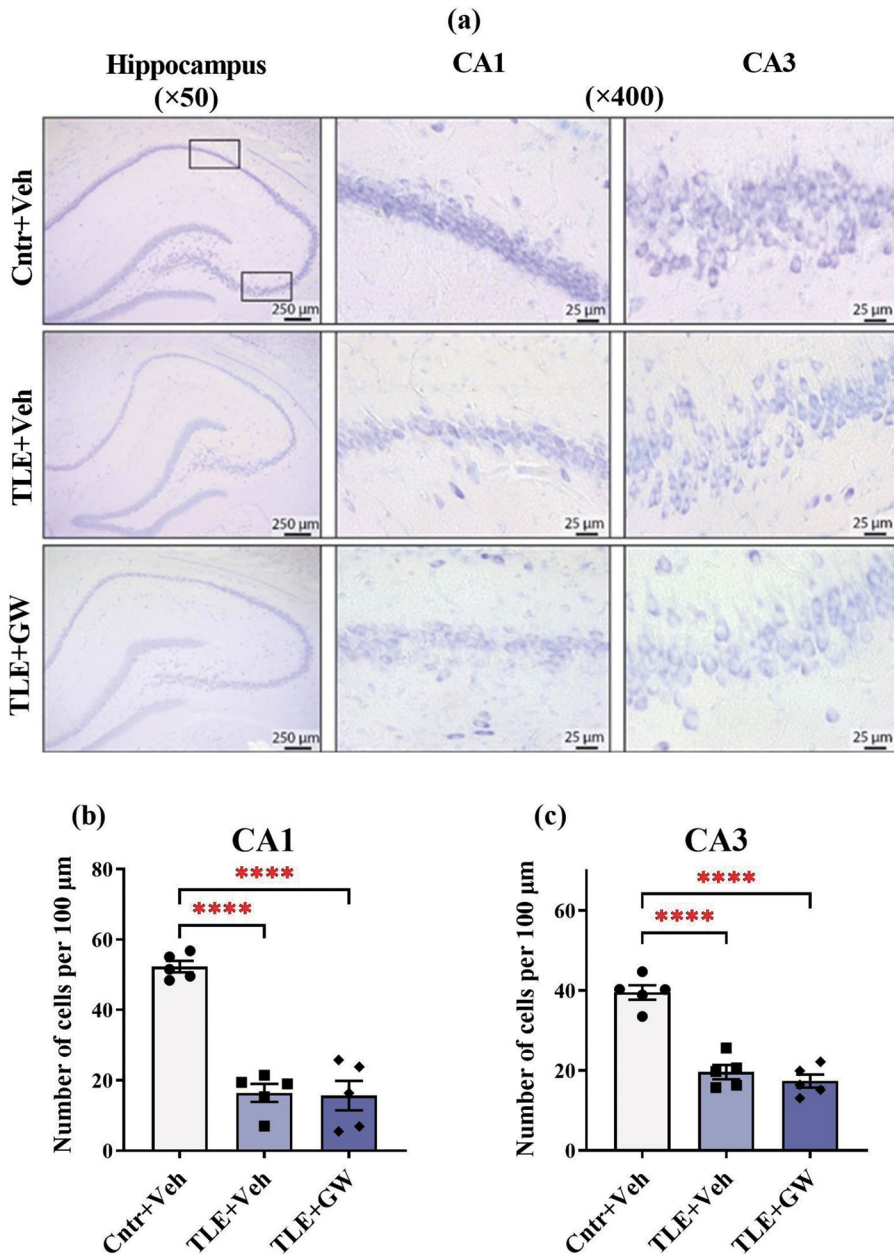


Рис. 3. Гибель нейронов в гиппокампе животных с височной эпилепсией. (a) – Примеры окрашенных по Нисслю срезов гиппокампа от контрольных (Cntr+Veh), нелеченых (TLE+Veh) и леченых (TLE+GW) крыс. (b–c) – Количество нейронов на 100 мкм длины клеточного слоя в гиппокампаальных областях CA1 и CA3 у контрольных (Cntr+Veh), нелеченых (TLE+Veh) и леченых (TLE+GW) крыс. **** – $p < 0.0001$, тест Шидак. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

$p = 0.56$; $TLE \times GW - F_{(1,32)} = 0.23$; $p = 0.64$). Парные сравнения показали, что у нелеченых и леченых крыс с височной эпилепсией показатели горизонтальной двигательной активности (длины пройденного пути и времени локомоции) выше по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.01$ и $p < 0.001$). Кардарин не влиял на эти изменения.

Вертикальная двигательная активность (количество стоек с упором, рис. 4d) также увеличивалась у крыс с височной эпилепсией ($N = 8.2$; $p = 0.04$), однако межгрупповые сравнения не выявили значимых различий, при этом различия между TLE и контрольными нелечеными животными были близки к достоверности (тест Данна, $p = 0.08$).

Экспериментальные и контрольные животные не различались по уровню тревожности, определяемому по времени, проведенному крысами в центральной области Открытого поля (рис. 4e; $N = 2.73$; $p = 0.44$). Однако по другому показателю тревожности, времени груминга (рис. 4f), между группами выявлены значимые различия ($N = 8.93$; $p = 0.03$). Парные сравнения групп выявили достоверное увеличение времени груминга у нелеченых TLE крыс по сравнению с контролем ($p < 0.05$), что свидетельствует об увеличении их уровня тревожности. В группах леченых животных таких различий не выявлено ($p > 0.05$). Это означает, что кардарин ослаблял формирование повышенной тревожности, характерной для височной эпилепсии. Показатели вертикальных стоек и фризинга значимо не изменялись.

Время обследования норок в Открытом поле (рис. 4g) зависело от TLE и фактора лечения (соответственно $TLE - F_{(1,33)} = 5.01$; $p = 0.03$; $GW - F_{(1,33)} = 4.36$; $p = 0.045$), при этом взаимодействие факторов было статистически незначимо ($TLE \times GW - F_{(1,33)} = 0.49$; $p = 0.49$). Достоверное влияние фактора лечения было связано с тем, что как контрольные, так и TLE крысы, которым вводили кардарин, имели повышенное значение времени обследования норок, однако парные сравнения групп не выявили статистически значимых различий.

Тест Обследование новых предметов

Оценку исследовательского поведения также проводили в тесте Обследование новых предметов. Общее время обследования предметов (рис. 4h) значимо зависело от фактора модели ($TLE - F_{(1,33)} = 7.539$; $p = 0.010$), влияния фактора лечения и взаимодействия факторов не выявлено (соответственно $GW - F_{(1,33)} < 0.001$, $p = 0.986$ и $TLE \times GW - F_{(1,33)} = 0.905$, $p = 0.348$). Парные сравнения выявили, что у нелеченых TLE крыс по сравнению с контролем исследовательское поведение уменьшается ($p < 0.05$), в то же время у леченых контрольных и модельных животных значимых различий не выявлено. По показателю числа подходов к новым предметам (рис. 4i) выявлено достоверное взаимодействие факторов $TLE \times GW - F_{(1,29)} = 7.32$, $p = 0.01$). Парное сравнение групп показывает, что этот показатель был значимо ниже у нелеченых TLE крыс по сравнению с контролем ($p < 0.05$) и значимо выше у леченых TLE крыс по сравнению с нелечеными ($p < 0.05$). Таким образом, кардарин ослаблял нарушения исследовательского поведения в тесте Обследования новых предметов.

Социальный тест

Социальный тест (рис. 5) проводился для оценки коммуникативного поведения (куда входило обнюхивание и груминг тела чужака, его генитальной области и хвоста), уровня агрессии (время агрессивного поведения, процент животных, имевших агрессивные проявления) и времени защитных реакций.

Время коммуникативного поведения (рис. 5a) в группах значимо различалось ($N = 23.23$; $p < 0.001$). TLE подавляла коммуникативное поведение, снижение было достоверным у нелеченых крыс ($p < 0.001$), у леченых была схожая тенденция, однако различия не достигали статистической значимости ($p > 0.05$). Кроме того, височ-

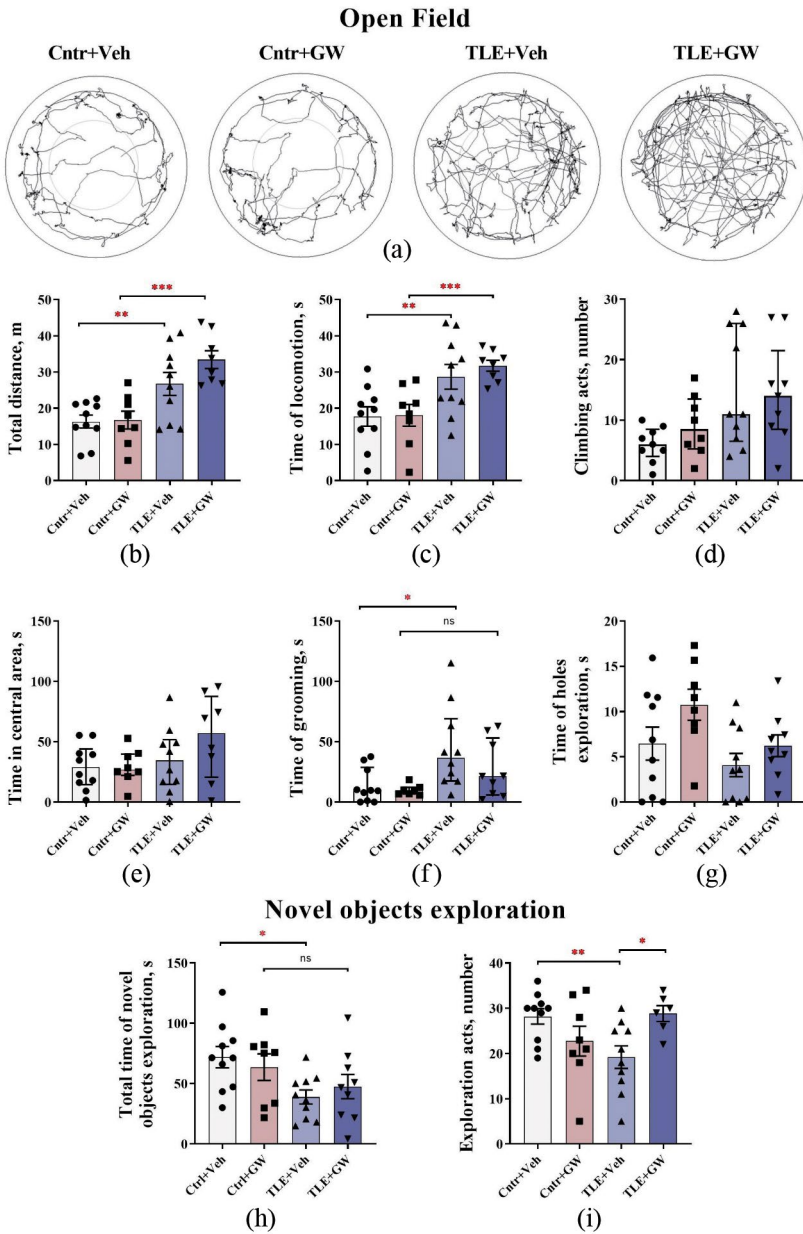


Рис. 4. Поведение контрольных и опытных крыс в тесте Открытое поле (а-г) и тесте Обследование новых объектов (h, i). (а) – Примеры треков в Открытом поле; (б) – Общее расстояние, пройденное в Открытом поле; (с) – Время локомоции; (д) – Стойки с упором, количество актов; (е) – Время в центральной зоне открытого поля; (ф) – Время груминга; (г) – Время исследования норок; (h) – Время обследования новых объектов; (i) – Количество контактов с новыми объектами. Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$, тест множественных сравнений Шидака или Данна. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

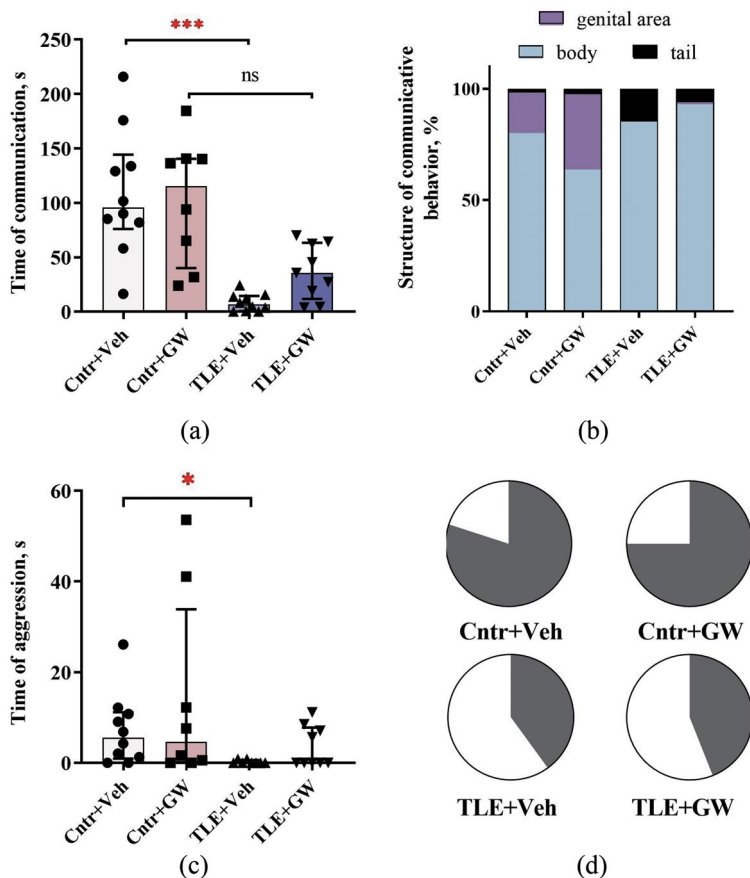


Рис. 5. Поведение контрольных и опытных крыс в социальном тесте. (а) – Время общения; (б) – Структура коммуникативного поведения; (с) – Время агрессии; (д) – % крыс с агрессивным поведением (темный сектор). Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$, тест множественных сравнений Шидака или Данна. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

ная эпилепсия вызвала изменение структуры коммуникативного поведения (рис. 5b): у крыс TLE групп (как леченых, так и нелеченых) практически полностью отсутствовало обнюхивание генитальной области (доминантное поведение). По показателям защитного поведения различий не было.

У TLE крыс по сравнению с контрольными снижалось время агрессивного поведения (рис. 5c; $H=8.63$; $p = 0.03$). Эти изменения были статистически значимыми только у нелеченых животных ($p < 0.05$). Доля крыс, имевших агрессивные проявления (рис. 5d), также достоверно снижалась в нелеченой TLE группе по сравнению с контролем (Cntr+Veh – 80%; TLE+Veh – 40%, $\phi^* = 1.89$; $p < 0.05$), однако в группе, получавшей лечение, этот показатель значимо не изменялся (Cntr+GW – 75%; TLE+GW – 44%, $\phi^* = 1.31$; $p > 0.05$).

Таким образом, височная эпилепсия приводила к подавлению коммуникативного и агрессивного поведения – нелеченые крысы были малообщительными и слабо защищали свою территорию, кардарин ослаблял эти нарушения.

Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте

Тест на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте был использован для выявления оперативной памяти (коэффициент альтернаций) и двигательной активности (общее число посещенных рукавов).

Коэффициент альтернации (рис. 6а) значимо зависел от TLE ($F_{(1,26)} = 8.81; p = 0.006$) и от фактора лечения (GW – F височная эпилепсия $F_{(1,26)} = 4.63; p = 0.04$), при этом взаимодействие факторов было статистически незначимым (TLE x GW – $F_{(1,26)} = 0.17; p = 0.69$). Попарные сравнения групп выявили, что показатели рабочей памяти были ниже у нелеченых TLE крыс по сравнению с контрольными животными ($p < 0.05$), в группах леченых TLE и контрольных крыс достоверных различий не наблюдалось ($p > 0.05$). Таким образом, кардарин нивелировал негативное влияние височной эпилепсии на рабочую память.

Изменения двигательной активности в тесте на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте были аналогичны нарушениям, выявленным в тесте Открытое поле. TLE увеличивала число посещенных рукавов (рис. 6b, TLE – $F_{(1,28)} = 21.05; p < 0.001$), влияние фактора лечения и взаимодействия факторов было недостоверным (соответственно GW – $F_{(1,28)} = 2.36; p = 0.14$; TLE x GW – $F_{(1,28)} = 0.06; p = 0.81$). Попарные сравнения показали, что число посещенных рукавов было выше как у нелеченых, так и леченых крыс с TLE по сравнению с контролем ($p < 0.05$), кардарин не блокировал эти нарушения.

Водный лабиринт Морриса

Данный тест был использован для оценки способности к обучению и пространственной памяти экспериментальных и контрольных крыс (рис. 6с–d). Поскольку изученные показатели (дистанция, пройденная до нахождения скрытой под водой платформы в тренировочных попытках, и время нахождения в целевой области, где раньше находилась платформа) не имели нормального распределения, для обработки результатов данного теста были использованы методы непараметрической статистики. X^2 тест Фридмана был использован для оценки эффективности обучения в экспериментальных и контрольных группах в четырех днях тренировки (на рис. 6с представлены суммарные данные по четырем попыткам, совершенным в каждый экспериментальный день). Дистанция, пройденная до нахождения платформы, достоверно снижалась в процессе обучения во всех группах (Cntr+Veh – $X^2 = 17.93; p < 0.001$; Cntr+GW – $X^2 = 15.51; p = 0.001$; TLE+Veh – $X^2 = 130; p = 0.005$; TLE+GW – $18.73; p < 0.001$), это говорит о том, что животные всех групп были способны обучаться в водном лабиринте. Однако эффективность обучения в группах различалась (день 1 – $H = 18.31; p < 0.001$; день 2 – $H = 13.07; p = 0.004$; день 3 – $H = 20.57; p < 0.001$; день 4 – $H = 13.84; p = 0.003$ с худшим обучением в TLE группах). В пятый тестовый день TLE крысы проводили меньше времени в целевой зоне, где раньше находилась платформа, что говорит о нарушении у них пространственной памяти (рис. 6d, e; $H = 11.48; p = 0.009$). Попарное сравнение групп выявило достоверные различия в нелеченых группах, у леченых животных тенденция была аналогичной, но различия не достигали статистической значимости.

Таким образом, проведенные исследования показали, что у нелеченых крыс с TLE отмечаются существенные нарушения поведения: повышенная двигательная активность, тревожность, нарушения памяти, исследовательского и коммуникативного поведения. Введение кардарина на начальных этапах эпилептогенеза ослабляет, но не блокирует полностью формирование некоторых из этих нарушений (высокий уровень тревожности, нарушение социального поведения и памяти).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование выявило, что введение агониста PPAR β/δ -рецепторов кардарина (GW 501516) в латентный период литий-пилокарпиновой модели эпилеп-

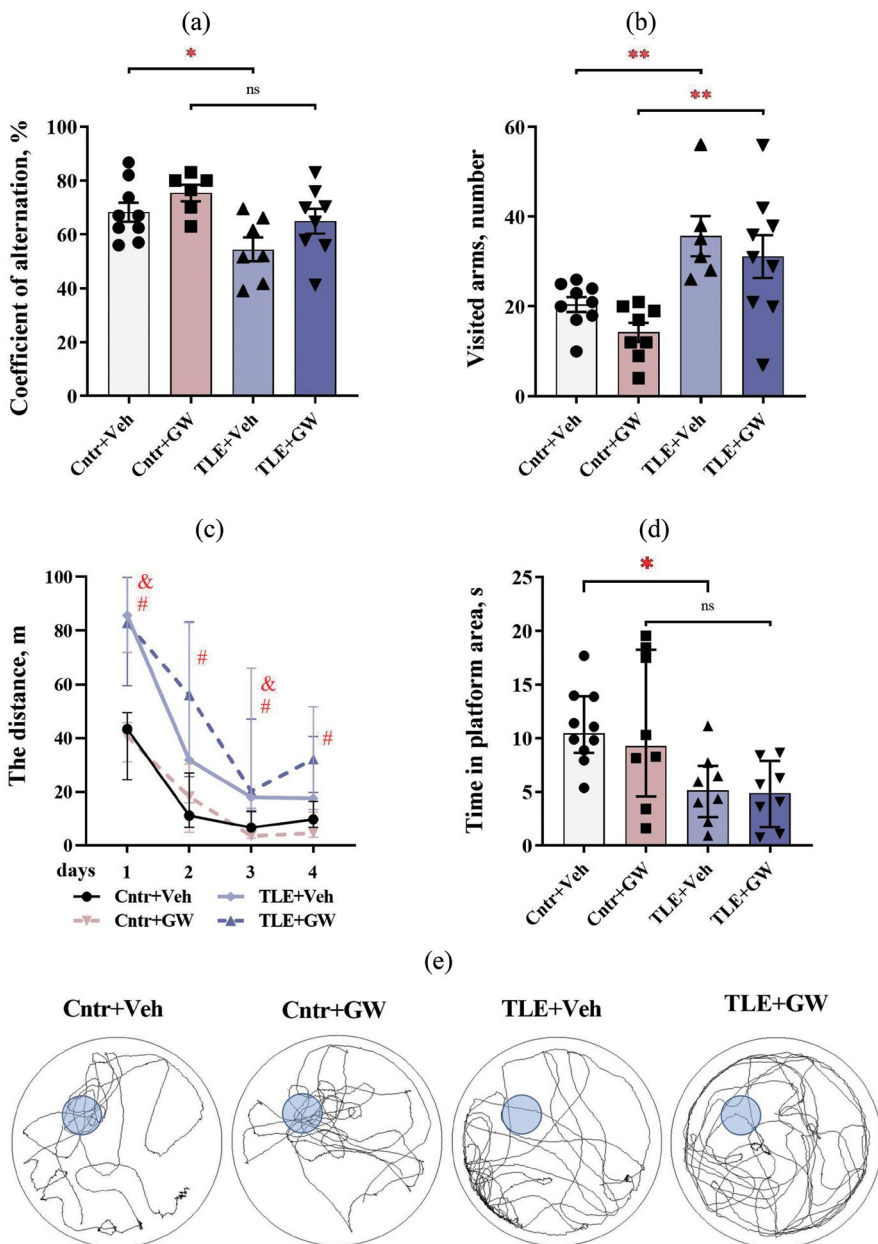


Рис. 6. Поведение контрольных и опытных крыс в тесте на спонтанное чередование в Y-образном лабиринте (a, b) и водном лабиринте Морриса (c–e). (a) – Коэффициент альтернаций. (b) – Количество посещенных рукавов. (c) – Обучение в водном лабиринте Морриса (расстояние, пройденное до нахождения платформы в течение четырех тренировочных дней). (d) – Тест на пятый день, время нахождения в целевой зоне, где ранее находилась платформа. (e) – Примеры треков на пятый день тестирования. Cntr+Veh – контрольные крысы без лечения; Cntr+GW – контрольные крысы, получавшие кардарин; TLE+Veh – крысы с височной эпилепсией без лечения; TLE+GW – крысы с височной эпилепсией, получавшие кардарин. *, #, & $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns – $p > 0.05$, тест Шидака (a, b) или тест Данна (c, d). (c): # – разница между группами Cntr+Veh и TLE+Veh; & – между группами Cntr+GW и TLE+GW. Каждая точка представляет собой значение для конкретного животного.

сии не блокирует характерную для эпилепсии гибель нейронов в гиппокампе, однако ослабляет развитие коморбидных нарушений поведения в хронической фазе модели. Развитие собственно судорог мы не анализировали, так как исследование было сосредоточено на поведенческих эффектах кардарина.

PPARs (α , γ и β/δ) представляют собой лиганд-индуцируемые факторы транскрипции, относящиеся к суперсемейству ядерных гормональных рецепторов [30]. Все три типа PPARs экспрессируются в различных тканях организма, включая мозг [30, 31], они присутствуют как в нейронах, так и в глии [32], при этом имеется региональная специфичность: высокий уровень экспрессии PPAR β/δ отмечается повсеместно, в то время как уровень экспрессии PPAR α и особенно PPAR γ выражен слабее в височной коре, полях CA1 и CA3 гиппокампа, некоторых ядрах таламуса и гипоталамуса [31].

Традиционно все PPARs рассматриваются как ключевые звенья регуляции липидного и углеводного обмена [33–35], хотя имеется некоторая специфичность по их лигандам и функциям [36]. PPAR α регулируют энергетический гомеостаз, опосредуя расщепление жирных кислот и холестерина, а также стимулируя глюконеогенез и снижение уровня триглицеридов в сыворотке крови. Лигандами PPAR γ являются жирные кислоты и эйкозаноиды и другие природные липидные лиганды. Они регулируют накопление жирных кислот и метаболизм глюкозы. PPAR β/δ – это ядерные рецепторы гормонов, они реагируют на жирные кислоты и их производные, включая эйкозаноиды и простагландины, благодаря чему эти рецепторы вовлечены в регуляцию множества биологических процессов [30, 36].

В последние годы появились данные еще об одной важной функции PPARs – их участии в регуляции процессов воспаления в целом и, в частности, нейровоспаления [17, 37]. Сейчас доказано, что процессы нейровоспаления играют важную роль в патогенезе ряда нейропсихических заболеваний, включая эпилепсию [38, 39]. Так, показано, что эпилептические припадки связаны с повышением продукции в глиальных клетках провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 β (IL-1 β), IL-6 и фактора некроза опухоли- α (TNF- α), запускающих каскад процессов, связанных с повышением возбуждения нейронов, индукцией эксайтотоксичности и гибели нейронов, усиливающих и пролонгирующих эпилептогенез [8]. Кроме того, провоспалительные цитокины способствуют развитию характерных для эпилепсии нарушений поведения [22, 40].

Противовоспалительные и нейропротекторные свойства характерны для агонистов PPARs всех типов [37], включая PPAR β/δ [17]. Так, в модели глобальной церебральной ишемии показано, что агонист PPAR- β/δ GW0742 ослабляет гибель нейронов, уменьшает экспрессию генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α и усиливает экспрессию гена противовоспалительного цитокина IL-10, а также нивелирует связанные с нейровоспалением нарушения памяти [41]. Аналогичные эффекты выявлены для GW0742 в модели мозговой травмы [42].

В моделях судорог и хронической эпилепсии наибольшее количество работ было посвящено изучению эффектов агонистов PPAR γ [43]. В частности, обнаружено, что в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии агонисты PPAR γ ослабляют пилокарпин-индуцированные судороги и гибель нейронов в гиппокампе [44], усиливают экспрессию нейропротекторного противовоспалительного гена аргиназы-1 (Arg-1) [45], предотвращают активацию астроглиальных клеток и когнитивные нарушения, характерные для литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии [46]. Эффекты агонистов других типов PPARs исследованы хуже, свойства агонистов PPAR β/δ в моделях острых судорог и хронической эпилепсии ранее не изучались.

В данной работе мы провели исследование нейропротекторных и поведенческих эффектов агониста PPAR β/δ кардарина (GW501516) в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Кардарин является мощным агонистом PPAR β/δ , он примерно в 1200 раз более селективен в отношении PPAR- β/δ по сравнению с другими типами PPARs [47].

Нами показано, что у TLE крыс имеет место гибель нейронов в гиппокампе. Это нарушение является характерной особенностью как литий-пилокарпиновой модели [29], так и височной эпилепсии у людей [48]. Кардарин не предотвращал эти нарушения.

Также нами обнаружено, что развитие эпилепсии у экспериментальных крыс сопровождается формированием комплекса поведенческих нарушений, включающего гиперактивность, повышение уровня тревожности, подавление исследовательского поведения и коммуникативной активности, ухудшение различных видов памяти. Эти изменения соответствуют изменениям поведения, описанным ранее в литий-пилокарпиновой модели нами [22, 49, 50] и другими авторами [51]. Кардарин не отменял полностью, но ослаблял практически все из выявленных нарушений поведения, за исключением гиперактивности.

Таким образом, проведенное исследование показало перспективность использования агонистов PPAR β/δ для ослабления развития характерных для эпилепсии нарушений поведения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (номер разрешения: 13-к-а, от 15 февраля 2018 г.). Это руководство соответствует Директиве ЕС 2010/63/ЕС об экспериментах на животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет Российского научного фонда (проект № 23-25-00480). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.Е.З.), сбор данных (С.М.Р., С.Д.С., Г.В.А.), обработка данных (С.М.Р., С.Д.С., Г.В.А., П.Т.Ю., Р.А.И., З.О.Е.), написание и редактирование манускрипта (С.М.Р., С.Д.С., П.Т.Ю., З.О.Е.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beghi E* (2020) The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology* 54: 185–191. <https://doi.org/10.1159/000503831>
2. *Kahane P, Barba C, Rheims S, Job-Chapron AS, Minotti L, Ryvlin P* (2015) The concept of temporal ‘plus’ epilepsy. *Rev Neurol (Paris)* 171: 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.01.562>
3. *Tellez-Zenteno JF, Dhar R, Hernandez-Ronquillo L, Wiebe S* (2007) Long-term outcomes in epilepsy surgery: antiepileptic drugs, mortality, cognitive and psychosocial aspects. *Brain* 130: 334–345. <https://doi.org/10.1093/brain/awl316>
5. *Willment KC, Golby A* (2013) Hemispheric Lateralization Interrupted: Material-Specific Memory Deficits in Temporal Lobe Epilepsy. *Front Hum Neurosci* 7. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00546>
5. *Bonora A, Benuzzi F, Monti G, Mirandola L, Pugnaghi M, Nichelli P, Meletti S* (2011) Recognition of emotions from faces and voices in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 20: 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.01.027>
6. *Swinkels WAM, Kuyk J, Dyck R van, Spinhoven Ph* (2005) Psychiatric comorbidity in epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 7: 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.04.012>

7. *Chen B, Choi H, Hirsch LJ, Katz A, Legge A, Buchsbaum R, Detyniecki K* (2017) Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 76: 24–31.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.08.039>
8. *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>
9. *Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB* (2020) The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res* 45: 972–988.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-02993-5>
10. *Mirza AZ, Alihagafi II, Shamshad H* (2019) Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem* 166: 502–513.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>
11. *Warden A, Truitt J, Merriman M, Ponomareva O, Jameson K, Ferguson LB, Mayfield RD, Harris RA* (2016) Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep27618>
12. *Bernardo A, Minghetti L* (2006) PPAR -gamma agonists as Regulators of Microglial Activation and Brain Inflammation. *Curr Pharm Des* 12: 93–109.
<https://doi.org/10.2174/138161206780574579>
13. *Storer PD, Xu J, Chavis J, Drew PD* (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: Implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 161: 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.12.015>
14. *Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, Herdegen T, Culman J* (2005) The intracerebral application of the PPAR γ -ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur J Neurosci* 22: 278–282.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04200.x>
15. *Adabi Mohazab R, Javadi-Paydar M, Delfan B, Dehpour AR* (2012) Possible involvement of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway in the anticonvulsant effect of acute pioglitazone on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 101: 28–35.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.02.015>
16. *Yu X, Shao X-G, Sun H, Li Y-N, Yang J, Deng Y-C, Huang Y-G* (2008) Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1200: 146–158.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.047>
17. *Strosznajder AK, Wójtowicz S, Jeżyna MJ, Sun GY, Strosznajder JB* (2021) Recent Insights on the Role of PPAR- β/δ in Neuroinflammation and Neurodegeneration, and Its Potential Target for Therapy. *Neuromol Med* 23: 86–98.
<https://doi.org/10.1007/s12017-020-08629-9>
18. *Esmaili MA, Yadav S, Gupta RK, Waggoner GR, Deloach A, Calingasan NY, Beal MF, Kiaei M* (2016) Preferential PPAR- α activation reduces neuroinflammation, and blocks neurodegeneration *in vivo*. *Hum Mol Genet* 25: 317–327. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv477>
19. *Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA* (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 50: 93–103.
[https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00072-4)
20. *Juvalle IIA, Che Has ATC* (2020) The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon* 6: e04557.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
21. *Phelan KD, Shwe UT, Williams DK, Greenfield LJ, Zheng F* (2015) Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale. *Epilepsy Res* 117: 90–96.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.09.008>
22. *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: 340.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
23. *Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE* (2009) The Open Field Test. *Neuromethods* (42): 1–20.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
24. *Steinbach JM, Garza ET, Ryan BC* (2016) Novel Object Exploration as a Potential Assay for Higher Order Repetitive Behaviors in Mice. *J Vis Exp* 20(114): 54324.
<https://doi.org/10.3791/54324>

25. *File SE, Hyde JRG* (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 62: 19–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07001.x>
26. *Blanchard RJ, Caroline Blanchard D* (1977) Aggressive behavior in the rat. *Behav Biol* 21: 197–224.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(77\)90308-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(77)90308-X)
27. *Kim J, Kang H, Lee Y-B, Lee B, Lee D* (2023) A quantitative analysis of spontaneous alternation behaviors on a Y-maze reveals adverse effects of acute social isolation on spatial working memory. *Sci Rep* 13: 14722.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-41996-4>
28. *Wolfer DP, Stagljjar-Bozicevic M, Errington ML, Lipp H-P* (1998) Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *Physiology* 13: 118–123.
<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1998.13.3.118>
29. *Postnikova TY, Diespirov GP, Amakhin DV, Vylekzhanina EN, Soboleva EB, Zaitsev AV* (2021) Impairments of Long-Term Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Young Rats during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Mol Sci* 22: 13355.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413355>
30. *Heneka M, Landreth G* (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol and Cell Biol of Lipids* 1771: 1031–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.016>
31. *Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP* (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.064>
32. *Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W* (1999) Peroxisome Proliferator-activated Receptor β Regulates Acyl-CoA Synthetase 2 in Reaggregated Rat Brain Cell Cultures. *J Biol Chem* 274: 35881–35888.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35881>
33. *Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N* (2020) PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int J Mol Sci* 21: 2061.
<https://doi.org/10.3390/ijms21062061>
34. *Han L, Shen W-J, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S* (2017) PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol* 13: 279–296.
<https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
35. *Han L, Shen W-J, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S* (2017) PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiol* 13: 259–278.
<https://doi.org/10.2217/fca-2016-0059>
36. *Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA* (2021) The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism* 114: 154338.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>
37. *Zolezzi JM, Santos MJ, Bastías-Candia S, Pinto C, Godoy JA, Inestrosa NC* (2017) PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biol Rev* 92: 2046–2069.
<https://doi.org/10.1111/brv.12320>
38. *Thakur S, Dhapola R, Sarma P, Medhi B, Reddy DH* (2023) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. *Inflammation* 46: 1–17.
<https://doi.org/10.1007/s10753-022-01721-1>
39. *Chen Y, Nagib MM, Yasmen N, Sluter MN, Littlejohn TL, Yu Y, Jiang J* (2023) Neuroinflammatory mediators in acquired epilepsy: an update. *Inflammat Res* 72: 683–701.
<https://doi.org/10.1007/s00011-023-01700-8>
40. *Suleymanova EM* (2021) Behavioral comorbidities of epilepsy and neuroinflammation: Evidence from experimental and clinical studies. *Epilepsy & Behavior* 117: 107869. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107869>
41. *Kuang G, He Q, Zhang Y, Zhuang R, Xiang A, Jiang Q, Luo Y, Yang J* (2012) Modulation of Preactivation of PPAR- β on Memory and Learning Dysfunction and Inflammatory Response in the Hippocampus in Rats Exposed to Global Cerebral Ischemia/Reperfusion. *PPAR Res* 2012: 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2012/209794>
42. *Chehaibi K, le Maire L, Bradoni S, Escola JC, Blanco-Vaca F, Slimane MN* (2017) Effect of PPAR- β/δ agonist GW0742 treatment in the acute phase response and blood–brain barrier permeability following brain injury. *Translat Res* 182: 27–48.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.10.004>
43. *Senn L, Costa A-M, Avallone R, Socala K, Wlaź P, Biagini G* (2023) Is the peroxisome proliferator-activated receptor gamma a putative target for epilepsy treatment? Current evidence and future perspectives. *Pharmacol Ther* 241: 108316.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108316>

44. Hung T-Y, Chu F-L, Wu DC, Wu S-N, Huang C-W (2019) The Protective Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma in Seizure and Neuronal Excitotoxicity. *Mol Neurobiol* 56: 5497–5506.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1457-2>
45. Peng J, Wang K, Xiang W, Li Y, Hao Y, Guan Y (2019) Rosiglitazone polarizes microglia and protects against pilocarpine-induced status epilepticus. *CNS Neurosci Ther* 25: 1363–1372.
<https://doi.org/10.1111/cns.13265>
46. Hong S, Xin Y, HaiQin W, GuiLian Z, Ru Z, ShuQin Z, HuQing W, Li Y, Yun D (2012) The PPAR γ agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurol Sci* 33: 559–566.
<https://doi.org/10.1007/s10072-011-0774-2>
47. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Klierer SA, Hansen BC, Willson TM (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5306–5311.
<https://doi.org/10.1073/pnas.091021198>
48. Schmeiser B, Li J, Brandt A, Zentner J, Doostkam S, Freiman TM (2017) Different mossy fiber sprouting patterns in ILAE hippocampal sclerosis types. *Epilepsy Res* 136: 115–122.
<https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2017.08.002>
49. 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>
50. Smolensky IV, Zubareva OE, Kalemenev SV, Lavrentyeva VV, Dyomina AV, Karepanov AA, Zaitsev AV (2019) Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res* 372.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112044>
51. Müller CJ, Grötcke I, Bankstahl M, Löscher W (2009) Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Exp Neurol* 219: 284–297.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.035>

Cardarin effect on the formation of histopathological and behavioral abnormalities in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats

M. R. Subkhankulov^a, D. S. Sinyak^a, V. A. Guk^a, T. Yu. Postnikova^a, A. I. Roginskaya^a,
and O. E. Zubareva^{a,*}

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

**e-mail: ZubarevaOE@mail.ru*

Epilepsy is a severe neuropsychological disease accompanied by the development of spontaneous recurrent seizures (SRS) and associated behavioral disorders that are difficult to treat. In recent years, the neuroprotective properties of agonists of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α , β/δ , γ), nuclear transcription factors involved in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism, as well as inflammatory signaling pathways involved in the pathogenesis of epilepsy, have been actively investigated. The neuroprotective properties of PPAR γ agonists have been repeatedly described in models of epilepsy; the effects of PPAR β/δ agonists in these models have not been sufficiently investigated. The aim of this work was to study the effects of administering the PPAR β/δ agonist cardarin on the formation of histopathological and behavioral abnormalities in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (TLE). The lithium-pilocarpine model is one of the best experimental models of chronic temporal lobe epilepsy. In this study, epilepsy was induced by administration of pilocarpine to male Wistar rats at the age of 7 weeks one day after LiCl injection. Cardarin (2.5 mg/kg) was administered daily for 7 days

after pilocarpine, with the first injection one day after pilocarpine injection. Behavioral testing was performed 2–3 months after induction of the model in the following tests: Open Field, Resident Stranger, New Object Exploration, Y Maze Spontaneous Alternation and Morris Water Maze. Brain sampling for histological studies (assessment of neuronal death, Nissl staining) was performed after the end of behavioral experiments, 95 days after TLE induction. It was shown that untreated rats with TLE exhibited significant hippocampal neuron death and behavioral disorders: increased motor activity, anxiety, memory disorders, research and communicative behavior. Caradrin did not affect the survival rate of hippocampal neurons, but reduced the manifestation of almost all the above-mentioned behavioral disorders, except for hyperactivity. Thus, this study demonstrated the promising use of PPAR β/δ agonists to attenuate the development of behavioral disorders characteristic of epilepsy.

Keywords: Temporal lobe epilepsy; lithium-pilocarpine model; peroxisome proliferator-activated receptor agonists; cardarin (GW 501516); behavior; memory; neuronal death in the hippocampus