СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory

N. N. Nalivaeva, D. S. Vasilev, N. M. Dubrovskaya, A. J. Turner, and I. A. Zhuravin 1191

Роль тромбоцитов в онкологических заболеваниях

В. С. Шпакова, С. П. Гамбарян 1209

Экспериментальные статьи

Влияние диета-индуцированного и меланокортинового ожирения на экспрессию триптофангидроксилазы 2 в нейронах среднего мозга и гипоталамуса мышей

Е. В. Михайлова, Д. Л. Свиридова, И. В. Романова, К. В. Деркач, А. О. Шпаков 1238

Оценка эффективности превентивной терапии с индуктором шаперонов U133 в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс

Д. В. Белан, С. Г. Полоник, И. В. Екимова 1251

Изменения внеклеточно регистрируемых потенциалов действия изолированного сердца крысы при развитии стрептозотоцинового диабета

И. В. Кубасов, О. В. Чистякова, И. Б. Сухов, А. А. Панов, М. Г. Добрецов 1266

Пренатальная гипоксия приводит к нарушению формирования нервной ткани энторинальной области коры мозга крыс

Д. С. Васильев, Н. Л. Туманова, Д. С. Калинина 1278

Возможные антиноцицептивные механизмы, запускаемые наномолярными концентрациями уабаина в первичных сенсорных нейронах

В. А. Пенниайнен, М. М. Халисов, С. А. Подзорова, А. В. Анкудинов, В. Б. Плахова, Б. В. Крылов 1289

Влияние “акцентированной эксцентрической нагрузки” на гипертрофию и архитектуру мышц

К. В. Сергеева, Р. В. Тамбовцева 1302

Особенности распределения различных изоформ гемоглобина в эритроцитах крыс

Б. Г. Юшков, С. А. Бриллиант 1312

CONTENTS

Reviews

Role of Neprilysin in Synaptic Plasticity and Memory
N. N. Nalivaeva, D. S. Vasilev, N. M. Dubrovskaya, A. J. Turner, and I. A. Zhuravin 1191

Platelets in Cancer Deseases
V. S. Shpakova and S. P. Gambaryan 1209

Experimental Articles

The Effect of the Diet-Induced and Melanocortine-Type Obesity on the Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in Midbrain and Hypothalamus of Mice
E. V. Mikhailova, D. L. Sviridova, I. V. Romanova, K. V. Derkach, and A. O. Shpakov 1238

Efficiency of Preventive Therapy with Chaperon Inducer U133 in the Model of Preclinical Stage of Parkinson's Disease in Elderly Rats
D. V. Belan, S. G. Polonik, and I. V. Ekimova 1251

Functional Changes in the T-System of Cardiomyocytes of the Isolated Rat Heart during Development of Streptozotocin-Induced Diabetes
I. V. Kubasov, O. V. Chistyakova, I. B. Sukhov, A. A. Panov, and M. G. Dobretsov 1266

Prenatal Hypoxia Disturbs the Formation of Pyramidal Neurons in the Entorhinal Cortex of the Rat Brain
D. S. Vasilev, N. L. Tumanova, and D. S. Kalinina 1278

Possible Antinociceptive Mechanisms Triggered by Nanomolar Concentrations of Ouabain in Primary Sensory Neurons
V. A. Penniyaynen, M. M. Khalisov, S. A. Podzorova, A. V. Ankudinov, V. B. Plakhova, and B. V. Krylov 1289

Effect of Accentuated Eccentric Loading on Muscle Hypertrophy and Architecture
K. V. Sergeeva and R. V. Tambovtseva 1302

Distribution Various Isoforms of Hemoglobin in Rat Red Blood Cells
B. G. Yushkov and S. A. Brilliant 1312

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1191–1208

ОБЗОРЫ

ROLE OF NEPRILYSIN IN SYNAPTIC PLASTICITY AND MEMORY

© 2020 N. N. Nalivaeva[1, 2, *], D. S. Vasilev[1], N. M. Dubrovskaya[1], A. J. Turner[2], and I. A. Zhuravin[1]

[1]*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[2]*School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, United Kingdom*

**e-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk*

Received July 28, 2019
Revised August 24, 2020
Accepted August 25, 2020

Neprilysin (NEP, neutral endopeptidase, endopeptidase-24.11) is an important enzyme being most abundant in the kidney and liver and participating in the degradation of a variety of biologically active peptides. It is essential for the regulation of blood pressure and the normal function of practically all organs in the body, and its dysregulation contributes to the development of such diseases like heart failure, cancer, diabetes, and chronic inflammation. It is also a critical neuropeptidase that terminates the action of various neuropeptides such as enkephalins, substance P, somatostatin, which participate in signaling and regulatory events in the brain. NEP is a major amyloid-degrading enzyme, which makes it an important therapeutic target in Alzheimer's disease (AD). Our studies have revealed that NEP expression declines with age in the brain structures participating in memory and which are mainly affected by AD pathogenesis. Moreover, NEP expression decreases under hypoxic conditions, and prenatal hypoxia leads to its deficit in some brain structures both during development and adulthood, which correlates with a reduced number of labile dendritic spines and cognitive deficit in rats. Using the model of prenatal hypoxia in rats, we have tested the effectiveness of several compounds (inhibitors of caspases, histone deacetylases, tyrosine kinases or nuclear retinoid X receptor agonists as well as an antioxidant, epigallocatechin gallate) which, via different mechanisms, were able to restore NEP expression and activity reduced after prenatal hypoxia and improve cognitive functions in rats. In this paper, we provide an overview of the literature and our data on the role of NEP in synaptic plasticity, neuronal activity, and cognitive functions and outline current approaches to regulate its expression and activity in the brain.

Keywords: aging, AICD, Alzheimer's disease, Aβ peptide, amyloid-degrading enzyme, cognitive deficit, cortex, dendritic spines, embryogenesis, endopeptidase 24.11, epigenetic regulation, HDACs, hippocampus, memory, NEP inhibitors, olfactory bulbs, prenatal hypoxia, striatum

DOI: 10.31857/S0869813920100076

GENERAL CHARACTERISTICS OF NEP

A neutral endopeptidase, neprilysin (NEP, EC 3.4.24.11), is a type II integral membrane protein. It has a short N-terminal domain located in the cytoplasm, a single span membrane domain, and a large C-terminal ectodomain containing the active site, which is localized in the extracellular space where it cleaves various substrates. NEP is a zinc-de-

pendent enzyme, and its zinc-binding domain is localized in the extracellular C-terminal part of the molecule [1]. There is also a soluble form of NEP detected in blood plasma [2], but its origin is still debated [3].

The highest content and activity of NEP is in the kidney, where it represents about 4% of all proteins of the renal brush border membrane from where it was initially isolated [4]. It is also enriched in liver and testis but can be found in many other organs (for review, see [5]). NEP is also expressed in the brain and was shown to cleave enkephalins, which gave it a trivial name enkephalinase. However, after the subsequent discovery of other substrates, NEP was given a more general name – endopeptidase-24.11 [6]. Yet, in the current literature, the enzyme is commonly named neutral endopeptidase or NEP. However, it can also be referred to as CD10 – a leukocyte cell surface antigen, or as CALLA – the common acute lymphoblastic leukemia antigen [7, 8].

The human *NEP* gene is located on chromosome 3 and spans more than 80 kb. It is composed of 24 exons and exists in a single copy [9]. It has two distinct promoters whose operation depends on cell type, although both promoters have similar characteristics and effectiveness for controlling *NEP* gene expression [10]. The *NEP* gene is highly conserved among mammalian species, and three distinct NEP mRNAs identified in humans and rats differ only in their 5'-noncoding regions [11], which makes rat NEP a useful model for studying its regulation and properties for therapeutic purposes. The *NEP* gene is widely distributed in diverse animal species from the nematode worm, *Caenorhabditis elegans*, and the fly, *Drosophila melanogaster* to humans [12]. In *Aplysia californica,* an enzyme similar, although not identical to the mammalian NEP (apNEP), was found both in the CNS and periphery suggesting that it could play a significant role in the control of synaptic transmission [13].

NEP is a glycoprotein and has up to six *N*-linked glycosylation sites depending on its source [14] and can also be sialylated [15]. The NEP molecule can undergo various modifications within the cytoplasmic domain, which regulate its transport and functions. NEP myristoylation at the N-terminal site (Gly^2) affects the membrane targeting of the enzyme [16]. NEP phosphorylation by casein kinase II (CKII) blocks focal adhesion kinase signaling [17], while phosphorylation at Ser 6 inhibits its interaction with a tumour suppressor – phosphatase and tensin homolog (PTEN) – which acts as a regulator of the cell cycle [18]. As such, NEP serves dual functions in extracellular and intracellular signal transduction.

The list of NEP substrates and its functions is continuing to expand. NEP cleaves a wide range of peptides containing up to 40–50 amino acids (for review, see [19]). Among the most efficiently hydrolyzed substrates, in addition to enkephalins, are tachykinins (substance P), calcitonin gene-related peptide (CGRP), somatostatin, adrenomedullin, glucagon, thymopentin, endothelins, the atrial natriuretic peptide family, bradykinin, members of the vasoactive intestinal peptide family, etc. Moreover, NEP is the major amyloid-degrading enzyme cleaving β amyloid (Aβ)-peptide, which makes it an important player in the pathogenesis and therapeutics of Alzheimer's disease (AD) (for review, see [20, 21]).

The pH optimum for NEP activity is around 6.0 [22]. Since it is exclusively a zinc-dependent enzyme with the zinc-binding domain located in the extracellular C-terminal part of the molecule [1], it is inhibited by zinc-chelating reagents. There is a range of synthetic inhibitors widely used for studying NEP properties and for clinical application. Among them, the most widely used NEP inhibitors are thiorphan [23] and phosphoramidon [24], although the latter is less specific and inhibits other metallopeptidases. Because of the role of NEP in the regulation of blood pressure and heart failure, various NEP inhibitors have been designed. However, the observations that loss of NEP activity can promote the accumulation of Aβ in the brain or enhance the activity of mitogenic peptides urged caution for the chronic application of NEP inhibitors in humans [25]. Apart from synthetic inhibitors, there are natural endogenous NEP inhibitors, such as sialorphin – the stress-response

peptide [26] and "opiorphins" with strong analgesic properties [27] which also have a medical application.

LOCALIZATION OF NEP IN THE BRAIN

In the brain, NEP expression was confirmed in the majority of the structures [6, 28] as well as in the choroid plexus [29]. It is also present in the cerebrospinal fluid, although NEP activity is much lower than in the brain [2]. The highest protein levels of NEP are found in the striatum [30]. NEP is primarily located on neuronal cells, especially in the striatonigral pathway [28], and in Schwann cells in the peripheral nervous system [31]. Immunofluorescence analyses confirmed that NEP is localized along axons and at the synapses, which suggests that after synthesis in the soma NEP is transported to the synapses via the anterograde axonal transport system [32]. Even in *Aplysia* CNS ganglia, expression of NEP-like peptidase (apNEP) mRNA was found both in the cell bodies and in neurites of the neuropil and peripheral nerves [13]. Application of NEP inhibitors resulted in a prolonged physiological delay in response of slugs to stimulation, which suggests that the role of NEP-like endopeptidases in the regulation of behavior was established early in evolution. Axonal and dendritic localization of NEP was also shown in the *Drosophila* nervous system [33].

In the mouse hippocampus, NEP is mostly present in the CA1-3 fields and the molecular layer of the dentate gyrus and is subcellularly localized along axons and at synapses [34]. NEP expression was observed in GABAergic neurons but not in catecholaminergic or cholinergic neurons [34]. Recently it was confirmed that, in mice, GABAergic neurons are especially enriched in NEP and that NEP mRNA is detectable in the parvalbumin-expressing interneurons. At the same time, NEP protein is localized in the perisomatic synapses [35]. Intriguingly, cholinergic neurons, which are the most vulnerable in AD brains, lack NEP expression [34, 35].

Although detectable NEP levels have not been reported in astrocytes and microglia in the normal brain under some pathological conditions, NEP expression can be up-regulated in these types of cells *in vitro*. For example, under hypoxic conditions, astrocytes were shown to increase NEP protein levels [36] while inflammatory conditions (IL-4 administration) activated NEP expression in type 2 microglia [37]. Some authors suggest that NEP expressed by astrocytes and microglia plays an important role in AD pathogenesis (for review see [38]).

NEP localization in the brain is, to a great extent, dictated by the distribution of its major substrates. Thus, there is a strong correlation between the distribution of NEP and μ and δ opioid receptors in different rat brain regions [39], and NEP was shown to selectively control opioid biosynthesis in the hypothalamus and spinal cord [40]. Immunochemical analysis has also confirmed the colocalization of NEP and substance P in the substantia nigra [41]. In the striatum and hippocampus, NEP was found to be the major somatostatin-degrading enzyme [31], and co-expression of multiple somatostatin receptor subtypes and NEP was shown in the meningeal cells which possess a high capacity to inactivate somatostatin by proteolytic degradation [42]. Somatostatin receptors are widely expressed in the olfactory bulbs and all other olfactory structures, where somatostatin regulates olfactory discrimination responses [43].

NEP IN BRAIN DEVELOPMENT

In the developing brain, the only structure distinctly labeled for NEP before birth, as shown by *in vitro* autoradiography in rats, is the external layer of the olfactory bulbs [44]. According to our data, in other brain structures, such as the striatum and cortex, NEP protein level is steadily increasing during the first month after birth and then either stays at a very high level (in the striatum) or declines with age (in the cortex) [30]. In mice, high

NEP expression in the embryonic brain was reported in the nigrostriatal axis, nucleus accumbens, and globus pallidus at E9 with a steady decrease until birth and then remaining at that level during postnatal ontogenesis [45]. This suggests that in different species, distinct cerebral localization of NEP during ontogenesis could reflect certain specificity in the development of the peptidergic system.

In the peripheral nervous system, NEP expression was detected in rat sciatic nerve at E16. However, the levels of immunoreactive protein and enzyme activity declined with age, suggesting that in the Schwann cells, NEP regulation is also age-dependent [46]. It was also observed that NEP expression increases in the Schwann cells after axonal damage, which suggests that it plays an essential role in nerve development and regeneration [47]. Interestingly, in patients with Charcot–Marie–Tooth disease, a loss-of-function NEP mutation leads to the development of axonal neuropathy in the peripheral nerves correlating with muscle weakness and sensory disturbance, but these patients do not demonstrate symptoms of dementia [48].

NEP is expressed in stem cells and has been used as a marker of stem cells in many tissues (for review, see [49]. It is also expressed in some types of neuroblastoma cells, which makes them convenient models for studying NEP gene regulation [10].

NEP gene knockout in mice is not lethal, and animals develop normally. Still, they are highly sensitive to endotoxic shock, which confirms that NEP plays an essential role in the metabolism of proinflammatory peptides [50]. NEP gene deletion also increases the thermo-nociceptive threshold in mice suggesting that NEP controls opioid metabolism in the hypothalamus and spinal cord [51]. NEP knockouts also have enhanced aggressive behavior in the resident-intruder paradigm and altered locomotor activity [52]. They are also prone to increased consumption of alcohol compared to the wild type mice [53]. NEP deficit in the knockout mice also enhances pain symptoms and neurogenic inflammation after nerve injury [54], supporting the role of NEP in pain signaling.

Our multidisciplinary studies on the role of prenatal hypoxia in development of motor and cognitive functions in rats (for review, see [55]) have demonstrated a significant reduction of NEP mRNA, protein levels and enzyme activity in the cortex and hippocampus of the offspring which correlated with morphological changes in these brain structures and cognitive impairment during postnatal development [56–58]. These animals are also characterized by a decrease in the number of labile synaptopodin-positive dendritic spines in the cortex and hippocampus [58, 59]. The reduction of the number of dendritic spines in the molecular level of the parietal cortex might be related to the prenatal hypoxia-induced death of the pyramidal neurons in the lower layers of the cortex whose apical dendrites form the spines. One of the reasons for reduced spine density in the *stratum pyramidale* of the hippocampus might be impaired CA1 innervation coming from the neurons of the entorhinal cortex [60], which was observed in rats subjected to prenatal hypoxia [61]. Because of the primary localization of NEP in the synapses, the decrease in the number of the dendritic spines, and as such of the number of synaptic contacts, correlates well with reduced NEP protein levels and activity in these brain areas. In agreement with our studies are reports that prenatal hypoxia in AD mice ($APP_{Swe}/PS1_{A246E}$) results not only in a significant decrease in synapses and impaired learning and memory of the offspring but also in lower levels of NEP and enhanced accumulation of the amyloid Aβ peptide in their brain [62].

ROLE OF NEP IN MEMORY AND SYNAPTIC PLASTICITY

Because of the important role of NEP in peptidergic neurotransmission and its synaptic localization, it is not surprising that this enzyme is involved in various processes underlying synaptic plasticity and memory (Fig. 1). High levels of NEP expression in the first month of rodent development, as shown in our studies, coincides with the period of active formation of the neuronal network, which shapes the whole repertoire of animal behavior in later

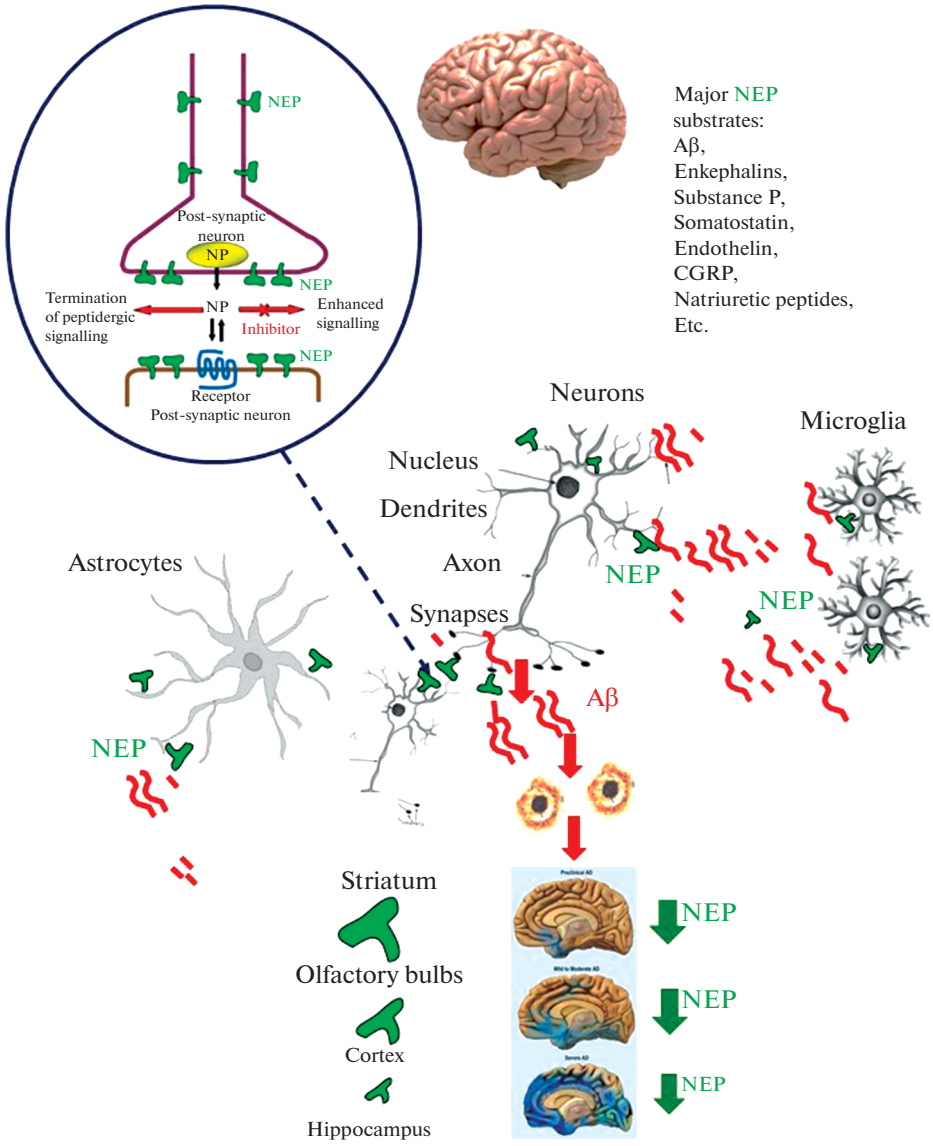


Fig. 1. Schematic representation of NEP brain distribution, signaling, and localization in relation to the sites of Aβ cleavage and AD pathology. The inserts at the top of the figure give the names of major NEP substrates and a scheme of NEP action at the synapses (NP – neuropeptides). The inserts in the bottom part show the spread of amyloid load in the AD brain, which inversely correlates with the levels of NEP content and activity in brain structures. The highest levels of NEP expression and activity are observed in the striatum and olfactory bulbs with much lower levels in the cortex and hippocampus, where NEP expression also significantly decreases with aging. The size of the letters and arrows in the bottom panel reflects the levels of NEP expression and activity.

life. Any disruptive conditions which result in decreased levels of NEP expression and activity in the brain will lead to memory deficits and cognitive impairment, as shown in our studies using the model of prenatal hypoxia [30, 55, 57, 58].

The role of NEP in neuronal signaling and memory has been established in invertebrates using *Drosophila melanogaster*, which has four NEP genes. It was shown that protein products of all four genes are involved in the middle- and long-term memory in flies [63] and are required for cleaving neuropeptides in the mushroom bodies and closely connected pairs of neurons. Most recently, these authors have shown that neprilysin 1 (Nep1) is terminating the signaling function of a peptide Amnesiac required for specific memory phases in the olfactory memory center in fly mushroom bodies [64].

The role of NEP in memory has been studied in various research paradigms. Our studies on the effects of *i.c.* administration of the NEP inhibitors thiorphan or phosphoramidon to the sensorimotor cortex of rats have demonstrated significant impairment of short-term memory tested in a two-level radial maze even after a single injection of either inhibitor [65]. These results were in good agreement with the effect of chronic inhibition of NEP by continuous administration of thiorphan via an osmo-pump during four weeks, which led to significant cognitive dysfunction manifested by reduced ability to discriminate objects in the recognition test and spatial memory in the water maze [66]. Intracortical injection of phosphoramidon to rats also resulted in a reduced number of dendritic spines in the molecular layer of the brain cortex, which correlated with impaired short-term working memory tested in the two-level radial maze [67]. Continuous administration of thiorphan into rat hippocampus also led to cognitive impairment, which correlated with the decreased nicotine-stimulated release of acetylcholine, indicating that NEP inhibition reduces the cholinergic activity of hippocampal neurons [68].

NEP AND ALZHEIMER'S DISEASE

Among the broad spectrum of NEP substrates, probably the most studied is Aβ peptide, which is causative of AD pathology [69, 70]. The first demonstration that NEP can cleave Aβ *in vitro* [71] was also confirmed *in vivo* in the rat brain parenchyma [72] and NEP knockout mice [73]. Chronic administration of the NEP inhibitor thiorphan into the rat hippocampus was also shown to result in the accumulation of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in the hippocampal areas [68].

NEP inhibition or gene knockout in animal models recapitulate the pathological hallmarks of AD resulting in the accumulation of Aβ in the areas affected in human brains [73, 74]. Interestingly, NEP gene knockout in APP_{Sw} mice modeling AD led to the changes in expression of more than 600 proteins, including some which were not previously reported to be linked to AD but associated with increased Aβ levels [75]. These mice also exhibited enhanced amyloid pathology compared with only APP transgenics and had more severe learning and memory deficit [76].

In the human brain, reduced NEP levels were reported in the vasculature [77] as well as in the hippocampus and temporal gyrus, which are mostly affected in AD [78]. A meta-analysis of NEP levels in AD suggests that NEP expression and activity are decreased in the cortex of elderly AD patients [79]. Using the NEP inhibitor thiorphan and Aβ administration, an AD-like pathology model has been established in nonhuman primates [80].

Transfection of the NEP gene or recombinant NEP to the brain of AD mice was shown to clear amyloid load and improve animal memory and cognition [81, 82]. This confirmed a significant role of NEP in the clearance of Aβ from the brain as well as making it an important therapeutic target in AD (for review, see [20, 21]).

Further manipulations with NEP expression in AD transgenic mice led to a deeper understanding of the role which this enzyme plays in neuronal signaling and cognitive functions. As shown recently, knockout of the NEP gene in APP_{SW} mice results in dramatic

changes in the brain proteome affecting not only the major proteins participating in amyloid metabolism but also in neurotransmission, in particular of the excitatory amino acid transporter 2 (EAA2) which was significantly increased in the NEP KO AD mice [75]. On the other hand, the AD transgenic mice (5XFAD) *per se* have reduced NEP expression, and further reduction of its expression by knocking out the NEP gene results in an even more severe AD phenotype [83]. Cross-breeding of APP23 mice with NEP deficient mice has shown that NEP activity deficit in the brain elevated oligomeric forms of Aβ at the synapses and impaired hippocampal synaptic plasticity and cognitive function even before the appearance of amyloid plaques [84]. This testifies that reduced NEP activity might be causative and at least partly responsible for the memory deficit symptoms in early AD, which also supports the strategy to enhance NEP for alleviating these symptoms. On the other hand, engrafting stem cells expressing NEP in the brain of 3xTg-AD and Thy1-APP AD mice not only reduced the Aβ pathology but increased the synaptic density in both strains of animals. Importantly, the Aβ loads were reduced not only in the hippocampus and subiculum, which were adjacent to the engrafts but also within the amygdala and medial septum, which receive afferent projections from the engrafted region [85].

One of the prominent features of AD is the early loss of cholinergic neurons (for review, see [86]). In AD modeling APP_{Sw} mice, it was shown that high Aβ load damages cholinergic axons in the cortex with subsequent retrograde-induced cell death of cholinergic neurons [87]. This degenerative process might be due to the Aβ binding to the α7 nicotinic acetylcholine receptors, which explicitly affects the proteome in cholinergic neurons [88], leading to aberrant neuritic sprouting and cholinergic dysfunction [89]. Recent studies have also shown that streptozotocin-induced late-onset AD phenotype is accompanied by a decrease in brain ACh, increased AChE activity, and reduced NEP protein levels [90]. Since cholinergic neurons do not express NEP, they might lack an intrinsic mechanism of Aβ removal, which makes them vulnerable to Aβ-related cell death.

Because one of the early symptoms of AD is impaired olfaction [91], and early accumulation of Aβ peptide in the olfactory areas was reported in AD mice [92], it is reasonable to expect some NEP deficit in these brain areas. However, such data to our knowledge are still missing. Our data suggest that, in the rat brain, NEP mRNA levels decline with aging in the olfactory bulbs and more significantly in the entorhinal cortex and hippocampus (unpublished data, manuscript in preparation). Importantly, in the anterior olfactory nucleus levels of somatostatin – one of the NEP substrates – were reported to be 50% lower in AD brains compared to controls [93]. Although decreased somatostatin levels might be caused by increased degradation of this peptide, which plays an essential role in olfactory signaling, it might also lead to reduced NEP levels since somatostatin induces its expression [94]. Anyway, the involvement of the olfactory system in AD pathology and the role of NEP in the olfactory signaling in health and disease deserves further investigation.

REGULATION OF NEP IN THE BRAIN

Due to the critical role which NEP plays in brain functions and AD pathogenesis, numerous approaches have been developed to up-regulate its levels. Recently, we have extensively reviewed current pharmacological and epigenetic approaches for modulating NEP expression and activity [21]. Below we shall be mostly focusing on our works using the model of prenatal hypoxia as an *in vivo* tool for testing various biologically active compounds and highlighting some other therapeutic avenues which aim at up-regulation of NEP levels and activity (Table 1).

In neuronal cell culture studies it was found that NEP gene expression is controlled by competitive binding to its promoter of histone deacetylases HDAC1 and HDAC3 and the amyloid-precursor protein (APP) intracellular domain AICD which is formed in amyloidogenic APP processing alongside Aβ [10, 95] (Fig. 2). Such regulation provides an en-

Table 1. Summary of the effects of various treatments on the memory, synaptic plasticity, and NEP activity in rats

Conditions	Short-term memory		Number of synaptopodin-positive dendritic spines		NEP activity	
	radial 8-arm maze	novel object recognition test (10 min after initial testing)	parietal cortex	hippocampus	parietal cortex	hippocampus
Prenatal hypoxia on E14	Impaired compared to controls	Impaired compared to controls	Decreased compared to controls	Decreased compared to controls	Decreased compared to controls	Decreased compared to controls
Normal aging (14 months old)	Declines compared to normal adult rats (3-4 months old)	No statistically significant changes	Decreased compared to normal adult rats (3-4 months old)	Decreased compared to normal adult rats (3-4 months old)	Decreased compared to normal adult rats (3-4 months old)	Decreased compared to normal adult rats (3-4 months old)
Phosphoramidon (cortical injections to adult rats)	Impaired compared to controls	Impaired compared to controls	Decreased compared to controls	No statistically significant changes	Decreased compared to controls	Decreased compared to controls
Sodium valproate administration to adult rats subjected to prenatal hypoxia on E14	Improved compared to rats treated with saline	Improved compared to rats treated with saline	Increased compared to rats treated with saline	No statistically significant changes	Increased compared to rats treated with saline	Increased compared to rats treated with saline
EGCG administration to adult rats subjected to prenatal hypoxia on E14	Improved compared to rats treated with saline	Improved compared to rats treated with saline	No statistically significant changes	Increased compared to rats treated with saline	Increased compared to rats treated with saline	Increased compared to rats treated with saline

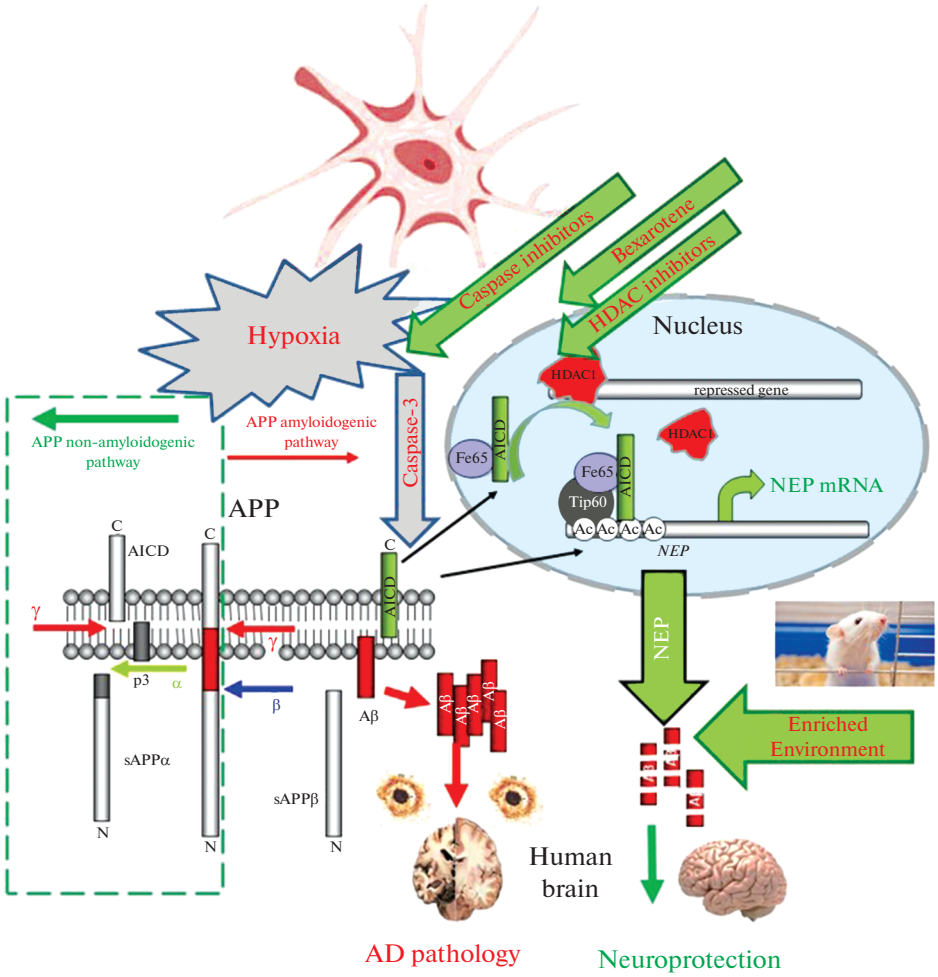


Fig. 2. Pathways for the regulation of NEP expression. In neuronal cells, NEP regulation involves the binding of the amyloid precursor protein (APP) intracellular domain (AICD) to its gene promoter. AICD is formed alongside Aβ amyloid peptide in the amyloidogenic pathway, which includes proteolytic cleavage of APP by β- and γ-secretases. AICD with a stabilizing protein Fe65 is transported to the nucleus, where it engages a histone acetylase Tip60. This complex binds to the NEP gene promoter, replacing HDAC and increasing histone acetylation, which allows NEP gene expression [10]. This provides neuronal cells with a feedback mechanism that should control Aβ levels. Treatment of cells or animals with the HDAC inhibitor sodium valproate leads to increased binding of AICD to the NEP gene promoter, which up-regulates NEP mRNA and protein levels and enzyme activity. Bexarotene also activates the expression of NEP via reducing HDAC occupancy at the NEP gene promoter [109]. Hypoxia leads to an increased caspase activity, which reduces AICD levels and NEP expression while caspase inhibitors rescue functionally active AICD both in the cells and rat brain [105, 107]. Maintenance of animals under enriched environment also stimulates NEP expression leading to clearance of amyloid peptide and improving their memory [114]. In the human brain, the accumulation of Aβ peptide leads to AD pathology, which can be prevented by the upregulation of NEP expression and activity.

dogenous feedback mechanism allowing cells to control levels of Aβ produced by APP cleavage, as initially suggested in [96]. Also, the NEP-dependent mechanism of controlling Aβ levels indicates that Aβ is a physiologically relevant neuropeptide, as suggested by various authors [35, 97, 98] with particular relevance to activity-dependent regulation of synaptic vesicle release [99] and memory consolidation [100].

Since NEP expression is controlled by HDACs, it was reasonable to suggest that HDAC inhibitors are capable of up-regulating its levels. Indeed, treatment of SH-SY5Y cells expressing low levels of NEP with an HDAC inhibitor sodium valproate (VA) was shown to increase NEP mRNA, protein, and activity in these cells [10]. Our further work in rats has confirmed that VA administration up-regulated NEP expression and activity in rat brain structures, in particular in the hippocampus where sodium VA treatment led to increased binding of AICD to the NEP gene promoter [57]. This effect was brain region- and age-specific. In rats subjected to prenatal hypoxia, we also observed that VA administration restored NEP activity and memory deficit, as well as increased the number of dendritic spines [67]. Later it was demonstrated that VA reduced Aβ-related neuropathology in AD mice subjected to prenatal hypoxia by preventing the decrease of H3-acetylation in the NEP gene promoter region and increasing levels of NEP expression [101]. This suggests that the application of VA or more specific HDAC inhibitors is a viable strategy for the up-regulation of NEP expression and activity and improvement of cognitive functions of pathologically developing or aging brain. Indeed, recently it was shown that administration of a specific HDAC3 inhibitor RGFP-966 to the AD mice (3xTg-AD) was able to reverse tau pathology and decrease levels of $A\beta_{42}$ in the brain and periphery by increasing NEP levels, which correlated with improved spatial learning memory [102]. Our study using a green tea catechin, epigallocatechin gallate (EGCG), which also acts as an HDAC inhibitor [103], demonstrated that intracortical or oral administration of this compound to adult rats was able to restore levels of NEP in the cortex and hippocampus reduced after prenatal hypoxia. Moreover, EGCG administration resulted in an increased number of dendritic spines in the hippocampal CA1 area, which correlated with memory enhancement [58]. In AD mice, EGCG administration was also shown to attenuate cognitive deterioration by up-regulating NEP expression [104].

Analyzing the reasons for reduced NEP expression under hypoxic conditions, we have found that it correlates with the up-regulation of caspases, which degrade AICD [105]. Incubation of cells under hypoxic conditions with a caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK rescued AICD and allowed its normal binding to the NEP promoter. Taking this paradigm to the rat model, we have found that prenatal hypoxia led to a significance increase in caspase levels and activity in the brain of rat offspring, which correlated with reduced levels of AICD and NEP [106, 107]. Administration of a caspase inhibitor Ac-DEVD-CHO to developing rats subjected to prenatal hypoxia increased levels of AICD and NEP expression in their cortex, which correlated with the improved cognitive performance [107, 108].

Among other pharmacological compounds capable of up-regulating NEP expression and activity are bexarotene, an agonist of the nuclear retinoid X receptor, which was shown to up-regulate NEP expression affecting HDAC1 binding to the NEP gene promoter [109] and a tyrosine kinase inhibitor Gleevec (imatinib) whose administration to the SH-SY5Y cells increased levels of "functional" AICD and up-regulated NEP leading to lower levels of cellular Aβ [105]. Intraventricular injection of bexarotene to young rats subjected to prenatal hypoxia was shown to increase the number of synaptopodin-positive dendritic spines in the CA1 field of the hippocampus and improve their memory [110].

Because somatostatin can up-regulate the expression of its degrading peptidase NEP [94], it was also suggested that agonists of somatostatin receptors might have a potential therapeutic effect. Indeed, *i.c.v.* administration of the somatostatin receptor subtype-4 agonist, NNC 26-9100, to 12-month SAMP8 mice, increased NEP activity in the cortical tissue as-

sociated with increased protein levels in the extracellular and decreased in the intracellular fractions and improved learning and memory [111].

Serotoninergic activation was also suggested to be beneficial in AD models, and it was shown that 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA), the final metabolite of serotonin, significantly reduces brain Aβ load in the transgenic APP_{SWE} mice by enhancing NEP levels. 5-HIAA treatment also improved memory in mice with phosphoramidon-induced cerebral NEP inhibition [112].

Supporting the role of NEP in synaptic plasticity are data on overexpression of a postsynaptic density protein 93 (PSD-93) in APP/PS1 mice which resulted not only in improved animal performance in the open field, Morris water maze and fear condition tests but also facilitated LTP which was accompanied by increased expression of somatostatin receptor 4 (SSTR4) and NEP [113].

There are reports that NEP levels in postnatal life are dependent on the environment in which animals have been raised and that levels of brain NEP activity were higher in mice raised in an "enriched environment", which also correlated inversely with the Aβ levels [114]. The enriched environment was also shown to improve synaptic plasticity and cognition and neonatal rats subjected to hypoxia/ischemia [115], which correlated with the increased levels of BDNF. As suggested previously, exercising modulates expression and protein content both of NEP and BDNF, leading to improved memory [116]. In aged wild type mice, environmental enrichment enhanced neuronal plasticity by upwardly shifting the cortical excitation/inhibition balance, increased NEP protein levels, and reduced brain Aβ oligomers [117].

Although decreased NEP expression and activity in the brain observed with normal aging can lead to accumulation of Aβ and, related to it, neurodegeneration, it is important to bear in mind that NEP has multiples substrates and is involved in many critical brain processes. While in aged AD mice decreased NEP expression and activity is always accompanied by accumulation of Aβ and impaired memory [76], in NEP-knockout mice with unchanged APP expression immunohistochemical analysis did not reveal Aβ deposits even in old age. Moreover, learning abilities in aged animals with this genotype were enhanced compared to the wild type suggesting that some compensatory mechanisms might develop during the development of these animals to substitute for the absence of NEP [118].

CONCLUSIONS

Over the years since its discovery, NEP has attracted a significant amount of interest and research in various areas of physiology and medicine. Current knowledge about this enzyme made it an attractive therapeutic target in such areas as cardiovascular medicine, cancer, diabetes, and neurodegeneration. While for treatment of some diseases development of NEP inhibitors is paramount (heart failure, hypertension), in other areas, there is a need to up-regulate NEP expression and activity (cancer and AD). Although numerous pharmacological and epigenetic approaches have been developed to up-regulate NEP expression and activity (for review, see [21]), treatment of different types of pathology that involve NEP requires a more profound understanding of the role of this peptidase and specificity of its regulation in various cell types. Since the age-dependent decline in NEP expression and activity in certain brain structures is a natural process, it might have a defined intrinsic physiological role for maintaining age-dependent brain homeostasis and regulating the balance of excitatory and inhibitory processes [35]. However, it also underlies the age-dependent elevation of Aβ concentrations in the brain, which is a natural process that precedes AD pathology [119]. This requires more studies on developmental profiles of NEP expression in animal and human brain in relation to the functions of its primary substrates, including Aβ, which will open new avenues for designing strategies for manipulating NEP expression and activity for therapeutic benefits.

SOURCE OF SUPPORT

Supported by RFBR (№ 19-015-00232) and Russian state budget (assignment AAAA-A18-118012290373-7).

REFERENCES

1. *Fulcher I.S., Kenny A.J.* Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic forms of endopeptidase purified from pig kidneys. Biochem. J. 211: 743–753. 1983. https://doi.org/10.1042/bj2110743
2. *Spillantini M.G., Sicuteri F., Salmon S., Malfroy B.* Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 ("enkephalinase") activity in human plasma and cerebrospinal fluid. Biochem. Pharmacol. 39: 1353–1356. 1990. https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90012-a
3. *Kuruppu S., Rajapakse N.W., Minond D., Smith A.I.* Production of soluble Neprilysin by endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 446(2): 423–427. 2014. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.158
4. *Kerr M.A., Kenny A.J.* The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. Biochem. J. 137: 477–488. 1974. https://doi.org/10.1042/bj1370477
5. *Nalivaeva N.N., Turner A.J.* Neprilysin. In: *Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen*, editors, Handbook of Proteolytic Enzymes. Oxford: Academic Press. 612–619. 2013.
6. *Matsas R., Kenny A.J., Turner A.J.* An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. Neuroscience. 18: 991–1012. 1986. https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90113-2
7. *Letarte M., Vera S., Tran R., Addis J.B.L., Onizuka R.J., Quackenbush E.J., Jongeneel C.V., McInnes R.R.* Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168: 1247–1253. 1988. https://doi.org/10.1084/jem.168.4.1247
8. *Jongeneel C.V., Quackenbush E.J., Ronco P., Verroust P., Carrel S., Letarte M.* Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen Expressed on Leukemia and Melanoma Cell Lines Has Neutral Endopeptidase Activity. J. Clin. Invest. 83: 713–717. 1989. https://doi.org/10.1172/JCI113936
9. *D'Adamio L., Shipp M.A., Masteller E.L., Reinherz E.L.* Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 7103–7107. 1989. https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.7103
10. *Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J.* Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rep. 10: 94–100. 2009. https://doi.org/10.1038/embor.2008.222
11. *Li C., Booze R.M., Hersh L.B.* Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. J. Biol. Chem. 270: 5723–5728. 1995. https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.5723
12. *Turner A.J., Isaac R.E., Coates D.* The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. Bioessays. 23: 261–269. 2001. https://doi.org/10.1002/1521-1878(200103)23:3<261::AID-BIES1036>3.0.CO;2-K
13. *Zappulla J.P., Wickham. L., Bawab. W., Yang. X.F., Storozhuk. M.V., Castellucci. V.F., DesGroseillers. L.* Cloning and characterization of Aplysia neutral endopeptidase, a metallo-endopeptidase involved in the extracellular metabolism of neuropeptides in Aplysia californica. J. Neurosci. 19: 4280–4292. 1999. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04280.1999
14. *Shipp M.A., Richardson N.E., Sayre P.H., Brown N.R., Masteller E.L., Clayton L.K., Ritz J., Reinherz E.L.* Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4819–23. 1988. https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4819
15. *Lorkowski G., Zijderhand-Bleekemolen J.E., Erdös E.G., von Figura K., Hasilik A.* Neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase). Biosynthesis and localization in human fibroblasts. Biochem. J. 248: 345–350. 1987. https://doi.org/10.1042/bj2480345
16. *Zheng R., Horiguchi A., Iida K., Lee J., Shen R., Goodman O.B. Jr., Nanus D.M.* Neutral endopeptidase is a myristoylated protein. Mol. Cell. Biochem. 335: 173–180. 2010. https://doi.org/10.1007/s11010-009-0253-8
17. *Ganju R.K., Shpektor R.G., Brenner D.G., Shipp M.A.* CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src-related kinase. Blood 88: 4159–4165. 1996. https://doi.org/10.1182/blood.V88.11.4159.bloodjournal88114159

18. *Siepmann M., Kumar S., Mayer G., Walter J.* Casein kinase 2 dependent phosphorylation of neprilysin regulates receptor tyrosine kinase signaling to Akt. PLoS One 5: e13134. 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013134
19. *Bayes-Genis A., Barallat J., Richards A.M.* A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. J. Am. Coll. Cardiol. 68: 639–653. 2016. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.04.060
20. *Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Zhuravin I.A., Turner A.J.* The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? Int. J. Alzheimers Dis. 2012: 383796. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/383796
21. *Nalivaeva N.N., Turner A.J.* Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. Br. J. Pharmacol. 176: 3447–3463. 2019. https://doi.org/10.1111/bph.14593
22. *Kerr M.A., Kenny A.J.* The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. Biochem. J. 137: 477–488. 1974. https://doi.org/10.1042/bj1370477
23. *Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C., Florentin D., Waksman G., Sassi A., Chaillet P., Collado H., Costentin J.* New enkephalinase inhibitors as probes to differentiate "enkephalinase" and angiotensin-converting-enzyme active sites. Life Sci. 31: 1749–1752. 1982. https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90201-6
24. *Komiyama T., Aoyagi T., Takeuchi T., Umezawa H.* Inhibitory effects of phosphoramidon on neutral metalloendopeptidases and its application on affinity chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65: 352–357. 1975. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(75)80100-8
25. *Campbell D.J.* Long-term neprilysin inhibition – implications for ARNIs. Nat. Rev. Cardiol. 14: 171–186. 2017. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.200
26. *Rougeot C., Messaoudi M., Hermitte V., Rigault A.G., Blisnick T., Dugave C., Desor D., Rougeon F.* Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 8549–8554. 2003. https://doi.org/10.1073/pnas.1431850100
27. *Wisner A., Dufour E., Messaoudi M., Nejdi A., Marcel A., Ungeheuer M.N., Rougeot C.* Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 17979–17984. 2006. https://doi.org/10.1073/pnas.0605865103
28. *Barnes K., Matsas R., Hooper N.M., Turner A.J., Kenny A.J.* Endopeptidase-24.11 is striosomally ordered in pig brain and, in contrast to aminopeptidase N and peptidyl dipeptidase A ('angiotensin converting enzyme') is a marker for a set of striatal efferent fibres. Neuroscience. 27: 799–817. 1988. https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90184-4
29. *Bourne A., Kenny A.J.* The hydrolysis of brain and atrial natriuretic peptides by porcine choroid plexus is attributable to endopeptidase-24.11. Biochem J. 271: 381–385. 1990. https://doi.org/10.1042/bj2710381
30. *Nalivaeva N.N., Fisk L., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J.* Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1035: 21–33. 2004. https://doi.org/10.1196/annals.1332.002
31. *Barnes K., Doherty S., Turner A.J.* Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. J. Neurochem. 64: 1826–1832. 1995. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64041826.x
32. *Waksman G., Hamel E., Delay-Goyet P., Roques BP.* Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. EMBO J. 5: 3163–3166. 1986. PMID: .3545813
33. *Iijima-Ando K., Hearn S.A., Granger L., Shenton C., Gatt A., Chiang H.C., Hakker I., Zhong Y., Iijima K.* Overexpression of neprilysin reduces alzheimer amyloid-beta42 (Abeta42)-induced neuron loss and intraneuronal Abeta42 deposits but causes a reduction in cAMP-responsive element-binding protein-mediated transcription, age-dependent axon pathology, and premature death in Drosophila. J. Biol. Chem. 283: 19066–19076. 2008. https://doi.org/10.1074/jbc.M710509200
34. *Fukami S., Watanabe K., Iwata N., Haraoka J., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Fraser P., Westaway D., St George-Hyslop P., Saido T.C.* Aβ-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Aβ pathology. Neurosci. Res. 43: 39–56. 2002. https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00015-9
35. *Pacheco-Quinto J., Eckman C.B., Eckman E.A.* Major amyloid-β-degrading enzymes, endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin, are expressed by distinct populations of GABAergic interneurons in hippocampus and neocortex. Neurobiol. Aging. 48: 83–92. 2016. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.011

36. *Fisk L., Nalivaeva N.N., Boyle J.P., Peers C.S., Turner A.J.* Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. Neurochem. Res. 32: 1741–1748. 2007.
https://doi.org/10.1007/s11064-007-9349-2
37. *Shimizu E., Kawahara K., Kajizono M., Sawada M., Nakayama H.* IL-4-induced selective clearance of oligomeric β-amyloid peptide$_{1-42}$ by rat primary type 2 microglia. J. Immunol. 181: 6503–6513. 2008.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6503
38. *Ries M., Sastre M.* Mechanisms of Aβ Clearance and Degradation by Glial Cells. Front. Aging Neurosci. 8: 160. 2016.
https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00160
39. *Waksman G., Hamel E., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P.* Autoradiographic Comparison of the Distribution of the Neutral Endopeptidase "Enkephalinase" and of Mu and Delta Opioid Receptors in Rat Brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 1523–1527. 1986.
https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1523
40. *Saria A., Hauser K.F., Traurig H.H., Turbek C.S., Hersh L., Gerard C.* Opioid-related changes in nociceptive threshold and in tissue levels of enkephalins after target disruption of the gene for neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in mice. Neurosci. Lett. 234: 27–30. 1997.
https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00660-5
41. *Barnes K., Turner A.J., Kenny A.J.* An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows colocalization of endopeptidase-24.11 with substance P. Neuroscience. 53: 1073–1082. 1993.
https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90490-7
42. *Feindt J., Krisch B., Lucius R., Mentlein R.* Meningeal cells are targets and inactivation sites for the neuropeptide somatostatin. Brain Res. Mol. Brain. Res. 44: 293–300. 1997.
https://doi.org/10.1016/s0169-328x(96)00229-x
43. *Nocera S., Simon A., Fiquet O., Chen Y., Gascuel J., Datiche F., Schneider N., Epelbaum J., Viollet C.* Somatostatin Serves a Modulatory Role in the Mouse Olfactory Bulb: Neuroanatomical and Behavioral Evidence. Front. Behav. Neurosci. 13: 61. 2019.
https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061
44. *Dutriez I., Salès N., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P.* Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24-11 ('enkephalinase') studied by in vitro autoradiography in the rat. Experientia. 48: 290–300. 1992.
https://doi.org/10.1007/bf01930479
45. *Dauch P., Masuo Y., Vincent J.P., Checler F.* A survey of the cerebral regionalization and ontogeny of eight exo- and endopeptidases in murines. Peptides. 14: 593–599. 1993.
https://doi.org/10.1016/0196-9781(93)90150-f
46. *Kioussi C., Crine P., Matsas R.* Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming Schwann cells during development of the rat sciatic nerve. Neuroscience. 50: 69–83. 1992.
https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90382-c
47. *Kioussi C., Mamalaki A., Jessen K., Mirsky R., Hersh L.B., Matsas R.* Expression of endopeptidase-24.11 (common acute lymphoblastic leukaemia antigen CD10) in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. Eur. J. Neurosci. 7: 951–961. 1995.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01083.x
48. *Higuchi Y., Hashiguchi A., Yuan J., Yoshimura A., Mitsui J., Ishiura H., Tanaka M., Ishihara S., Tanabe H., Nozuma S., Okamoto Y., Matsuura E., Ohkubo R., Inamizu S., Shiraishi W., Yamasaki R., Ohyagi Y., Kira J., Oya Y., Yabe H., Nishikawa N., Tobisawa S., Matsuda N., Masuda M., Kugimoto C., Fukushima K., Yano S., Yoshimura J., Doi K., Nakagawa M., Morishita S., Tsuji S., Takashima H.* Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. Ann. Neurol. 79: 659–672. 2016.
https://doi.org/10.1002/ana.24612
49. *Maguer-Satta V., Besançon R., Bachelard-Cascales E.* Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. Stem Cells 29, 389–396. 2011.
https://doi.org/10.1002/stem.592
50. *Lu B., Gerard N.P., Kolakowski L.F. Jr., Bozza M., Zurakowski D., Finco O., Carroll M.C., Gerard C.* Neutral endopeptidase modulation of septic shock. J. Exp. Med. 181: 2271–2275. 1995.
https://doi.org/10.1084/jem.181.6.2271
51. *Saria A., Hauser K.F., Traurig H.H., Turbek C.S., Hersh L., Gerard C.* Opioid-related changes in nociceptive threshold and in tissue levels of enkephalins after target disruption of the gene for neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in mice. Neurosci. Lett. 234, 27–30. 1997.
https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00660-5
52. *Fischer H.S., Zernig G., Schuligoi R., Miczek K.A., Hauser K.F., Gerard C., Saria A.* Alterations within the endogenous opioid system in mice with targeted deletion of the neutral endopeptidase ('enkephalinase') gene. Regul. Pept. 96: 53–58. 2000.
https://doi.org/10.1016/s0167-0115(00)00200-7

53. *Siems W., Maul B., Krause W., Gerard C., Hauser K.F., Hersh L.B., Fischer H.S., Zernig G., Saria A.* Neutral endopeptidase and alcohol consumption, experiments in neutral endopeptidase-deficient mice. Eur. J. Pharmacol. 397: 327–334. 2000. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00222-3
54. *Krämer H.H., He L., Lu B., Birklein F., Sommer C.* Increased pain and neurogenic inflammation in mice deficient of neutral endopeptidase. Neurobiol. Dis. 35: 177–183. 2009. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.002
55. *Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Vasilev D.S., Nalivaeva N.N.* Ontogenetic and phylogenetic approaches for studying the mechanisms of cognitive dysfunctions. In: Evolutionary Physiology and Biochemistry: Advances and Perspectives / ed. V.F. Levchenko. InTech: Rijeka, Croatia. 2018. Chapter 15, 205–224. http://www.intechopen.com/books/evolutionary-physiology-andbiochemistry-advances-and-perspectives. https://doi.org/10.5772/intechopen.73666
56. *Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A.* Ontogenetic characteristics of behavior in rats subjected to hypoxia on day 14 or day 18 of embryogenesis. Neurosci. Behav. Physiol. 40: 231–238. 2010. https://doi.org/10.1007/s11055-009-9235-2
57. *Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R., Makova N.Z., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J.* Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. J. Mol. Neurosci. 46: 569–577. 2012. https://doi.org/10.1007/s12031-011-9644-x
58. *Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Kozlova D.I., Kochkina E.G., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N.* Regulation of Neprilysin Activity and Cognitive Functions in Rats After Prenatal Hypoxia. Neurochem. Res. 44: 1387–1398. 2019. https://doi.org/10.1007/s11064-019-02796-3
59. *Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* Prenatal Hypoxia in Different Periods of Embryogenesis Differentially Affects Cell Migration, Neuronal Plasticity, and Rat Behavior in Postnatal Ontogenesis. Front. Neurosci. 10: 126. 2016. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00126
60. *Deller T., Bas Orth C., Vlachos A., Merten T., Del Turco D., Dehn D., Mundel P., Frotscher M.* Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. J. Compar. Neurol. 499: 471–484. 2006. https://doi.org/10.1002/cne.21103
61. *Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kalinina D.S.* Prenatal hypoxia disturbs the formation of pyramidal neurones in the entorhinal cortex of the rat brain. Russ. J. Physiol. 2020. In press.
62. *Zhang X., Li L., Zhang X., Xie W., Li L., Yang D., Heng X., Du Y., Doody R.S., Le W.* Prenatal hypoxia may aggravate the cognitive impairment and Alzheimer's disease neuropathology in APPSwe/PS1A246E transgenic mice. Neurobiol. Aging. 34: 663–678. 2013. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.012
63. *Turrel O., Lampin-Saint-Amaux A., Préat T., Goguel V.* Drosophila Neprilysins Are Involved in Middle-Term and Long-Term Memory. J. Neurosci. 36: 9535–9546. 2016. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3730-15
64. *Turrel O., Rabah Y., Plaçais P.Y., Goguel V., Preat T.* Drosophila Middle-Term Memory: Amnesiac is Required for PKA Activation in the Mushroom Bodies, a Function Modulated by Neprilysin 1. J. Neurosci. 40: 4219–4229. 2020. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2311-19.2020
65. *Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Plesneva S.A., Feponova A.A., Turner A.J., Zhuravin I.A.* Changes in the Activity of Amyloid-Degrading Metallopeptidases Leads to Disruption of Memory in Rats. Neurosci. Behav. Physiol. 40: 975–980. 2010. https://doi.org/10.1007/s11055-010-9355-8
66. *Mouri A., Zou L.B., Iwata N., Saido T.C., Wang D., Wang M.W., Noda Y., Nabeshima T.* Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid β and impairment of learning and memory. Behav. Brain Res. 168: 83–91. 2006. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.10.014
67. *Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N.* Epigenetic and pharmacological regulation of the amyloid-degrading enzyme neprilysin results in modulation of cognitive functions in mammals Dokl. Biol. Sci. 438: 145–148. 2011. Epub 2011 Jul 5. https://doi.org/10.1134/S001249661103015X
68. *Zou L.B., Mouri A., Iwata N., Saido T.C., Wang D., Wang M.W., Mizoguchi H., Noda Y., Nabeshima T.* Inhibition of neprilysin by infusion of thiorphan into the hippocampus causes an accumulation of amyloid Beta and impairment of learning and memory. J. Pharmacol. Exp. Ther. 317: 334–340. 2006. https://doi.org/10.1124/jpet.105.095687
69. *Hardy J., Selkoe D.J.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 297: 353–356. 2002. https://doi.org/10.1126/science.1072994

70. *Selkoe D.J., Hardy J.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. 8: 595–608. 2016.
https://doi.org/10.15252/emmm.201606210
71. *Howell S., Nalbantoglu J., Crine P.* Neutral endopeptidase can hydrolyze β-amyloid (1–40) but shows no effect on β-amyloid precursor protein metabolism. Peptides. 16: 647–652. 1995.
https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)00021-b
72. *Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Watanabe K., Seikiguchi M., Hosoki E., Kawashima-Morishima M., Lee H.-J., Hama E., Sekine-Aizawa Y., Saido T.C.* Identification of the major Aβ1-42 degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. Nature Med. 6: 143–150. 2000.
https://doi.org/10.1038/72237
73. *Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Shirotani K., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Hama E., Lee H., Saido T.C.* Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin. Science 292: 1550–1552. 2001.
https://doi.org/10.1126/science.1059946
74. *Hanson L.R., Hafez D., Svitak A.L., Burns R.B., Li X., Frey W.H. 2nd, Marr RA.* Intranasal phosphoramidon increases beta-amyloid levels in wild-type and NEP/NEP2-deficient mice. J. Mol. Neurosci. 43: 424–427. 2011.
https://doi.org/10.1007/s12031-010-9460-8
75. *Nilsson P., Loganathan K., Sekiguchi M., Winblad B., Iwata N., Saido T.C., Tjernberg L.O.* Loss of neprilysin alters protein expression in the brain of Alzheimer's disease model mice. Proteomics. 15: 3349–3355. 2015.
https://doi.org/10.1002/pmic.201400211
76. *Mohajeri M.H., Wolfer D.P.*, Neprilysin deficiency-dependent impairment of cognitive functions in a mouse model of amyloidosis. Neurochem. Res. 34: 717–726. 2009.
https://doi.org/10.1007/s11064-009-9919-6
77. *Carpentier M., Robitaille Y., DesGroseillers L., Boileau G., Marcinkiewicz M.* Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 61: 849–856. 2002.
https://doi.org/10.1093/jnen/61.10.849
78. *Yasojima K., Akiyama H., McGeer E.G., McGeer P.L.* Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. Neurosci. Lett. 297: 97–100. 2001.
https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01675-x
79. *Zhang H., Liu D., Wang Y., Huang H., Zhao Y., Zhou H.* Meta-analysis of expression and function of neprilysin in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett 657: 69–76. 2017.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.060
80. *Li W., Wu Y., Min F., Li Z., Huang J., Huang R.* A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-β42 and thiorphan. Metab. Brain. Dis. 25: 277–284. 2010.
https://doi.org/10.1007/s11011-010-9207-9
81. *Marr R.A., Rockenstein E., Mukherjee A., Kindy M.S., Hersh L.B., Gage F.H., Verma I.M., Masliah E.* Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. J. Neurosci. 23: 1992–1996. 2003. PMCID: PMC6742010.
82. *Park M.H., Lee J.K., Choi S., Ahn J., Jin H.K., Park J.S., Bae J.S.* Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimer's disease mice. Brain Res. 1529: 113–124. 2013.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.05.045
83. *Hüttenrauch M., Baches S., Gerth J., Bayer T.A., Weggen S., Wirths O.* Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. J. Alzheimers. Dis. 44: 1291–1302. 2015.
https://doi.org/10.3233/JAD-142463
84. *Huang S.M., Mouri A., Kokubo H., Nakajima R., Suemoto T., Higuchi M., Staufenbiel M., Noda Y., Yamaguchi H., Nabeshima T., Saido T.C., Iwata N.* Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. J. Biol. Chem. 281: 17941–17951. 2006.
https://doi.org/10.1074/jbc.M601372200
85. *Blurton-Jones M., Spencer B., Michael S., Castello N.A., Agazaryan A.A., Davis J.L., Müller F.J., Loring J.F., Masliah E., LaFerla F.M.* Neural stem cells genetically-modified to express neprilysin reduce pathology in Alzheimer transgenic models. Stem. Cell Res. Ther. 5: 46. 2014.
https://doi.org/10.1186/scrt440
86. *Schliebs R., Arendt T.* The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. Behav. Brain Res. 221: 555–563. 2011.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058
87. *Foidl B.M., Do-Dinh P., Hutter-Schmid B., Bliem H.R., Humpel C.* Cholinergic neurodegeneration in an Alzheimer mouse model overexpressing amyloid-precursor protein with the Swedish-Dutch-Iowa mutations. Neurobiol. Learn. Mem. 136: 86–96. 2016.
https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.09.014

88. *Fodero L.R., Mok S.S., Losic D., Martin L.L., Aguilar M.I., Barrow C.J., Livett B.G., Small D.H.* Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors mediate an Aβ(1–42)-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurones. J. Neurochem. 88: 1186–1193. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02296.x
89. *Masliah E., Alford M., Adame A., Rockenstein E., Galasko D., Salmon D., Hansen L.A., Thal L.J.* Aβ1-42 promotes cholinergic sprouting in patients with AD and Lewy body variant of AD. Neurology. 61: 206–211. 2003. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000073987.79060.4B
90. *Sorial M.E.* El Sayed NSED. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 390: 581–593. 2017. https://doi.org/10.1007/s00210-017-1357-4
91. *Djordjevic J., Jones-Gotman M., De Sousa K., Chertkow H.* Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging. 29: 693–706. 2008. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.014
92. *Wesson D.W., Levy E., Nixon R.A., Wilson D.A.* Olfactory dysfunction correlates with amyloid-β burden in an Alzheimer's disease mouse model. J. Neurosci. 30: 505–514. 2010. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010
93. *Saiz-Sanchez D., Ubeda-Bañon I., de la Rosa-Prieto C., Argandoña-Palacios L., Garcia-Muñozguren S., Insausti R., Martinez-Marcos A.* Somatostatin, Tau, and β-Amyloid Within the Anterior Olfactory Nucleus in Alzheimer Disease. Exp. Neurol. 223: 347–350. 2010. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.010
94. *Saito T., Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Takano J., Huang S.M., Suemoto T., Higuchi M., Saido T.C.* Somatostatin regulates brain amyloid β peptide Aβ42 through modulation of proteolytic degradation. Nat. Med. 11: 434–439. 2005. https://doi.org/10.1038/nm1206
95. *Belyaev N.D., Kellett K.A., Beckett C., Makova N.Z., Revett T.J., Nalivaeva N.N., Hooper N.M., Turner A.J.* The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β-secretase-dependent pathway. J. Biol. Chem. 285: 41443–41454. 2010. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141390
96. *Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T., Sunyach C., Alves da Costa C., Vincent B., Ring S., D'Adamio L., Shen J., Müller U., St George Hyslop P., Checler F.* Presenilin-dependent transcriptional control of the Aβ-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of βAPP and APLP. Neuron. 46: 541–554. 2005. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.008
97. *Koudinov A.R., Berezov T.T.* Alzheimer's amyloid-β (Aβ) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk. Acta Neurobiol. Exp. (Wars). 64: 71–79. 2004. PMID: .15190681
98. *Wang H., Megill A., He K., Kirkwood A., Lee H.K.* Consequences of inhibiting amyloid precursor protein processing enzymes on synaptic function and plasticity. Neural Plast. 2012: 272374. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/272374
99. *Abramov E., Dolev I., Fogel H., Ciccotosto G.D., Ruff E., Slutsky I.* Amyloid-β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. Nat. Neurosci. 12: 1567–1576. 2009. https://doi.org/10.1038/nn.2433
100. *Finnie P.S.P., Nader K.* Amyloid β Secreted during Consolidation Prevents Memory Malleability. Curr. Biol. 30: 1934–1940.e4. 2020. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.083
101. *Wang Z., Zhang X.J., Li T., Li J., Tang Y., Le W.* Valproic acid reduces neuritic plaque formation and improves learning deficits in APP(Swe) /PS1(A246E) transgenic mice via preventing the prenatal hypoxia-induced down-regulation of neprilysin. CNS Neurosci. Ther. 20: 209–217. 2014. https://doi.org/10.1111/cns.12186
102. *Janczura K.J., Volmar C.H., Sartor G.C., Rao S.J., Ricciardi N.R., Lambert G., Brothers S.P., Wahlestedt C.* Inhibition of HDAC3 reverses Alzheimer's disease-related pathologies in vitro and in the 3xTg-AD mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 115: E11148–E11157. 2018. https://doi.org/10.1073/pnas.1805436115
103. *Hu Q., Chang X., Yan R., Rong C., Yang C., Cheng S., Gu X., Yao H., Hou X., Mo Y., Zhao L., Chen Y., Dinlin X., Wang Q., Fang S.* (–)-Epigallocatechin-3-gallate induces cancer cell apoptosis via acetylation of amyloid precursor protein. Med. Oncol. 32: 390. 2015. https://doi.org/10.1007/s12032-014-0390-0
104. *Chang X., Rong C., Chen Y., Yang C., Hu Q., Mo Y., Zhang C., Gu X., Zhang L., He W., Cheng S., Hou X., Su R., Liu S., Dun W., Wang Q., Fang S.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate attenuates cognitive deterioration in Alzheimer's disease model mice by upregulating neprilysin expression. Exp. Cell Res. 334: 136–145. 2015. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.04.004
105. *Kerridge C., Kozlova D.I., Nalivaeva N.N., Turner A.J.* Hypoxia Affects Neprilysin Expression Through Caspase Activation and an APP Intracellular Domain-dependent Mechanism. Front

Neurosci. 9: 426. 2015.
https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00426

106. *Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A.* 2016. Regulation of caspase-3 content and activity in rat cortex in norm and after prenatal hypoxia. Neurochem. J. 10: 144–150. https://doi.org/10.1134/S1819712416020100

107. *Kozlova D.I., Vasylev D.S., Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* Role of caspase-3 in regulation of the amyloid-degrading neuropeptidase neprilysin level in the rat cortex after hypoxia. J. Evol. Biochem. Physiol. 51: 480–484. 2015. https://doi.org/10.1134/S0022093015060046

108. *Dubrovskaya N.M., Tikhonravov D.L., Alekseeva O.S., Zhuravin I.A.* Recovery of learning and memory impaired by prenatal hypoxic stress in rats after injection of caspase-3 inhibitor during early ontogenesis. J. Evol. Biochem. Physiol. 53(1): 66–68. 2017. https://doi.org/10.1134/S0022093017010082

109. *Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Turner A.J.* New Insights into Epigenetic and Pharmacological Regulation of Amyloid-Degrading Enzymes. Neurochem. Res. 41: 620–630. 2016. https://doi.org/10.1007/s11064-015-1703-1

110. *Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Nalivaeva N.N., Tumanova N.L., Alekseeva O.S., Zhuravin I.A.* Bexarotene, an Agonist of Nuclear X Retinoid Receptors, Improves Cognitive Functions in Rats Subjected to Prenatal Hypoxia. Russ. J. Physiol. 105: 165–177. 2019. (Article in Russian). . https://doi.org/10.1134/S0869813919020043

111. *Sandoval K.E., Farr S.A., Banks W.A., Crider A.M., Morley J.E., Witt K.A.* Somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 decreases extracellular and intracellular $A\beta_{1-42}$ trimers. Eur. J. Pharmacol. 683: 116–124. 2012. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.020

112. *Klein C., Roussel G., Brun S., Rusu C., Patte-Mensah C., Maitre M., Mensah-Nyagan A.G.* 5-HIAA induces neprilysin to ameliorate pathophysiology and symptoms in a mouse model for Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. Commun. 6: 136. 2018. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0640-z

113. *Yu L., Liu Y., Yang H., Zhu X., Cao X., Gao J., Zhao H., Xu Y.* PSD-93 Attenuates Amyloid-β-Mediated Cognitive Dysfunction by Promoting the Catabolism of Amyloid-β. J. Alzheimers Dis. 59: 913–927. 2017. https://doi.org/10.3233/JAD-170320

114. *Lazarov O., Robinson J., Tang Y.P., Hairston I.S., Korade-Mirnics Z., Lee V.M., Hersh L.B., Sapolsky R.M., Mirnics K., Sisodia S.S.* Environmental enrichment reduces Aβ levels and amyloid deposition in transgenic mice. Cell. 120: 701–713. 2005. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.015

115. *Griva M., Lagoudaki R., Touloumi O., Nousiopoulou E., Karalis F., Georgiou T., Kokaraki G., Simeonidou C., Tata D.A., Spandou E.* Long-term effects of enriched environment following neonatal hypoxia-ischemia on behavior, BDNF and synaptophysin levels in rat hippocampus: Effect of combined treatment with G-CSF. Brain Res. 1667: 55–67. 2017. Epub 2017 May 8. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.004

116. *Radak Z., Kumagai S., Taylor A.W., Naito H., Goto S.* Effects of exercise on brain function: role of free radicals. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 32: 942–946. 2007. https://doi.org/10.1139/H07-081

117. *Mainardi M., Di Garbo A., Caleo M., Berardi N., Sale A., Maffei L.* Environmental enrichment strengthens corticocortical interactions and reduces amyloid-β oligomers in aged mice. Front. Aging Neurosci. 6: 1. 2014. https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00001

118. *Walther T., Albrecht D., Becker M., Schubert M., Kouznetsova E., Wiesner B., Maul B., Schliebs R., Grecksch G., Furkert J., Sterner-Kock A., Schultheiss H.P., Becker A., Siems W.E.* Improved learning and memory in aged mice deficient in amyloid β-degrading neutral endopeptidase. PLoS One. 4: e4590. 2009. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004590

119. *Saito T., Takaki Y., Iwata N., Trojanowski J., Saido T.C.* Alzheimer's disease, neuropeptides, neuropeptidase, and amyloid-β peptide metabolism. Sci. Aging Knowledge Environ. 2003: PE1. 2003. https://doi.org/10.1126/sageke.2003.3.pe1

TO CITE THIS ARTICLE:

Nalivaeva N.N., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Turner A.J., Zhuravin I.A. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1191–1208.

DOI: 10.31857/S0869813920100076

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1209–1237

ОБЗОРЫ

РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2020 г. В. С. Шпакова[1, *], С. П. Гамбарян[1]

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

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

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.
После доработки 17.08.2020 г.
Принята к публикации 26.08.2020 г.

Тромбоциты играют ключевую роль в гемостазе, участвуют в процессах иммунного ответа, воспаления, ангиогенеза и регенерации тканей в организме. С другой стороны, тромбоциты могут способствовать развитию различных патологических процессов, обусловленных образованием тромбов в сосудах (инфаркты, инсульты), а также опухолевых заболеваний. Тромбоциты могут напрямую взаимодействовать с раковыми клетками в кровотоке и участвовать в метастазировании, ангиогенезе и росте опухоли. За последние годы накопилось значительное количество данных, посвященных роли тромбоцитов в развитии опухолевых заболеваний. Эти данные требуют систематизации и тщательного анализа, так как значение тромбоцитов в развитии рака может преувеличиваться. В данной работе представлены основные актуальные вопросы, касающиеся роли тромбоцитов в развитии онкологических заболеваний. Помимо этого, рассмотрено значение антитромбоцитарной терапии и ограничения ее применения в лечении опухолей, а также использование тромбоцитов в целях диагностики и таргетной доставки препаратов в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: тромбоциты, рак, противоопухолевая терапия, тромбоцитоз, опухолевый ангиогенез, антитромбоцитарная терапия, микрочастицы

DOI: 10.31857/S0869813920100106

Тромбоциты представляют собой небольшие безъядерные структуры характерной дисковидной формы, которые играют ключевую роль в гемостазе и выполняют ряд других важных функций в организме. В норме в крови человека содержится 150–350 × 10^9 тромбоцитов на литр, каждый из которых находится в циркуляции 8–10 дней, после чего подвергается апоптозу и/или элиминируется в печени или селезенке [1]. Повышенное содержание тромбоцитов в крови (тромбоцитоз) или повышенная чувствительность тромбоцитов к небольшим дозам агониста (гиперактивность) могут приводить к развитию различных патологий, главными из которых являются сердечно-сосудистые заболевания и артериальные тромбозы [2]. Однако помимо непосредственного участия в гемостазе, тромбоциты играют важную роль в развитии опухолевых заболеваний. Известно, что раковые больные подвержены повышенному риску образования тромбов [3], а продвинутые стадии рака связаны с развитием гиперактивности тромбоцитов [4].

Взаимосвязь между тромбофлебитами и злокачественными образованиями была установлена французским врачом Арманом Труссо еще в 1865 г. [5]. А. Труссо в своей знаменитой лекции “*Phlegmasia alba dolens*” указал на мигрирующие тромбо-

флебиты как на надежный диагностический признак наличия скрытой опухоли у больных [6]. И хотя первый случай обнаружения тромбоза у ракового пациента был отмечен еще Жаном Батистом Буйо несколькими десятилетиями ранее, именно А. Труссо удалось установить связь между этими двумя состояниями [6]. Сам термин “тромбоцит” был предложен в 1882 г. итальянским врачом Джулио Бидзодзеро, наблюдавшим за тромбоцитами в световой микроскоп и первым продемонстрировавшим их коагуляционную активность *in vivo* [7]. В течение последующих ста лет различными исследователями была доказана связь между тромбофлебитами и тромбоцитозом и раковыми заболеваниями различной этиологии [8–11], и лишь в 1970-х годах была показана роль тромбоцитов в метастазировании и образовании агрегатов тромбоцит–опухолевая клетка в кровотоке [12–15]. Последующее развитие технологий и появление сканирующих и просвечивающих электронных микроскопов позволило прояснить некоторые детали взаимодействия тромбоцитов и раковых клеток [16, 17], однако, несмотря на накопившиеся данные [18], многие ученые все еще относились скептически к их возможной роли в процессе метастазирования [7].

На сегодняшний день концепция об участии тромбоцитов в метастазировании опухолей является общепринятой. Раковые клетки способны активировать тромбоциты различными путями [19–21], вовлекая их в процесс адгезии к эндотелию сосуда [22, 23], а также используя тромбоциты для физической защиты от цитотоксического действия NK-клеток (Natural Killer cells) и от механического воздействия в кровотоке [24]. Помимо метастазирования, тромбоциты могут участвовать в васкулогенезе [25] и росте опухоли [26, 27], что делает их фактически самыми многочисленными участниками в развитии и распространении опухоли в организме. После того, как была доказана роль тромбоцитов в развитии опухолей, неоднократно производились попытки установления взаимосвязи между применением препаратов, направленных на ингибирование тромбоцитов, со снижением риска появления опухолей [28]. Однако применение антитромбоцитарных препаратов имеет множество ограничений, связанных с нарушением функционирования тромбоцитов как главного звена гемостаза [29]. В связи с этим актуальными являются поиски новых подходов, которые способствовали бы элиминации провоспалительной и проонкогенной активности тромбоцитов без нарушений их основных функций.

В настоящее время накопилось огромное количество данных об участии тромбоцитов в развитии опухолевых заболеваний. Однако при более детальном рассмотрении значение тромбоцитов в развитии опухолей может быть несколько преувеличено. Данная статья посвящена анализу актуальных проблем по взаимодействию тромбоцитов и опухолевых заболеваний, а также значению тромбоцитов как возможной мишени в противоопухолевой терапии.

1. ТРОМБОЦИТЫ И ОПУХОЛЬ

Образование новых тромбоцитов (тромбоцитопоэз) протекает непрерывно в костном мозге и легких, где из цитоплазмы мегакариоцитов (МК), являющихся клетками-предшественницами, происходит образование новых тромбоцитов [30]. В результате воздействия различных регуляторных факторов происходит полиплоидизация МК, которая важна для создания пула белков, липидов, мРНК и других молекул, необходимых для функционирования будущих тромбоцитов [31]. Главным регуляторным фактором, запускающим созревание МК и образование новых тромбоцитов, является тромбопоэтин (ТПО), который синтезируется в печени, почках и костном мозге под воздействием интерлейкина-6 (IL-6) и ряда других факторов [32]. ТПО связывается со специфичным c-Mpl рецептором на поверхно-

сти МК и активирует JAK/STAT сигнальный путь, который запускает дифференцировку МК и их последующую миграцию к синусоидным сосудам в костном мозге, куда выделяются новые тромбоциты [32].

Тромбоциты играют ключевую роль в гемостазе, активируясь после повреждения эндотелия сосудов и запуская каскад реакций, направленных на купирование кровотечения и регенерацию поврежденных сосудов. Циркулирующие тромбоциты постоянно находятся под воздействием ингибирующих факторов, которые позволяют тромбоцитам оставаться в состоянии покоя. К таким факторам относятся оксид азота (NO) и простациклин (простагландин I2, PGI2), которые в норме выделяются неповрежденным эндотелием сосудов [33]. Связывание PGI2 с простагландиновым рецептором приводит к активации аденилатциклазы (АЦ), запускающей синтез циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), с последующей активацией цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA). NO через активацию гуанилатциклазы (ГЦ) запускает синтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), что приводит к активации протеинкиназы G (PKG). PKA и PKG воздействуют на ключевые сигнальные пути, ответственные за активацию, и опосредуют основные ингибирующие процессы в тромбоцитах [33].

К активирующим сигналам, запускающим адгезию и агрегацию тромбоцитов относятся коллаген, тромбин, АДФ, АТФ, тромбоксан А2 (ТхА2) и фактор фон Виллебранда (vWF) [34]. На внешней мембране тромбоцитов содержится большое количество гликопротеинов и интегринов, необходимых для запуска адгезии и агрегации тромбоцитов. Среди них наиболее важную роль играют Ib-IX-V (GP Ib-IX-V), VI (GP VI) и IIb-IIIa (GP IIb-IIIa, более известный как αIIbβ3) [34, 35]. Также на поверхности тромбоцитов представлены активируемые тромбином рецепторы PAR1 и PAR4 (Protease-activated receptor), рецепторы P2Y1 и P2Y12 к АДФ, рецептор P2X1 к АТФ и ряд иммуноглобулиновых и селектиновых рецепторов [35, 36]. Активация тромбоцитов запускается после взаимодействия с компонентами экстракле-точного матрикса (ECM), содержащего большое количество адгезионных молекул, таких как ламинин, фибронектин, коллаген и vWF [34]. Связывание ECM с тромбоцитами опосредуется vWF, который секретируется эндотелиальными клеткам после повреждения эндотелия и в связанном с ECM виде становится способным взаимодействовать с рецептором GPIb на поверхности тромбоцитов [37]. Связывание GPIb с vWF является недостаточным для образования стабильной адгезии, но позволяет тромбоциту находиться в тесном контакте с поверхностью эндотелия [38]. Далее тромбоциты устанавливают контакты с коллагеном ECM через рецептор GPVI. Связывание GPVI с коллагеном низкоаффинное и не может напрямую опосредовать адгезию, но приводит к запуску внутриклеточных сигналов, которые переводят интегрины αIIbβ3 на поверхности тромбоцитов в высокоаффинное состояние и запускает выделение вторичных медиаторов, таких как АДФ и ТхА2 [39]. Эти агонисты, совместно с локально продуцируемым тромбином, активируют рецепторы, ассоциированные с G-белками, запускающие различные сигнальные события в тромбоцитах и индуцирующие их полную активацию [38]. При этом все участвующие в реакции тромбоциты делятся на две популяции: тромбоциты, находящиеся в ядре тромба, обеспечивают секрецию гранул и экстернализацию на своей поверхности молекул Р-селектина, образуют ламеллоподии и опосредуют агдгезию и агрегацию, в то время как тромбоциты, находящиеся на поверхности тромба, запускают экстернализацию фосфатидилсерина (ФС) на поверхности (прокоагулянтные тромбоциты) и участвуют в генерации тромбина и нитей фибрина [40, 41]. Тромбин является самым сильным активирующим фактором, стимулирующим и усиливающим агрегацию тромбоцитов и формирование тромба через взаимодействие с PAR рецепторами и за счет расщепления фибриногена для образования фибриновой сети [34].

В ходе активации в просвет сосуда из тромбоцитов выбрасываются три типа гранул – α, δ и γ. В α-гранулах содержится большое количество различных молекул, среди которых адгезионные молекулы, факторы свертывания крови, ростовые факторы, про- и антиангиогенные факторы, матриксные металлопротеазы и провоспалительные хемокины [42]. Эти гранулы самые многочисленные и их содержимое играет важную роль в начальной фазе регенерации сосудов, свертывании крови и агрегации тромбоцитов. Плотные, или δ-гранулы, более мелкие, менее многочисленные, содержат серотонин, гистамин, Ca^{2+}, ATP, ADP, фибриноген и до двенадцати факторов свертывания крови [43]. Они обеспечивают адгезию тромбоцитов, сокращение гладких миоцитов и сжатие сосудов в зоне повреждения. Третий тип – γ-гранулы, представляют собой лизосомы и содержат гидролитические ферменты, участвующие в резорбции тромба на поздних стадиях [7].

Раковые клетки могут использовать для своих целей практически все вышеописанные особенности функционирования тромбоцитов, вынуждая их работать в интересах опухоли. Рост и распространение опухоли часто сопровождаются развитием тромбоцитоза, который обнаруживается у больных в 10–57% случаев [25]. Тромбоцитоз, связанный с опухолевыми заболеваниями, является результатом увеличения синтеза тромбоцитов путем повышения содержания IL-6 и ряда других провоспалительных цитокинов в крови [44]. IL-6 участвует в пролиферации и дифференцировке раковых клеток, и его количество в плазме и опухолевых тканях увеличивается в ходе развития большинства известных раковых заболеваний [45]. Помимо этого, раковые клетки секретируют большое количество гуморальных факторов и цитокинов, которые активируют синтез ТПО гепатоцитами, увеличивая его содержание в плазме и, следовательно, увеличивая количество циркулирующих тромбоцитов в крови [46, 47]. Помимо этого, ТПО и его рецептор c-Mpl могут синтезироваться самими опухолевыми клетками, представляя, таким образом, петлю положительной обратной связи для запуска JAK/STAT сигнального пути в раковых клетках и способствуя их пролиферации и опухолевому росту [48]. Также раковые клетки могут стимулировать тромбоцитопоэз путем секреции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), концентрация которых в крови увеличивается у раковых больных с тромбоцитозом [49].

Известно, что повышенное количество тромбоцитов и факторов, увеличивающих их продукцию, в разной степени коррелирует с неблагоприятными прогнозами течения заболевания и повышенной смертностью, а также уменьшает вероятность ответа опухоли на терапию [50–52]. При этом антитромбоцитарная терапия может способствовать снижению инвазивности и распространения рака в организме [28]. Однако в некоторых случаях серьезным осложнением у раковых больных является развитие тромбоцитопении (недостаточное количество тромбоцитов в крови). Снижение количества тромбоцитов до отметки в менее чем 100×10^9/л влечет за собой высокий риск развития кровотечений и в значительной степени осложняет подбор и проведение терапии [53]. Чаще всего тромбоцитопения является следствием применения противоопухолевой терапии, однако в некоторых случаях тромбоцитопения может быть последствием паранеопластического синдрома, наблюдаемого у пациентов с солидными опухолями [54].

Развитие тромбоцитоза или тромбоцитопении связано с типом опухоли, стадией ее развития и подобранной терапией, поэтому является важным вопросом для клиницистов, от которого во многом зависит течение заболевания и его исход. В связи с этим актуальным является изучение взаимодействия тромбоцит–опухолевая клетка и его роли в развитии и распространении опухоли.

1.1. Значение тромбоцитов в распространении метастазов

После выхода в кровоток раковые клетки подвергаются значительному стрессу из-за наличия градиента скорости потока крови в сосудах и активности NK-клеток, которые в норме очень быстро распознают и элиминируют раковые клетки. В связи с этим лишь очень небольшой процент попадающих в кровоток клеток способны образовать метастазы [55]. После выхода в просвет сосуда раковая клетка может выделять в кровь растворимые медиаторы, такие как ADP [56], тромбин [19], TxA2 [57] и HMGB1 (high-mobility group box 1) [58], связывающиеся с поверхностными рецепторами тромбоцитов и запускающие их локальную активацию. Некоторые типы опухолевых клеток (например, клетки сквамозно-клеточной карциномы или герминомы) могут экспрессировать на своей поверхности белок подопланин [59], который напрямую связывается с рецептором CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2) на тромбоцитах, запуская их активацию [60]. Также раковые клетки разного происхождения могут связываться с тромбоцитарным рецептором FcγRIIa, индуцируя, таким образом, секрецию δ-гранул, содержащих ADP, серотонин и ряд факторов свертывания крови [61]. Помимо этого, некоторые раковые клетки экспрессируют на своей поверхности тканевой фактор (ТФ), который запускает генерацию тромбина и посредством этого активирует тромбоциты [62]. И, наконец, раковые клетки могут экспрессировать на своей поверхности интегрины, которые через связывание с vWF также активируют тромбоциты [63]. Следовательно, раковые клетки способны запускать активацию тромбоцитов самыми разными способами: (1) секретируя в кровь вторичные медиаторы активации, (2) образовывая прямой контакт с рецепторами на поверхности тромбоцитов, (3) опосредованно индуцируя выброс вторичных медиаторов, которые вызывают активацию тромбоцитов, и (4) связывая и активируя факторы, необходимые для активации тромбоцитов.

После активации тромбоциты взаимодействуют с поверхностью раковой клетки и покрывают ее оболочкой, состоящей из агрегировавших тромбоцитов и нитей фибрина. Молекулы, выделяемые тромбоцитами из α- и δ-гранул в ходе активации, подавляют цитотоксическую активность NK клеток [24, 64], а также поддерживают опухолевые клетки за счет выброса факторов роста и про-ангиогенных факторов [19]. На своей поверхности тромбоциты содержат большое количество молекул главного комплекса гистосовместимости I (MHC-I), и после адгезии к опухолевой клетке могут презентировать его NK-клеткам, помогая тем самым уклоняться от цитотоксического воздействия иммунной системы [65]. Кроме того, показана способность тромбоцитов предотвращать аноикоз (апоптоз, запускающийся в случае потери клеткой связи с соседними клетками) клеток рака яичника посредством активации YAP1 сигнального пути [66].

Помимо защиты от иммунной системы, физического стресса и предотвращения гибели опухолевых клеток, тромбоциты также могут способствовать успешной адгезии раковых клеток к стенке сосуда и их последующей экстравазации. Циркулирующие раковые клетки обычно заякориваются в пре-капиллярных артериолах или непосредственно в капиллярах [67]. При этом арест клетки к стенке сосуда может происходить путем физического захвата, когда диаметр клетки примерно равен диаметру сосуда, либо путем адгезии опухолевой клетки к эндотелию, а в случае поврежденных сосудов – к субэндотелиальному матриксу [68]. Участие тромбоцитов в случае физического захвата необязательно для образования контакта между опухолевой клеткой и поверхностью эндотелия [69], однако, наличие активированных тромбоцитов может способствовать аресту опухолевой клетки в сосудах с бóльшим диаметром [67]. Ранее упоминалось, что на поверхности тромбоцитов содержится множество различных адгезионных молекул: интегрины (αIIbβ3, α2β1, α5β1, α6β1, αLβ2, αvβ3), рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов (FcγRIIA, GPVI, ICAM-2, PECAM-1, JAM и кадгерин 6), рецепторы семейства лекти-

нов С-типа (CLEC-2, P-selectin), GPIb-IX-V комплекс и др. [70]. Эти рецепторы опосредуют взаимодействие тромбоцитов в ходе активации с компонентами ECM (ламинином – через α6β1, фибронектином – через αIIbβ3, коллагеном – через α2β1 и фактором фон Виллебранда – через GPIb-IX-V), с другими тромбоцитами и с клетками других типов [71]. Посредством тромбоцитов образуется контакт между раковой клеткой и эндотелием сосуда, что может привести к заякориванию и последующему роллингу клетки вдоль эндотелия [72]. Жесткая адгезия к эндотелию по аналогии с лейкоцитами осуществляется за счет интегринов, CLEC-2 и P-селектина, экстернализующегося на мембране тромбоцитов после выброса α-гранул [73, 74]. Ингибирование этих белков, равно как и блокирование агрегации тромбоцитов, приводит к уменьшению образования метастазов [75]. Однако существует ряд данных, полученных как *in vitro*, так и *in vivo*, согласно которым тромбоциты рекрутируются уже после ареста опухолевой клетки к эндотелию [16, 17, 76]. Поэтому некоторые авторы придерживаются мнения, что в большинстве случаев тромбоциты не участвуют в самой адгезии опухолевой клетки к стенке сосуда, а необходимы лишь для поддержания этой адгезии [67].

Для завершения процесса экстравазации и выхода в мезенхимальную ткань опухолевой клетке необходимо пройти через слой эндотелиальных клеток. Для этого нужно либо ослабить контакт между соседними клетками эндотелия, либо вызвать их гибель путем апоптоза или некроза. В работе Schumacher с соавт. показано, что секретируемый во время активации из δ-гранул АТФ может связываться с рецептором $P2Y_2$ на эндотелиальных клетках, вызывая их ретракцию [77]. Данная работа была выполнена на мышах, нокаутных по необходимому для нормальной регуляции экзоцитоза белку Munc13-4. Однако другие авторы утверждают, что у нокаутных по Munc13-4 мышей помимо нарушения секреции плотных гранул в тромбоцитах, уменьшается секреция и α-гранул, что также могло повлиять на успешность метастазирования опухолевых клеток [78]. Далее, тромбоциты содержат множество факторов, регулирующих проницаемость сосудов, таких как серотонин, гистамин, эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), PAF (platelet activating factor), АТФ, HGF, фибриноген и 12(S)-HETE [67]. Эти факторы после активации тромбоцитов попадают в кровоток и могут способствовать ретракции эндотелиальных клеток. Тромбоциты во время активации могут выделять матриксные металлопротеазы (MMP) 1, 2, 3 и, по некоторым данным, 9 [79], гиалуронидазу 2 [80] и гепараназу [81], способствуя тем самым деградации базальной мембраны и экстраклеточного матрикса и облегчая инвазию раковой клетки [82]. В исследовании *in vivo* с использованием ксенографтовых клеток рака молочной железы человека удалось установить, что при ингибировании тромбоцитов блокируется образование новых метастазов у мышей [83]. Более того, уменьшение количества тромбоцитов практически полностью блокировало экстравазацию раковых клеток, и процент пролиферирующих клеток был ниже в легких животных со сниженным количеством тромбоцитов по сравнению с контролем [83]. Согласно данным Mammadova-Dach с соавт., в процессе метастазирования также принимает участие тромбоцитарный рецептор GPVI, который, взаимодействуя с галектином-3 на раковой клетке, способствует ее успешной экстравазации [84]. Более того, тромбоциты на своей поверхности содержат Fas лиганд, который при взаимодействии с Fas рецептором может индуцировать гибель клеток других типов [85], в том числе, эндотелиальных клеток во время сепсиса [86]. Однако раковые клетки сами способны вызывать гибель клеток эндотелия [87, 88], и прямых доказательств того, что тромбоциты могут участвовать в этом процессе, пока что нет.

В дополнение, тромбоциты могут опосредованно способствовать миграции опухолевой клетки через эндотелий путем рекрутирования иммунных клеток [89]. Лейкоциты, в частности моноциты и макрофаги, могут способствовать экстравазации раковой клетки путем секреции эндотелиального фактора роста сосудов А

(VEGFA) [90], а также предотвращать клеточную гибель за счет связывания лейкоцитарных интегринов α4β1 или α4β7 с рецептором VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1) на раковых клетках, приводящего к активации Akt сигнального пути [91, 92]. В исследовании [89] была показана роль тромбоцитов в рекрутировании гранулоцитов к клеткам колоректальной карциномы, что способствовало их выживанию и успешной экстравазации. Однако, несмотря на множество статей, посвященных участию тромбоцитов в миграции опухолевых клеток через эндотелий, до сих пор не показана их прямая роль в деградации эндотелия и базальной мембраны. Известно, что раковые клетки сами по себе, без участия тромбоцитов, способны запускать гибель эндотелиальных клеток и последующую экстравазацию [67]. Эти данные свидетельствуют о том, что тромбоциты не являются необходимым звеном в процессах миграции раковых клеток через эндотелий, однако, в силу своих особенностей могут способствовать этому процессу.

1.2. Роль тромбоцитов в ангиогенезе опухоли

Долгое время считалось, что формирование первичной сети сосудов из ангиобластов (васкулогенез) происходит только на стадии эмбрионального развития организма, тогда как дальнейшее разветвление сети и образование капилляров из уже существующих сосудов (ангиогенез) начинается на поздних стадиях развития эмбриона и продолжается в течение всей жизни [93, 94]. В настоящее время установлено, что васкулогенез может протекать и во взрослом организме, например, при различных репаративных процессах, а также при опухолевых заболеваниях [95]. Опухоли, как и любому нормальному органу, необходимо сформировать сеть кровеносных сосудов для удовлетворения своих потребностей в кислороде и питательных веществах, а также для выведения продуктов обмена. Эта задача решается за счет запуска опухолевыми клетками процессов ангио- и васкулогенеза. Показано, что опухоль и ее микроокружение способны рекрутировать находящиеся в костном мозге эндотелиальные клетки-предшественницы, запускать их дифференцировку и последующее формирование сосудистых трубочек, сходных с эмбриональными [96]. Помимо костного мозга, источником ангиобластов могут служить резидентные стволовые клетки или стволовые клетки ракового происхождения [95]. При этом микроокружение опухоли может менять генетическую программу дифференцировки эндотелиальных клеток-предшественниц и стволовых клеток, в результате чего эти клетки подвергаются анеуплоидии и различным генетическим аберрациям, что приводит к формированию аномальных сосудов [97]. Морфологически это выражается в отсутствии отдельных венул, артериол и капилляров, и образовании сети искаженных и расширенных сосудов, склонных к кровотечениям [97].

Ключевым фактором, запускающим рост новых сосудов, является гипоксия [98]. Раковые клетки, подверженные гипоксии, секретируют VEGFA, запускающий ангиогенез путем взаимодействия с рецептором VEGFAR2 на поверхности эндотелиальных клеток ближайшего сосуда [99]. Градиент растворимого VEGFA индуцирует образование подвижных эндотелиальных клеток, которые разрушают окружающий их экстраклеточный матрикс, что приводит к образованию нового отростка сосуда, направленного по градиенту увеличения VEGFA [98]. Многочисленные исследования показали, что опухолевый ангиогенез может быть индуцирован не только непосредственно опухолевыми клетками, но также микроокружением опухоли, клетками стромы и ассоциированными с опухолью макрофагами [25]. При этом еще два десятилетия назад было показано наличие активированных тромбоцитов в просветах опухолевых сосудов в ходе хирургического лечения пациентов с саркомой [100]. В дальнейшем было показано, что тромбоциты могут участвовать в процессах ангиогенеза *in vivo*, а исследования *in vitro* позволили установить, что тромбоциты могут запускать пролиферацию эндотелиальных клеток и формирова-

ние сосудистых трубочек после адгезии тромбоцитов к эндотелию, опосредованной гликопротеиновыми рецепторами на их поверхности [101]. Тромбоциты, наряду с эритроцитами, являются самыми многочисленными клетками крови и содержат в гранулах как проангиогенные (VEGF, PDGF, bFGF, PD-ECGF/TP, CXCL12) [99, 102, 103], так и антиангиогенные факторы (тромбоспондин-1, PF4, эндостатин, ангиостатин и др.) [104, 105], что делает их крупнейшим резервуаром регуляторов ангиогенеза в крови [102]. Более того, существуют данные о том, что про- и антиангиогенные факторы в тромбоцитах пространственно разделены и содержатся в разных α-гранулах, которые секретируются в ответ на различные стимулы (активация либо рецептора PAR1, либо PAR4) [105]. Однако механизмы распределения белков в α-гранулах, равно как и механизмы распределения самих гранул между тромбоцитами, до сих пор не показаны, в связи с чем результаты, полученные Italiano с соавт., вызывают много сомнений [105]. При этом другой группе, напротив, удалось показать, что активация обоих рецепторов PAR1 и PAR4 является исключительно стимулирующей для ангиогенеза в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*, при этом эффект от рецептора PAR1 выражен сильнее [106]. В другом исследовании АДФ-индуцированная активация тромбоцитов приводила к стимуляции ангиогенеза, тогда как ТхА2-стимулированная активация оказывала ингибиторный эффект на рост сосудов в экспериментах *in vitro* [107].

Исходя из данных литературы, можно сделать вывод, что активация и дегранулляция тромбоцитов являются проангиогенными факторами в контексте развития опухолей [98]. Показано, что тромбоциты больных с глиобластомой [108] и раком толстой кишки [109] содержат большее количество проангиогенных факторов (VEGF, PF4 и PDGF) по сравнению со здоровыми донорами, а также оказывают проангиогенный эффект на эндотелий, способствуя росту новых сосудов [108]. Недостаток тромбоспондина-1 в тромбоцитах приводит к разбалансированию действия про- и антиангиогенных факторов, что влечет за собой ускорение роста опухоли и ее васкуляризации [110]. Существуют данные о том, что экспрессирующийся на поверхности тромбоцитов лиганд рецептора CD40 (CD40L), взаимодействуя с рецептором CD40 на эндотелии, также способен запускать опухолевый ангиогенез [111]. Помимо этого, тромбоциты могут способствовать формированию новых сосудов путем запуска мобилизации миелоидных клеток из костного мозга, ускоряя при этом их хоуминг к опухоли [110]. В работе Kuznetsov с соавт. показано, что тромбоциты играют роль в запуске ангиогенеза покоящихся метастазов рака молочной железы, способствуя тем самым их росту и пролиферации [112]. При этом сами эндотелиальные клетки опухолевых сосудов содержат повышенное количество молекул ТФ на своей поверхности, который способствует генерации фибрина и тромбина и, как следствие, активации тромбоцитов [100, 113]. В связи с этим в опухолевых сосудах зачастую содержатся адгезировавшие тромбоциты, тромбоцитарные агрегаты или даже микротромбы [114]. Секретирующиеся в ходе активации тромбоцитов проангиогенные факторы далее воздействуют на эндотелиальные клетки, вызывают их деление и, таким образом, запускают ангиогенез [114]. При этом, что немаловажно, тромбоциты играют ключевую роль в предотвращении кровотечений в опухолевых сосудах. Продолжительный выброс регуляторных молекул из тромбоцитов приводит к стабилизации опухолевых сосудов, предотвращая их кровотечения и поддерживая дальнейший рост опухоли [115]. Уменьшение количества тромбоцитов приводит к замедлению созревания раковых сосудов и уменьшению их плотности [116]. Все эти данные свидетельствуют о том, что тромбоциты могут играть важную роль в ангиогенезе опухоли. Однако до сих пор открытым остается вопрос, могут ли сами тромбоциты запускать процессы ангио- и васкулогенеза опухоли, и являются ли тромбоциты неотъемлемой частью этих процессов.

1.3. Участие тромбоцитов в активации опухолевого роста

Помимо про- и антиангиогенных факторов, в тромбоцитарных α-гранулах содержатся также различные ростовые факторы (эпидермальный фактор роста – EGF, фактор роста гепатоцитов – HGF, инсулино-подобный фактор роста – IGF и TGFβ) [117], выделяющиеся после активации тромбоцитов и в норме участвующие в восстановлении поврежденного эндотелия. Известно, что содержащиеся в тромбоцитах TGFβ и bFGF способны *in vitro* ускорять пролиферацию раковых клеток [118]. Теоретически, при попадании в кровь эти факторы могут запускать внутрисосудистую пролиферацию раковых клеток и способствовать увеличению размера опухоли. Действительно, существуют данные о том, что тромбоциты увеличивают пролиферацию раковых клеток яичников *in vitro* и *in vivo*, тогда как блокирование белка TGF-β1 снижает их пролиферативный статус [119]. Однако в приведенной работе не было проверено, приводит ли уменьшение количества тромбоцитов к снижению уровня пролиферации раковых клеток, а также не были измерены размеры опухоли до и после трансфузии тромбоцитов. В другой работе, наоборот, показано, что тромбоцитопения приводит к уменьшению объема опухоли у мышей, тогда как трансфузия тромбоцитов практически не влияет на размер опухоли [120]. В работе, посвященной исследованию роли лизофосфатидной кислоты (LPA) в развитии рака, показано, что тромбоциты участвуют в запуске пролиферации клеток рака молочной железы [121]. Мышам вводили клетки линии MDA-BO2, которые образовывали метастазы в костной ткани животных. Было показано, что LPA через взаимодействие с рецептором LPA1 на раковых клетках запускает их пролиферацию, а также вызывает секрецию интерлейкинов 6 и 8, которые ответственны за резорбцию костной ткани. Основным источником LPA1 оказались именно тромбоциты, которые секретируют LPA в кровь в ходе активации. При этом блокирование активации тромбоцитов приводило к ингибированию как образования метастазов, так и резорбции кости. Однако в работе не были оценены размеры опухоли в опытных и контрольных образцах, поэтому невозможно оценить прямой вклад тромбоцитов в пролиферацию опухолевых клеток.

В работе Janowska-Wieczorek с соавт. было показано, что образующиеся в ходе активации тромбоцитов микрочастицы (МЧ) вызывают активацию киназ MAP каскада (Mitogen-activated protein kinases) в клетках линии карциномы легких и тем самым участвуют в запуске их пролиферации [22]. Более того, инкубирование клеток карциномы легких с тромбоцитарными МЧ приводило к повышению экспрессии MMP, что способствовало последующей миграции клеток через матригель. В другом исследовании показано, что ингибирование рецептора P2Y12 на тромбоцитах вызывало редуцирование роста первичной опухоли яичника у мышей на 60–70% по сравнению с контрольными значениями [26].

Однако в ряде работ показано, что тромбоциты не влияют на рост первичной опухоли в моделях *in vivo*. В исследовании, проведенном на мышах, нокаутных по Gαq белку с дефектной функцией тромбоцитов, рост меланомы B16-BL6 и карциномы Льюиса не изменялся по сравнению с контрольными животными [24]. Индуцированная тромбоцитопения не влияла на рост меланомы B16-F10 у мышей [116], и в экспериментах на нокаутных по ТПО ($Tpo^{-/-}$) также не удалось установить связи между тромбоцитами и ростом опухоли [122]. Эти данные дают основания полагать, что однозначного ответа о роли тромбоцитов в регуляции роста опухоли на сегодняшний день нет. Согласно имеющимся данным можно сделать вывод, что тромбоциты могут как способствовать, так и наоборот, ингибировать пролиферацию раковых клеток в зависимости от условий эксперимента и типа опухоли.

1.4. Тромбоцитарные микрочастицы и рак

Помимо уже описанных гранул трех типов, тромбоциты формируют и выбрасывают в кровоток МЧ, представляющие собой небольшие (100–1000 нм) тельца, окруженные цитоплазматической мембраной, которые образуются из участков цитоплазмы тромбоцита [123]. МЧ образуются в ходе активации или гибели тромбоцита, однако, часть из них имеет мегакариоцитарное происхождение. МЧ, выделяющиеся из тромбоцитов и мегакариоцитов, являются самыми многочисленными в человеческой крови, они несут на своей поверхности те же самые маркерные белки, что и тромбоциты, а их содержимое состоит из различных белков (факторы роста, цитокины, провоспалительные факторы и др.), матричной и микроРНК, играющих важную роль в регуляции физиологических и патологических процессов в организме [124].

Благодаря способности переносить свое содержимое другим клеткам, тромбоцитарные МЧ (ТМЧ) играют важную роль в межклеточной коммуникации [124], а также участвуют в процессах коагуляции [125]. На своей поверхности ТМЧ содержат те же самые поверхностные белки и рецепторы, что и тромбоциты [126], а взаимодействие ТМЧ с клетками-мишенями может привести к запуску физиологического ответа, например, активации тромбоцитов, эндотелиальных клеток или лейкоцитов [126]. При этом повышенное количество ТМЧ в крови связывают со множеством различных патологий сердечно-сосудистой системы, среди которых инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, инсульт, тромбоэмболия сосудов, преэклампсия, артриты и др. [123]. У раковых больных с тромбоэмболией сосудов наблюдается повышенная прокоагуляционная активность ТМЧ, а увеличение их количества в ряде онкологических заболеваниях коррелирует с более агрессивным фенотипом опухоли, неблагоприятными прогнозами и образованием метастазов [29]. Активация тромбоцитов раковыми клетками приводит к увеличению образования ТМЧ, которые, в свою очередь, способствуют развитию рака и ассоциированного с раком тромбоцитоза [127]. ТМЧ могут стимулировать миграцию и инвазию раковых клеток, при этом более агрессивный фенотип опухоли активней взаимодействует с ТМЧ по сравнению с менее агрессивным [128]. Также установлена связь между ТМЧ и процессом ангиогенеза. ТМЧ стимулируют пролиферацию, выживание, адгезию и обеспечивают хемотаксис гемопоэтических клеток, а также способствуют формированию капиллярных трубочек *in vitro* [129]. Показано, что ТМЧ могут запускать экспрессию проангиогенных факторов (MMP9, VEGF, IL8 и HGF) в различных линиях клеток рака молочной железы [22]. Помимо этого, инкубирование некоторых линий клеток рака молочной железы и легких с ТМЧ *in vitro* приводило к активации киназ MAP каскада и Akt сигнального пути, в результате чего увеличивался уровень пролиферации клеток и секреция мембран-связанной MMP 1 типа (MP1-MMP), участвующей в процессах инвазии раковых клеток [22, 130]. ТМЧ также увеличивают инвазивность клеток рака простаты путем запуска продукции MMP-2 [131]. Однако в экспериментах с клетками рака молочной железы человека ТМЧ, образовавшиеся после активации тромбоцитов арахидоновой кислотой, вызывали арест клеточного цикла, уменьшали миграционную активность и увеличивали чувствительность раковых клеток к противоопухолевым препаратам [132]. Эти данные явно свидетельствуют о том, что физиологический ответ клеток на ТМЧ зависит от активационного стимула, вызывающего их генерацию, и может иметь как позитивные, так и негативные последствия.

Известно, что ТМЧ могут транспортировать различные белки и даже функционально активные митохондрии, однако в последнее время основное внимание сфокусировано на их способности передавать генетическую информацию в виде микроРНК другим клеткам [133]. МикроРНК относятся к некодирующим РНК и транскрибируются в ядре при помощи РНК полимеразы II типа [134]. После пер-

вичных модификаций пре-микроРНК транспортируется из ядра в цитозоль при помощи экспортина 5, где претерпевает конечные модификации, связывается со специфичным Ago2 белковым комплексом [135], защищающем ее от деградации, и становится активной микроРНК, способной связываться с 3'-некодирующим концом на таргетной мРНК, супрессируя ее активность. [136]. Таким образом, микроРНК участвует в пост-транскрипционной регуляции активности ряда генов [136]. Существует множество свидетельств того, что микроРНК может секретироваться и попадать в другие клетки, вызывая изменение их функций [124]. В то же время, большая часть микроРНК попадает в межклеточное пространство случайно в результате апоптоза, некроза или секреторных процессов, и не обладает какой-либо специфичной функциональной активностью [137].

В тромбоцитах синтез микроРНК *de novo* не происходит, поэтому весь пул содержащихся в них РНК (в том числе и пре-микроРНК) имеет мегакариоцитарное происхождение. Однако тромбоциты содержат белки, необходимые для созревания микроРНК, следовательно, способны образовывать функционально активные микроРНК, участвующие в регуляции функций тромбоцитов [138]. Образующиеся во время активации МЧ отражают содержимое цитоплазмы тромбоцита в момент активации и несут в себе тот же репертуар микро- и мРНК. ТМЧ действительно могут переносить и трансфецировать молекулы РНК в другие клетки, и, таким образом, модулировать активность некоторых генов, однако результат очень сильно варьирует в зависимости от условий эксперимента [48]. Например, содержащаяся в ТМЧ miR-939 после трансфекции в клетки эпителиального рака яичника запускает эпителиально-мезенхимальный переход путем снижения экспрессии Е-кадгерина, а также повышения уровня экспрессии N-кадгерина, виментина, фибронектина и некоторых других генов, участвующих в процессе приобретения клетками мезенхимных свойств [139]. MiR-223 при попадании в клетки рака легких вызывает снижение экспрессии белка EPB41L3, относящегося к опухолевым супрессорам, приводя, таким образом, к увеличению их инвазивного потенциала [140]. Помимо вклада в прогрессию опухолей, некоторые содержащиеся в ТМЧ микроРНК участвуют в формировании резистентности опухолей к терапии. MiR-24-3p способствует формированию резистентности клеток мелкоклеточного рака легких к комбинированной терапии этопозидом и цисплатином путем активации автофагии [141]. В экспериментах на раковых клеточных линиях A2780DX5 и KB-V1 было показано, что miR-27a и miR-451 участвуют в активации экспрессии Р-гликопротеина, который является продуктом гена *MDR1* и относится к белкам множественной опухолевой резистентности [142]. Помимо этого, трансфекция тромбоцитарных микроРНК let-7a и miR-27b в эндотелиальные клетки приводит к супрессии тромбоспондина-1, который является ингибитором ангиогенеза и, тем самым, способствует формированию сосудистых трубочек в экспериментах *in vitro* [143, 144]. Эти данные явно свидетельствуют о вовлеченности тромбоцитарных микроРНК в процессы регуляции ангиогенеза в организме, а также о возможном вкладе в развитие рака путем индукции роста опухоли и модификации активности таргетных белков в клетках. Однако существующие на сегодняшний день данные литературы противоречивы, что может быть связано с использованием различных моделей в изучении роли микроРНК, а также с выбором модельного объекта (типы микроРНК и клетки-мишени).

1.5. Ингибиторный эффект тромбоцитов в развитии опухолей

Несмотря на общепринятую концепцию о вкладе тромбоцитов в развитие и распространение опухолей, а также на огромное количество данных ее подтверждающих, некоторые работы свидетельствуют о том, что тромбоциты в некоторых слу-

чаях могут оказывать ингибирующий эффект на развитие опухоли и ее метастазирование [67]. Показано, что количество метастазов в печени у мышей увеличивается значительнее в случае сопутствующего ингибирования тромбоцитов и NK-клеток, нежели в случае ингибирования только NK-клеток. Однако в легких наблюдалась совершенно обратная ситуация, и метастазов было меньше у животных в случае одновременного ингибирования NK-клеток и тромбоцитов [145]. В другом исследовании у *Tpo*$^{-/-}$ мышей с пониженным количеством тромбоцитов введение изологичных клеток карциномы приводило к более раннему появлению метастазов и увеличению их общего числа по сравнению с контрольными *Tpo*$^{+/+}$ животными [146]. В двух изологичных моделях с использованием клеток рака молочной железы у *Tpo*$^{-/-}$ мышей наблюдалось увеличение метастазирования лимфатических узлов по сравнению с контролем [122]. Известно об участии тромбоцитарного фактора-4 (PF4/CXCL4) в опухолевой супрессии, а также в процессах ингибирования ангиогенеза путем блокирования пролиферации и миграции эндотелиальных клеток [147]. При этом совместное культивирование тромбоцитов с клетками меланомы и рака простаты приводило к ингибированию пролиферации раковых клеток [147].

В последнее время появляется все больше данных об участии тромбоцитарных микроРНК в ингибировании опухолей. Некоторые авторы считают, что ТМЧ и содержащаяся в них микроРНК поддерживают прогрессию и метастазирование рака скорее на поздних стадиях, тогда как на более ранних стадиях играют роль супрессоров [48]. Показано участие тромбоцитарной miR-24 в индукции апоптоза опухолевых клеток в моделях *in vitro* и *in vivo* [148]. Прямыми мишенями miR-24 оказались малые ядерные некодирующие РНК mt-Nd2 и Snora75, ингибирование которых приводило к дисфункции митохондрий и блокированию роста опухолевой клетки [148]. Две другие тромбоцитарные микроРНК miR-223 и miR-126 способны индуцировать арест клеточного цикла, блокировать миграцию и увеличивать чувствительность клеток рака молочной железы человека к цисплатину [132, 149–151]. К мишеням miR-126 также относят белок VEGF, который является одним из ключевых факторов ангиогенеза [152], в то время как miR-223 ингибирует формирование новых сосудов путем блокирования интегрина β1 и передачи сигнала от ростовых факторов в эндотелиальных клетках [153].

В некоторых случаях тромбоциты могут блокировать развитие и метастазирование опухолей. Противоречивые результаты в данном случае можно объяснить различиями в условиях и модели экспериментов, используемых в разных исследованиях.

2. ТРОМБОЦИТЫ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Идея использовать антитромбоцитарную терапию в лечении опухолевых заболеваний появилась в результате накопления данных о том, что ежедневное применение аспирина способствует снижению рисков образования рака, метастазирования и смертельного исхода у раковых больных. Было разработано множество препаратов, направленных на блокирование функции тромбоцитов, которое может осуществляться путем ингибирования поверхностных рецепторов, блокирования высвобождения гранул, либо специфического воздействия на определенные сигнальные молекулы в тромбоцитах. Большинство из этих препаратов либо уже введены в клинику, либо проходят клинические испытания [29]. Для некоторых уже введенных в клинику препаратов, таких как аспирин (блокатор циклооксигеназ 1 и 2), клопидогрель (блокатор рецептора P2Y12), а также c7E3/ReoPro (ингибитор рецептора GPIIb/IIIa), показана способность ингибировать рост опухоли и метастазирование рака [154]. Однако в настоящий момент все еще остро стоит вопрос о целесообразности и ограничениях применения антитромбоцитарной терапии в лечении

опухолевых заболеваний из-за вмешательства в систему коагуляции крови, а также недостаточного понимания процессов взаимодействия тромбоцитов с клетками других типов, в том числе, с раковыми клетками. В следующем разделе будут рассмотрены основные мишени для блокирования тромбоцитов в ходе антитромбоцитарной терапии и ограничения применения подобной терапии, а также использование тромбоцитов в диагностике и для таргетной доставки препаратов в противоопухолевой терапии.

2.1. Антитромбоцитарная терапия в лечении опухолей

Аспирин, относящийся к классу нестероидных противовоспалительных препаратов, на сегодняшний день является одним из самых популярных лекарств в мире. В терапевтических дозах аспирин блокирует синтез простаноидов, таким образом, оказывая противовоспалительное, антикоагуляционное, анальгетическое и жаропонижающее действия [155]. Основной эффект аспирина опосредован необратимым ингибированием циклооксигеназ 1 и 2 (ЦОГ1 и ЦОГ2), обеспечивающих синтез простагландинов из арахидоновой кислоты (АК) в клетке. Блокирование ЦОГ1 приводит к ингибированию синтеза ТхА2, который является одним из вторичных медиаторов активации и основным продуктом метаболизма АК в тромбоцитах [156]. В отличие от ЦОГ1, ЦОГ2 в норме синтезируется только некоторыми типами тканей (например, эндотелий), в то время как повышенная экспрессия ЦОГ2 характерна для многих типов опухолей. ЦОГ2 путем синтеза простагландина Е2 активирует пролиферацию раковых клеток, запускает процессы воспаления, участвует в ангиогенезе опухоли, а также способствует уклонению раковых клеток от действия иммунной системы [157]. Согласно фармакологическим данным, аспирин в низких дозах (75–160 мг ежедневно) блокирует активацию тромбоцитов и предотвращает их взаимодействие с раковыми клетками в циркуляции [29]. Этот эффект обусловлен низким уровнем синтеза белка в тромбоцитах, поэтому даже небольшие дозы аспирина вызывают блокирование ЦОГ1, сохраняющееся в течение длительного времени [158]. Однако малые дозы аспирина не способны поддерживать длительное ингибирование ЦОГ2 в ядерных клетках, поскольку синтез ЦОГ2 *de novo* восстанавливает ее активность в течение нескольких часов [159]. При этом более высокие дозы аспирина (650 мг ежедневно) успешно поддерживают блокирование активности ЦОГ2 в течение суток даже в ядерных клетках [160]. Согласно результатам клинических исследований, ежедневное применение аспирина снижает риск возникновения опухоли [161] и уменьшает смертность среди пациентов с раком толстой кишки [162], а также предотвращает рецидив аденомы толстой кишки [163, 164]. В то же время другие исследователи не находят связи между приемом аспирина и снижением риска возникновения аденомы толстой кишки [165]. Возможно, это связано с разным уровнем экспрессии ЦОГ2 в раковых клетках исследуемых больных. Так, прием аспирина на ежедневной основе уменьшал риск образования колоректального рака только у пациентов с оверэкспрессией гена ЦОГ2 и не влиял на развитие рака у пациентов с нормальным уровнем ЦОГ2 [166]. Помимо рака толстой кишки, есть данные об эффективности аспирина при раке молочной [104] и поджелудочной железы [167], раке желудка [168] и простаты [169]. Последующие исследования позволили установить, что противоопухолевый эффект аспирина также может быть связан с блокированием активности тромбоцитов [157]. Аспирин способен блокировать про-ангиогенный сигнал от тромбоцитов [104] и способствовать снижению метастазирования [170]. Однако до сих пор нерешенным остается вопрос, связан ли основной ингибирующий эффект аспирина с блокированием активации тромбоцитов, или с непосредственным влиянием на раковые клетки. Небольшие и часто спорные преимущества использования ас-

пирина в противоопухолевой терапии не перевешивают его недостатки в виде побочных эффектов, главным из которых являются кровотечения. Поэтому в большинстве развитых стран аспирин все же не рекомендуется к использованию для предотвращения образования первичной или вторичной опухоли у пациентов [157].

Другим широко применяемым антикоагулянтом в клинике является клопидогрель. Клопидогрель, относящийся к тиенопиридинам второго поколения, приобретает активную форму только после трансформации ферментами печени, в связи с чем его действие отложено во времени [171]. Клопидогрель оказывает выраженное антикоагуляционное действие за счет ингибирования рецептора P2Y12, активация которого является одним из ключевых факторов запуска агрегации и дегрануляции тромбоцитов [172]. Согласно данным клинических испытаний, клопидогрель способствует снижению риска возникновения рака толстой кишки у пациентов [173]. Однако в ретроспективном исследовании 2015 г. не было выявлено взаимосвязи между приемом клопидогреля и снижением риска развития рака молочной железы, простаты или толстой кишки [174]. Мета-анализ клинических исследований также не выявил связи между применением клопидогреля и снижением вероятности развития рака у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и цереброваскулярными нарушениями [175]. При этом клопидогрель не снижал риск развития инфаркта миокарда или инсульта, а также увеличивал возможность образования кровотечений у больных [175]. Более того, была обнаружена связь между применением прасугреля, другого специфичного ингибитора рецептора P2Y12, также относящегося к тиенопиридинам, и развитием рака [176]. Анализ данных клинических исследований по влиянию комбинационной антитромбоцитарной терапии (прасугрель в сочетании с аспирином, либо клопидогрель в сочетании с аспирином) на пациентах, подвергавшихся чрезкожному коронарному вмешательству, позволил установить, что частота новообразований, особенно в легких и толстом кишечнике, была значительно выше у пациентов, принимавших прасугрель [177]. При этом смерть от рака также была выше в группе, принимавшей прасугрель. В противоположность этим данным, недавние систематические обзоры и анализ мета-данных позволили установить, что частота появления злокачественных новообразований не различается у пациентов, принимающих прасугрель или клопидогрель, также не было обнаружено различий в частоте случаев образования рака и смертности между группами, получавшими тиенопиридины, аспирин или плацебо [178]. В результате другого довольно большого исследования был сделан вывод, что люди, принимавшие аспирин, менее расположены к риску заболевания раком, а комбинация аспирина с клопидогрелем приводит к еще большему снижению этого риска [179]. На сегодняшний день противоопухолевая активность тиенопиридинов и их производных является спорным вопросом, который требует дополнительного проведения контролируемых клинических исследований.

Перспективным направлением в антитромбоцитарной терапии является разработка и применение антагонистов αIIbβ3 (или GPIIb/IIIa) рецептора. Интегриновый рецептор αIIbβ3 специфичен для МК и тромбоцитов и представляет собой гетеродимер, состоящий из α2- и β3-субъединиц, который в активированном состоянии может связываться с фибриногеном, vWF, фибрином и фибронектином [180]. Главная роль рецептора αIIbβ3 заключается в связывании фибриногена на поздних стадиях активации тромбоцитов, необходимого для успешной агрегации [180]. Рецептор αIIbβ3 играет важную роль в индуцированной опухолью агрегации тромбоцитов [177]. Более того, αIIbβ3 может синтезироваться самими раковыми клетками, принимая участие в процессах адгезии и инвазии [181]. Применение различных ингибиторов αIIbβ3 приводит к значительному снижению метастазирования в экспериментальных моделях, поэтому некоторые исследователи высказывали предположение возможного использования блокаторов αIIbβ3 в противоопухолевой тера-

пии [182, 183]. Среди αIIbβ3 ингибиторов в клинике используются абциксимаб, эфптифибатид и тирофибан, которые вводятся пациенту внутривенно. Однако их применение ограничено из-за высокого риска развития кровотечений и оправдано только при острых симптомах, например, в терапии острого коронарного синдрома или при чрезкожном коронарном вмешательстве [181]. В этой связи длительное применение подобных препаратов в противоопухолевой терапии для предотвращения метастазирования является нецелесообразным. Следующим витком эволюции αIIbβ3 блокаторов стала разработка пероральных препаратов, специфически связывающихся с RGD последовательностью на рецепторе, однако, клинические исследования так и не были завершены из-за недостаточного положительного эффекта и увеличения смертности пациентов [184]. Впоследствии появилась идея изменить стратегию блокирования и воздействовать исключительно на активированную форму рецептора. Это позволило бы использовать гораздо меньшие концентрации блокатора и избежать нежелательных побочных эффектов, поскольку препарат будет скапливаться главным образом в очагах активации тромбоцитов [181]. Так, первым был разработан scFvMA2, представляющий собой одноцепочечное антитело, связывающее активную форму αIIbβ3 [185]. Следующими стали низкомолекулярные соединения RUC-2 и его более усовершенствованный аналог RUC-4, обнаруженные в ходе высокопроизводительного скрининга, которые специфически связываются с ион-зависимым адгезионным сайтом (MIDAS) на β3 субъединице рецептора [186]. Однако до сих пор открытым остается вопрос, обладают ли подобные препараты противоопухолевой активностью и могут ли использоваться в качестве адъювантной терапии в клинике.

Тромбиновый рецептор PAR-1 является гораздо менее популярным в антитромбоцитарной терапии по сравнению с аспирином и блокаторами P2Y12, однако, все же представляет большой интерес для клиницистов из-за важной роли в развитии различных патологий и опухолевых заболеваний. PAR-1 представляет собой рецептор, ассоциированный с G-белком, который активируется в результате протеолитического расщепления внеклеточного N-концевого домена [187]. PAR-1 активируется плазмином, трипсином, тканевым фактором, активным белком C, матриксным металлопротеазами и некоторыми факторами крови, однако, главным его лигандом является тромбин, который запускает канонический путь активации рецептора [188]. Тромбин является одним из главных активаторов тромбоцитов, который запускает выброс вторичных медиаторов активации, а также опосредует превращение неактивного фибриногена в активные мономеры фибрина, необходимые для завершения формирования стабильного тромба [189]. Помимо тромбоцитов, PAR-1 рецептор обнаруживается на других типах клеток крови, за исключением эритроцитов, а также на эпителиальных клетках, нейронах, астроцитах и клетках иммунной системы [188]. Более того, PAR-1 присутствует на поверхности раковых клеток различного происхождения и клеток микроокружения, где в отличие от нормальных тканей рецептор находится в конститутивно активированном состоянии [190]. Оверэкспрессия PAR-1 в раковых клетках увеличивает инвазивность и способствует диссеминации раковых клеток, поэтому для некоторых типов рака связана с неблагоприятными прогнозами течения заболевания [191]. Помимо этого, PAR-1 способствует росту и выживаемости раковых клеток, вовлечен в процессы эпителиально-мезенхимального перехода, метастазирования и ангиогенеза опухоли [190]. Следовательно, применение препаратов, направленных на ингибирование PAR-1 рецептора, позволит не только минимизировать вклад тромбоцитов в развитие опухолей, но также воздействовать напрямую на раковые клетки посредством модуляции активности поверхностных рецепторов. Первым одобренным к использованию в клинике блокатором PAR-1 рецептора стал ворапаксал, который, согласно клиническим исследованиям, оказался эффективен в лечении

периферической артериальной болезни, легочной гипертензии, острого коронарного синдрома и ряда других заболеваний [190]. Однако данные о влиянии ворапаксала на опухолевые заболевания все еще очень ограничены. Известно, что ворапаксал способен ингибировать пролиферацию клеток рака яичника *in vitro* [192]. Вторую стадию клинических испытаний прошел атопаксар и проходит PZ-128, которые также обладают антикоагуляционным эффектом [193, 194]. Атопаксар путем ингибирования JAK/STAT сигнального пути вызывал арест клеточного цикла и апоптоз раковых клеток *in vivo* [195]. Однако влияние блокаторов PAR-1 рецептора на развитие опухолевых заболеваний недостаточно изучено для проведения клинических испытаний.

Помимо упомянутых выше, клинические испытания также проходят ингибитор фосфодиэстераз 5 и 3 дипиридамол и аналоги простациклина [177]. Фосфодиэстеразы (PDE) катализируют гидролиз циклических мононуклеотидов, снижая количество цАМФ и цГМФ в тромбоцитах и модулируя тем самым активность ингибиторных сигнальных путей [196]. Дипиридамол используется в клинике как антитромбоцитарный препарат для лечения инсульта и в качестве вазодилатирующего агента [196]. Несколько довольно старых клинических исследований показали эффективность дипиридамола в лечении меланомы [197] и рака поджелудочной железы [198]. Однако согласно результатам других исследований не было обнаружено положительного влияния дипиридамола в терапии саркомы, колоректального рака, рака простаты, молочной железы и почечно-клеточного рака [177]. Что касается аналогов простациклина, синтетический аналог PGI2 илопрост проходит клинические исследования на больных раком легких и в качестве химиопрофилактики на людях с высоким риском развития рака легких [199, 200]. На сегодняшний день использование илопроста и его аналогов в качестве антитромбоцитарной терапии является спорным вопросом [201].

2.2. Использование тромбоцитов для таргетной терапии опухолей

Благодаря способности тесно взаимодействовать с раковыми клетками, тромбоциты были выбраны в качестве возможного переносчика для таргетной доставки противоопухолевых препаратов напрямую к раковым клеткам. Такой способ доставки позволит минимизировать побочные эффекты, связанные с неспецифическим воздействием препарата, и увеличить время его циркуляции за счет уменьшения физиологического выведения. Существует два способа доставки препаратов при помощи тромбоцитов в противоопухолевой терапии: загрузка препаратов непосредственно в тромбоциты и использование нагруженных препаратами нано- или микрочастиц, покрытых мембраной тромбоцитов [177].

В рамках первого подхода проводились исследования по таргетной доставке доксорубицина при помощи тромбоцитов в клетки аденокарциномы легких в моделях *in vitro* и *in vivo* [202]. Доксорубицин относится к группе антрациклиновых антибиотиков и является известным цитостатиком, широко применяемым в химиотерапии опухолей различного происхождения [203]. Нагрузка доксорубицином не оказывала существенного влияния на функции тромбоцитов, при этом эффективность действия препарата была значительно выше по сравнению с введением свободной формы доксорубицина в той же дозе [202]. В другом исследовании использование нагруженных доксорубицином тромбоцитов, конъюгированных с анти-CD22 моноклональными антителами, приводило к уменьшению токсичности доксорубицина и увеличению его противоопухолевой активности против В-клеточной лимфомы [204]. Для элиминации раковых клеток в циркуляции был предложен способ генно-инженерного встраивания на поверхность цитоплазматической мембраны тромбоцитов молекул TRAIL, которые являются лигандом широко

представленных на раковых клетках рецепторов смерти [205]. Тромбоциты, несущие TRAIL, запускали гибель раковых клеток *in vitro* и значительно снижали количество метастазов рака простаты у мышей в моделях *in vivo* [205]. Однако использование тромбоцитов для таргетного воздействия на раковые клетки имеет свои недостатки. Поскольку тромбоциты являются очень сложными образованиями, чутко реагирующими на любые изменения в их окружении, даже незначительные физические воздействия (центрифугирование, отмывка, температурные изменения) могут привести к активации тромбоцитов, что усложняет их использование и процесс хранения [206]. При этом важным нерешенным вопросом остаются последствия применения генной инженерии на экспрессию эндогенных белков в тромбоцитах [206]. В связи с этим в последнее время более популярными становятся работы с использованием наночастиц, покрытых тромбоцитарной цитоплазматической мембраной, которые лишены описанных недостатков.

Применение наночастиц, состоящих из внутреннего ядра на основе наногеля, нагруженного доксорибуцином, и мембраны тромбоцитов со встроенным TRAIL, приводило к снижению количества циркулирующих раковых клеток и блокированию образования метастазов в модели *in vivo* [207]. В другом исследовании конструирование наночастиц из черного фосфора в качестве ядра и мембраны тромбоцитов в качестве оболочки позволили потенцировать противораковое действие гедерагенина, природного тритерпеноида, выделяемого из плюща [208]. Сам по себе гедерагенин обладает низкой токсичностью, однако, его противоопухолевая эффективность ограничена при прямом введении в свободной форме. Использование микрочастиц, нагруженных гедерагенином, приводило к снижению пролиферации и выживаемости раковых клеток за счет запуска митохондриального апоптоза, увеличению образования активных форм кислорода и активации процесса автофагии [208].

Наночастицы из золота, покрытые химерной цитоплазматической мембраной, состоящей из фрагментов мембраны тромбоцитов и эритроцитов, в которую были добавлены гидрофобные молекулы куркумина, продемонстрировали способность таргетной доставки препарата раковым клеткам [209]. Для подобных конструктов характерны увеличенное время жизни в циркуляции и уклонение от воздействия иммунной системы за счет содержания компонентов эритроцитарной мембраны, а также способность напрямую взаимодействовать с раковыми клетками, благодаря компонентам мембраны тромбоцитов. При этом таргетная доставка куркумина позволила потенцировать его противоопухолевую активность за счет увеличения биологической доступности [209].

Группа ученых из Индии предложила достаточно простой и удобный способ доставки противораковых препаратов путем использования микрочастиц, выделяемых самими тромбоцитами во время активации. Для этого тромбоциты выделяли из цельной крови, нагружали доксорибуцином и затем активировали кальциевым ионофором для получения МЧ [210]. Подобная методика позволила избежать ответа иммунной системы и увеличить активность доксорибуцина против клеток лейкемии, выделенных из крови больных [210].

Методика таргетной доставки препаратов при помощи покрытых мембраной микрочастиц, несомненно, является многообещающей в терапии опухолевых заболеваний, однако все же не лишена недостатков. Для достижения необходимого терапевтического эффекта требуется довольно большое количество частиц, а, следовательно, и клеток, из которых они выделяются [211]. Доработки требует процесс выделения мембраны тромбоцитов, поскольку в ходе процедуры происходит большая потеря клеток, служащих строительным материалом для частиц. Для того, чтобы добиться широкого применения, должны быть усовершенствованы методы и упрощен протокол получения микрочастиц [211]. Также должны быть подробно исследованы последствия применения подобной терапии для организма в целом.

Метод использования покрытых мембраной микрочастиц демонстрирует хороший потенциал в терапии различных заболеваний, однако, для проведения клинических испытаний необходимо проведение дальнейших исследований и устранение упомянутых выше недостатков.

2.3. Тромбоциты в диагностике раковых заболеваний

Ранняя диагностика и своевременная терапия значительно увеличивают шансы пациентов в борьбе с раковыми заболеваниями. Связь между тромбоцитозом и развитием рака была установлена более века назад, и за это время накопилось большое количество свидетельств участия тромбоцитов в прогрессировании опухолей. Рак может брать под контроль процессы продукции тромбоцитов, а также напрямую воздействовать на тромбоциты, вынуждая систему коагуляции работать в своих интересах. При этом из-за способности избирательно поглощать некоторые компоненты плазмы, в том числе микровезикулы, выделяемые другими клетками, сами по себе тромбоциты могут служить своеобразным индикатором происходящих в организме изменений [154]. Показана способность тромбоцитов связывать белки и поглощать РНК-содержащие микровезикулы, выделяемые раковыми клетками, в моделях *in vivo* как у животных, так и у раковых больных [212, 213]. Некоторые исследователи считают, что путем изменения экспрессии генов в МК и репертуара тромбоцитарных РНК, опухоль способна влиять на тромбоциты, делая их более полезными для развития и распространения рака (так называемые обученные опухолью тромбоциты) [213, 214]. В тромбоцитах раковых больных в отличие от тромбоцитов здоровых людей представлен другой паттерн белков и нуклеиновых кислот [215]. Благодаря своей доступности и многочисленности, тромбоциты могут стать идеальной моделью для ранней диагностики раковых заболеваний. Так, группе Best с соавт. по сиквенсу тромбоцитарных мРНК удалось не только отличить здоровых доноров от раковых больных (96% точность), но также определить место локализации первичной опухоли более чем в половине случаев (точность до 71% в зависимости от типа опухоли) [216].

ТМЧ, способные менять свое количество, репертуар содержащихся в них РНК и белков в зависимости от изменения поступающих в тромбоциты сигналов также могут использоваться в качестве маркера в диагностике. У больных колоректальным раком или раком поджелудочной железы наблюдается увеличение общего числа и повышенная прокоагулянтная активность ТМЧ, которая снижается в периоды ремиссии [217]. Подобные изменения характеристик ТМЧ могут использоваться в качестве биомаркера, отражающего эволюцию заболевания [217]. В исследовании, проведенном на больных немелкоклеточным раком легких также показано увеличение количества МЧ эндотелиального и тромбоцитарного происхождения у больных, которое снижалось после проведения терапии [218]. Более того, на основании анализа МЧ был сделан одногодичный прогноз результата лечения пациентов с продвинутой стадией развития рака [218]. Эти данные звучат многообещающе и, возможно, использование анализа тромбоцитарных белков и ТМЧ станет новым прорывом в диагностике рака, который позволит остановить развитие опухолей на ранних стадиях и предотвратить образование метастазов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раковые заболевания являются одной из основных причин смертности и инвалидизации в мире и стоят на втором месте по распространенности после сердечно-сосудистых заболеваний [219]. С общей тенденцией увеличения срока жизни неизбежно будет возрастать количество опухолевых больных. И хотя прогресс в развитии современных технологий диагностики и лечения позволил добиться значительных

успехов в борьбе с раком, мы все еще далеки от полного понимания процессов и механизмов, ответственных за развитие и распространение опухолей. В последние годы фокус внимания смещается с биологии самих раковых клеток на их микроокружение, которое поддерживает опухоль, способствует ее росту и распространению метастазов, а также оказывает значительное влияние на эффективность терапии [220].

Участие тромбоцитов в прогрессии опухолей на сегодняшний день является известным и общепринятым фактом, однако, многие детали взаимодействия тромбоцитов и раковых клеток все еще остаются неизвестны. Главная цель данного обзора заключалась в исчерпывающем и разностороннем анализе проблемы участия тромбоцитов в развитии опухолевых заболеваний. Согласно имеющимся литературным данным, раковые клетки могут воздействовать на тромбоциты различными путями, увеличивать их количество в кровотоке и, изменяя экспрессию РНК в МК, модулировать функции тромбоцитов (обученные опухолью тромбоциты). Тромбоциты могут защищать раковые клетки от физического стресса и атаки иммунной системы в кровотоке, способствовать их адгезии и инвазии, участвовать в процессах ангиогенеза и, по некоторым данным, роста опухоли. При этом участие тромбоцитов в процессах адгезии и инвазии раковых клеток, а также роста опухоли, скорее всего, является необязательным, если вообще имеет место быть. Данные касательно роли тромбоцитов в росте и процессах инвазии опухоли являются неоднозначными и свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований.

Набирает популярность направление по изучению выделяемых клетками крови МЧ и их роли в физиологических и патологических процессах в организме. При этом ТМЧ могут как способствовать, так и ингибировать развитие опухолей. Наличие таких противоречивых данных можно объяснить разницей в условиях эксперимента и модельных объектах, однако, истинное значение ТМЧ и содержащихся в них микроРНК в развитии и распространении опухолей является задачей, которую предстоит решить в ближайшее время.

Активно ведутся исследования по использованию антитромбоцитарной терапии в лечении опухолевых заболеваний. И хотя уверенно заявлять о необходимости подобной терапии для раковых больных с сопутствующим тромбоцитозом все еще преждевременно, данные мета-анализов клинических испытаний свидетельствуют в пользу того, что использование аспирина положительно влияет на динамику заболевания и увеличивает продолжительность жизни пациентов. Помимо этого, было проведено довольно большое количество исследований о влиянии антитромбоцитарных препаратов разных классов на развитие и распространение опухоли, и некоторые из них демонстрируют обнадеживающие результаты, однако, большинство из них были проведены только *in vitro* или находятся на стадии доклинических испытаний. За исключением аспирина, свидетельства положительного эффекта антитромбоцитарной терапии в лечении раковых заболеваний до сих пор сильно ограничены. В этой связи перспективным является продолжение подобных исследований и разработка новых антитромбоцитарных препаратов, направленных на снижение активности тромбоцитов и контроль продукции тромбоцитов у больных для предотвращения развития тромбоцитоза.

Многообещающе звучат результаты использования тромбоцитов в экспериментальных моделях лечения рака. Применение таргетной доставки препаратов при помощи тромбоцитов или наночастиц, покрытых цитоплазматической мембраной тромбоцитов, позволят избежать нежелательных побочных эффектов применения противоопухолевых препаратов, многие из которых являются токсичными, а также сконцентрировать действие препарата на заданной мишени. Значительные успехи достигнуты в разработке диагностики раковых заболеваний с использованием ана-

лиза крови. Возможность использования самого доступного биоматериала в организме для точного выявления рака на ранних стадиях ознаменует собой настоящий прорыв в диагностической медицине. Поскольку тромбоциты способны избирательно поглощать компоненты плазмы крови, содержимое их микрочастиц может отражать особенности и даже стадию развития опухоли, поэтому использование ТМЧ также является перспективным направлением в диагностике рака.

Раскрытие точных механизмов взаимодействия тромбоцитов с раковыми клетками и роли, которую они выполняют в развитии и распространении опухолей, являются необходимым условием для успешной терапии и являются важной задачей, которую предстоит решить.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-115-50097.

The reported study was funded by RFBR, project number 19-115-50097.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Quach M.E., Chen W., Li R.* Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. Blood. 131(14): 1512–1521. 2018.
2. *Mackman N.* Triggers, targets and treatments for thrombosis. Nature. 451(7181): 914–918. 2008.
3. *Franco A.T., Corken A., Ware J.* Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. Blood. 126(5): 582–588. 2015.
4. *Cooke N.M., Egan K., McFadden S., Grogan L., Breathnach O.S., O'Leary J., Hennessy B.T., Kenny D.* Increased platelet reactivity in patients with late-stage metastatic cancer. Cancer Med. 2(4): 564–570. 2013.
5. *Trousseau A.* Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris. Paris; New York: Baillière. 1865.
6. *Metharom P., Falasc1a M., Berndt M.C.* The History of Armand Trousseau and Cancer-Associated Thrombosis. Cancers (Basel). 11(2): 158. 2019.
7. *Menter D.G., Tucker S.C., Kopetz S., Sood A.K., Crissman J.D., Honn K.V.* Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. Cancer Metastasis Rev. 33(1): 231–269. 2014.
8. *Edwards E.A.* Migrating thrombophlebitis associated with carcinoma. N. Engl. J. Med. 240(26): 1031–1035. 1949.
9. *Womack W.S.,Castellano C.J.* Migratory thrombophlebitis associated with ovarian carcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol. 63(2): 467–469. 1952.
10. *McKay D.G.,Wahle G.H. Jr.* Disseminated thrombosis in colon cancer. Cancer. 8(5): 970–978. 1955.
11. *Nusbacher J.* Migratory Venous Thrombosis and Cancer. N. Y. State J. Med. 64: 2166–2173. 1964.
12. *Warren B.A.,Vales O.* The adhesion of thromboplastic tumour emboli to vessel walls in vivo. Br. J. Exp. Pathol. 53(3): 301–313. 1972.
13. *Hilgard P.* The role of blood platelets in experimental metastases. Br. J. Cancer. 28(5): 429–435. 1973.
14. *Gasic G.J., Gasic T.B., Galanti N., Johnson T.,Murphy S.* Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. Int. J. Cancer. 11(3): 704–718. 1973.
15. *Warren B.A.* Environment of the blood-borne tumor embolus adherent to vessel wall. J. Med. 4(3): 150–177. 1973.
16. *Crissman J.D., Hatfield J.S., Menter D.G., Sloane B., Honn K.V.* Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. Cancer Res. 48(14): 4065–4072. 1988.
17. *Menter D.G., Hatfield J.S., Harkins C., Sloane B.F., Taylor J.D., Crissman J.D., Honn K.V.* Tumor cell-platelet interactions in vitro and their relationship to in vivo arrest of hematogenously circulating tumor cells. Clin. Exp. Metastasis. 5(1): 65–78. 1987.
18. *Honn K.V., Tang D.G., Crissman J.D.* Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? Cancer Metastasis Rev. 11(3–4): 325–351. 1992.
19. *Egan K., Crowley D., Smyth P., O'Toole S., Spillane C., Martin C., Gallagher M., Canney A., Norris L., Conlon N., McEvoy L., Ffrench B., Stordal B., Keegan H., Finn S., McEneaney V., Laios A., Ducree J., Dunne E., Smith L., Berndt M., Sheils O., Kenny D., O'Leary J.* Platelet adhesion and

degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. PLoS One. 6(10):e26125. 2011.
20. *Lowe K.L., Navarro-Nunez L., Watson S.P.* Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. Thromb. Res. 129 Suppl 1: S30–S37. 2012.
21. *Donati M.B., Falanga A.* Pathogenetic mechanisms of thrombosis in malignancy. Acta Haematol. 106(1–2): 18–24. 2001.
22. *Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.* Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. Int. J. Cancer. 113(5): 752–760. 2005.
23. *Mezouar S., Mege D., Darbousset R., Farge D., Debourdeau P., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Dubois C.* Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis. Semin. Oncol. 41(3): 346–358. 2014.
24. *Palumbo J.S., Talmage K.E., Massari J.V., La Jeunesse C.M., Flick M.J., Kombrinck K.W., Jirouskova M., Degen J.L.* Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. Blood. 105(1): 178–185. 2005.
25. *Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Hempel D., Tucker S.C., Honn K.V.* Platelets and cancer angiogenesis nexus. Cancer Metastasis Rev. 36(2): 249–262. 2017.
26. *Cho M.S., Noh K., Haemmerle M., Li D., Park H., Hu Q., Hisamatsu T., Mitamura T., Mak S.L.C., Kunapuli S., Ma Q., Sood A.K., Afshar-Kharghan V.* Role of ADP receptors on platelets in the growth of ovarian cancer. Blood. 130(10): 1235–1242. 2017.
27. *Mezouar S., Darbousset R., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Dubois C.* Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis *in vivo.* Int. J. Cancer. 136(2): 462–475. 2015.
28. *Wojtukiewicz M.Z., Hempel D., Sierko E., Tucker S.C., Honn K.V.* Antiplatelet agents for cancer treatment: a real perspective or just an echo from the past? Cancer Metastasis Rev. 36(2): 305–329. 2017.
29. *Haemmerle M., Stone R.L., Menter D.G., Afshar-Kharghan V., Sood A.K.* The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. Cancer Cell. 33(6): 965–983. 2018.
30. *Lefrancais E., Ortiz-Munoz G., Caudrillier A., Mallavia B., Liu F., Sayah D.M., Thornton E.E., Headley M.B., David T., Coughlin S.R., Krummel M.F., Leavitt A.D., Passegue E., Looney M.R.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature. 544(7648): 105–109. 2017.
31. *Machlus K.R., Italiano J.E. Jr.* The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J. Cell Biol. 201(6): 785–796. 2013.
32. *Grozovsky R., Giannini S., Falet H., Hoffmeister K.M.* Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. Blood. 126(16):1877-1884. 2015.
33. *Smolenski A.* Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. J. Thromb. Haemost. 10(2): 167–176. 2012.
34. *Bye A.P., Unsworth A.J., Gibbins J.M.* Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. J. Thromb. Haemost. 14(5): 918–930. 2016.
35. *Andrews R.K., Shen Y., Gardiner E.E., Berndt M.C.* Platelet adhesion receptors and (patho)physiological thrombus formation. Histol. Histopathol. 16(3): 969–980. 2001.
36. *Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morelli A., Torboli M., Bolognesi G., Baricordi O.R.* Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood. 97(3): 587–600. 2001.
37. *McGrath R.T., McRae E., Smith O.P., O'Donnell J.S.* Platelet von Willebrand factor–structure, function and biological importance. Br. J. Haematol. 148(6): 834–843. 2010.
38. *Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B.* Cell adhesion mechanisms in platelets. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28(3): 403–412. 2008.
39. *Davi G., Patrono C.* Platelet activation and atherothrombosis. N. Engl. J. Med. 357(24): 2482–2494. 2007.
40. *Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cosemans J.M.* Platelet-based coagulation: different populations, different functions. J. Thromb. Haemost. 11(1): 2–16. 2013.
41. *Baaten C., Ten Cate H., van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M.* Platelet populations and priming in hematological diseases. Blood Rev. 31(6): 389–399. 2017.
42. *Sharda A., Flaumenhaft R.* The life cycle of platelet granules. F1000Res. 7: 236. 2018.
43. *Chen Y., Yuan Y., Li W.* Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from alpha-granules. Biosci. Rep. 38(5): 1–9. 2018.
44. *Hodge D.R., Hurt E.M., Farrar W.L.* The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. Eur. J. Cancer. 41(16): 2502–2512. 2005.
45. *Kumari N., Dwarakanath B.S., Das A., Bhatt A.N.* Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. Tumour Biol. 37(9): 11553–11572. 2016.
46. *Stone R.L., Nick A.M., McNeish I.A., Balkwill F., Han H.D., Bottsford-Miller J., Rupairmoole R., Armaiz-Pena G.N., Pecot C.V., Coward J., Deavers M.T., Vasquez H.G., Urbauer D., Landen C.N., Hu W., Gershenson H., Matsuo K., Shahzad M.M., King E.R., Tekedereli I., Ozpolat B., Ahn E.H., Bond V.K., Wang R., Drew A.F., Gushiken F., Lamkin D., Collins K., DeGeest K., Lutgendorf S.K., Chiu W.,

Lopez-Berestein G., Afshar-Kharghan V., Sood A.K. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. N. Engl. J. Med. 366(7): 610–618. 2012.
47. *Wolber E.M., Jelkmann W.* Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. J. Interferon Cytokine Res. 20(5): 499–506. 2000.
48. *Catani M.V., Savini I., Tullio V., Gasperi V.* The "Janus Face" of Platelets in Cancer. Int. J. Mol. Sci. 21(3): 1–23. 2020.
49. *Suzuki A., Takahashi T., Nakamura K., Tsuyuoka R., Okuno Y., Enomoto T., Fukumoto M., Imura H.* Thrombocytosis in patients with tumors producing colony-stimulating factor. Blood. 80(8): 2052–2059. 1992.
50. *Cheng J., Zeng Z., Ye Q., Zhang Y., Yan R., Liang C., Wang J., Li M., Yi M.* The association of pretreatment thrombocytosis with prognosis and clinicopathological significance in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 8(15): 24327–24336. 2017.
51. *Gu D., Szallasi A.* Thrombocytosis Portends Adverse Prognosis in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of 5,619 Patients in 16 Individual Studies. Anticancer Res. 37(9): 4717–4726. 2017.
52. *Gucer F., Moser F., Tamussino K., Reich O., Haas J., Arikan G., Petru E., Winter R.* Thrombocytosis as a prognostic factor in endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 70(2): 210–214. 1998.
53. *Ghanavat M., Ebrahimi M., Rafieemehr H., Maniati M., Behzad M.M., Shahrabi S.* Thrombocytopenia in solid tumors: Prognostic significance. Oncol Rev. 13(1): 413. 2019.
54. *Liebman H.A.* Thrombocytopenia in cancer patients. Thromb. Res. 133. Suppl 2: S63–S69. 2014.
55. *Weiss L.* Metastatic inefficiency. Adv. Cancer Res. 54: 159–211. 1990.
56. *Nieswandt B., Hafner M., Echtenacher B., Mannel D.N.* Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. Cancer Res. 59(6): 1295–1300. 1999.
57. *Aitokallio-Tallberg A.M., Viinikka L.U., Ylikorkala R.O.* Increased synthesis of prostacyclin and thromboxane in human ovarian malignancy. Cancer Res. 48(9): 2396–2398. 1988.
58. *Yu L.X., Yan L., Yang W., Wu F.Q., Ling Y., Chen S.Z., Tang L., Tan Y.X., Cao D., Wu M.C., Yan H.X., Wang H.Y.* Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. Nat. Commun. 5: 5256. 2014.
59. *Wicki A., Christofori G.* The potential role of podoplanin in tumour invasion. Br. J. Cancer. 96(1): 1–5. 2007.
60. *May F., Hagedorn I., Pleines I., Bender M., Vogtle T., Eble J., Elvers M., Nieswandt B.* CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. Blood. 114(16): 3464–3472. 2009.
61. *Mitrugno A., Williams D., Kerrigan S.W., Moran N.* A novel and essential role for FcgammaRIIa in cancer cell-induced platelet activation. Blood. 123(2): 249–260. 2014.
62. *Hair G.A., Padula S., Zeff R., Schmeizl M., Contrino J., Kreutzer D.L., de Moerloose P., Boyd A.W., Stanley I., Burgess A.W., Rickles F.R.* Tissue factor expression in human leukemic cells. Leuk. Res. 20(1): 1–11. 1996.
63. *O'Sullivan J.M., Preston R.J.S., Robson T., O'Donnell J.S.* Emerging Roles for von Willebrand Factor in Cancer Cell Biology. Semin. Thromb. Hemost. 44(2): 159–166. 2018.
64. *Kopp H.G., Placke T., Salih H.R.* Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. Cancer Res. 69(19): 7775–7783. 2009.
65. *Placke T., Orgel M., Schaller M., Jung G., Rammensee H.G., Kopp H.G., Salih H.R.* Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the anti-tumor reactivity of natural killer immune cells. Cancer Res. 72(2): 440–448. 2012.
66. *Haemmerle M., Taylor M.L., Gutschner T., Pradeep S., Cho M.S., Sheng J., Lyons Y.M., Nagaraja A.S., Dood R.L., Wen Y., Mangala L.S., Hansen J.M., Rupaimoole R., Gharpure K.M., Rodriguez-Aguayo C., Yim S.Y., Lee J.S., Ivan C., Hu W., Lopez-Berestein G., Wong S.T., Karlan B.Y., Levine D.A., Liu J., Afshar-Kharghan V., Sood A.K.* Platelets reduce anoikis and promote metastasis by activating YAP1 signaling. Nat. Commun. 8(1): 310. 2017.
67. *Foss A., Munoz-Sagredo L., Sleeman J., Thiele W.* The contribution of platelets to intravascular arrest, extravasation, and outgrowth of disseminated tumor cells. Clin. Exp. Metastasis. 37(1): 47–67. 2020.
68. *Reymond N., d'Agua B.B., Ridley A.J.* Crossing the endothelial barrier during metastasis. Nat. Rev. Cancer. 13(12): 858–870. 2013.
69. *Chambers A.F., MacDonald I.C., Schmidt E.E., Koop S., Morris V.L., Khokha R., Groom A.C.* Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. Cancer Metastasis Rev. 14(4): 279–301. 1995.
70. *Xu X.R., Carrim N., Neves M.A., McKeown T., Stratton T.W., Coelho R.M., Lei X., Chen P., Xu J., Dai X., Li B.X., Ni H.* Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. Thromb. J. 14. Suppl 1: 29. 2016.
71. *van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M.* Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. Nat. Rev. Cardiol. 16(3): 166–179. 2019.
72. *McCarty O.J., Mousa S.A., Bray P.F., Konstantopoulos K.* Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. Blood. 96(5): 1789–1797. 2000.

73. *Chen M., Geng J.G.* P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 54(2): 75–84. 2006.
74. *Qi C.L., Wei B., Ye J., Yang Y., Li B., Zhang Q.Q., Li J.C., He X.D., Lan T., Wang L.J.* P-selectin-mediated platelet adhesion promotes the metastasis of murine melanoma cells. PLoS One. 9(3): e91320. 2014.
75. *Stegner D., Dutting S., Nieswandt B.* Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. Thromb. Res. 133 Suppl 2: S149–S157. 2014.
76. *Sindelar W.F., Tralka T.S., Ketcham A.S.* Electron microscopic observations on formation of pulmonary metastases. J. Surg. Res. 18(2): 137–161. 1975.
77. *Schumacher D., Strilic B., Sivaraj K.K., Wettschureck N., Offermanns S.* Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. Cancer Cell. 24(1): 130–137. 2013.
78. *Harper M.T., Savage J.S., Poole A.W.* Comment on "Platelet-derived nucleotides promote tumor cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor" by Schumacher et al. Cancer Cell. 24(3): 287. 2013.
79. *Gresele P., Falcinelli E., Sebastiano M., Momi S.* Matrix Metalloproteinases and Platelet Function. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 147: 133–165. 2017.
80. *Albeiroti S., Ayasoufi K., Hill D.R., Shen B., de la Motte C.A.* Platelet hyaluronidase-2: an enzyme that translocates to the surface upon activation to function in extracellular matrix degradation. Blood. 125(9): 1460–1469. 2015.
81. *Cui H., Tan Y.X., Osterholm C., Zhang X., Hedin U., Vlodavsky I., Li J.P.* Heparanase expression upregulates platelet adhesion activity and thrombogenicity. Oncotarget. 7(26): 39486–39496. 2016.
82. *Conlon G.A., Murray G.I.* Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J. Pathol. 247(5): 629–640. 2019.
83. *Weber M.R., Zuka M., Lorger M., Tschan M., Torbett B.E., Zijlstra A., Quigley J.P., Staflin K., Eliceiri B.P., Krueger J.S., Marchese P., Ruggeri Z.M., Felding B.H.* Activated tumor cell integrin alphavbeta3 cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream. Thromb Res. 140. Suppl 1: S27–S36. 2016.
84. *Mammadova-Bach E., Gil-Pulido J., Sarukhanyan E., Burkard P., Shityakov S., Schonhart C., Stegner D., Remer K., Nurden P., Nurden A.T., Dandekar T., Nehez L., Dank M., Braun A., Mezzano D., Abrams S.I., Nieswandt B.* Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived Galectin-3. Blood. 2020.
85. *Schleicher R.I., Reichenbach F., Kraft P., Kumar A., Lescan M., Todt F., Gobel K., Hilgendorf I., Geisler T., Bauer A., Olbrich M., Schaller M., Wesselborg S., O'Reilly L., Meuth S.G., Schulze-Osthoff K., Gawaz M., Li X., Kleinschnitz C., Edlich F., Langer H.F.* Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. Blood. 126(12): 1483–1493. 2015.
86. *Kuckleburg C.J., Tiwari R., Czuprynski C.J.* Endothelial cell apoptosis induced by bacteria-activated platelets requires caspase-8 and -9 and generation of reactive oxygen species. Thromb. Haemost. 99(2): 363–372. 2008.
87. *Strilic B., Yang L., Albarran-Juarez J., Wachsmuth L., Han K., Muller U.C., Pasparakis M., Offermanns S.* Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. Nature. 536(7615): 215–218. 2016.
88. *Shaughnessy S.G., Lafrenie R.M., Buchanan M.R., Podor T.J., Orr F.W.* Endothelial cell damage by Walker carcinosarcoma cells is dependent on vitronectin receptor-mediated tumor cell adhesion. Am. J. Pathol. 138(6): 1535–1543. 1991.
89. *Labelle M., Begum S., Hynes R.O.* Platelets guide the formation of early metastatic niches. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111(30): E3053–E3061. 2014.
90. *Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R., Kaiser E.A., Snyder L.A., Pollard J.W.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature. 475(7355): 222–225. 2011.
91. *Chen Q., Zhang X.H., Massague J.* Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. Cancer Cell. 20(4): 538–549. 2011.
92. *Lu X., Mu E., Wei Y., Riethdorf S., Yang Q., Yuan M., Yan J., Hua Y., Tiede B.J., Lu X., Haffty B.G., Pantel K., Massague J., Kang Y.* VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging alpha4beta1-positive osteoclast progenitors. Cancer Cell. 20(6): 701–714. 2011.
93. *Risau W.* Mechanisms of angiogenesis. Nature. 386(6626): 671–674. 1997.
94. *Risau W., Flamme I.* Vasculogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11: 73–91. 1995.
95. *Ratajska A., Jankowska-Steifer E., Czarnowska E., Olkowski R., Gula G., Niderla-Bielinska J., Flaht-Zabost A., Jasinska A.* Vasculogenesis and Its Cellular Therapeutic Applications. Cells Tissues Organs. 203(3): 141–152. 2017.
96. *Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 275(5302): 964–967. 1997.

97. *Bussolati B., Grange C., Camussi G.* Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. FASEB J. 25(9): 2874–2882. 2011.
98. *De Palma M., Biziato D., Petrova T.V.* Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. Nat. Rev. Cancer. 17(8): 457–474. 2017.
99. *Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P.* Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell. 146(6): 873–887. 2011.
100. *Verheul H.M., Hoekman K., Lupu F., Broxterman H.J., van der Valk P., Kakkar A.K., Pinedo H.M.* Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. Clin. Cancer Res. 6(1): 166–171. 2000.
101. *Sierko E., Wojtukiewicz M.Z.* Platelets and angiogenesis in malignancy. Semin. Thromb. Hemost. 30(1): 95–108. 2004.
102. *Peterson J.E., Zurakowski D., Italiano J.E., Jr., Michel L.V., Fox L., Klement G.L., Folkman J.* Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. Am. J. Hematol. 85(7): 487–493. 2010.
103. *Marech I., Leporini C., Ammendola M., Porcelli M., Gadaleta C.D., Russo E., De Sarro G., Ranieri G.* Classical and non-classical proangiogenic factors as a target of antiangiogenic therapy in tumor microenvironment. Cancer Lett. 380(1): 216–226. 2016.
104. *Battinelli E.M., Markens B.A., Kulenthirarajan R.A., Machlus K.R., Flaumenhaft R., Italiano J.E. Jr.* Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. Blood. 123(1): 101–112. 2014.
105. *Italiano J.E. Jr., Richardson J.L., Patel-Hett S., Battinelli E., Zaslavsky A., Short S., Ryeom S., Folkman J., Klement G.L.* Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. Blood. 111(3): 1227-1233. 2008.
106. *Huang Z., Miao X., Luan Y., Zhu L., Kong F., Lu Q., Pernow J., Nilsson G., Li N.* PAR1-stimulated platelet releasate promotes angiogenic activities of endothelial progenitor cells more potently than PAR4-stimulated platelet releasate. J. Thromb. Haemost. 13(3): 465–476. 2015.
107. *Battinelli E.M., Markens B.A., Italiano J.E., Jr.* Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. Blood. 118(5): 1359–1369. 2011.
108. *Campanella R., Guarnaccia L., Cordiglieri C., Trombetta E., Caroli M., Carrabba G., La Verde N., Rampini P., Gaudino C., Costa A., Luzzi S., Mantovani G., Locatelli M., Riboni L., Navone S.E., Marfia G.* Tumor-Educated Platelets and Angiogenesis in Glioblastoma: Another Brick in the Wall for Novel Prognostic and Targetable Biomarkers, Changing the Vision from a Localized Tumor to a Systemic Pathology. Cells. 9(2): 1–15. 2020.
109. *Peterson J.E., Zurakowski D., Italiano J.E., Jr., Michel L.V., Connors S., Oenick M., D'Amato R.J., Klement G.L., Folkman J.* VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. Angiogenesis. 15(2): 265-273. 2012.
110. *Feng W., Madajka M., Kerr B.A., Mahabeleshwar G.H., Whiteheart S.W., Byzova T.V.* A novel role for platelet secretion in angiogenesis: mediating bone marrow-derived cell mobilization and homing. Blood. 117(14): 3893–3902. 2011.
111. *Chiodoni C., Iezzi M., Guiducci C., Sangaletti S., Alessandrini I., Ratti C., Tiboni F., Musiani P., Granger D.N., Colombo M.P.* Triggering CD40 on endothelial cells contributes to tumor growth. J. Exp. Med. 203(11): 2441–2450. 2006.
112. *Kuznetsov H.S., Marsh T., Markens B.A., Castano Z., Greene-Colozzi A., Hay S.A., Brown V.E., Richardson A.L., Signoretti S., Battinelli E.M., McAllister S.S.* Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. Cancer Discov. 2(12): 1150–1165. 2012.
113. *Verheul H.M., Jorna A.S., Hoekman K., Broxterman H.J., Gebbink M.F., Pinedo H.M.* Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. Blood. 96(13): 4216–4221. 2000.
114. *Sabrkhany S., Griffioen A.W., Oude Egbrink M.G.* The role of blood platelets in tumor angiogenesis. Biochim. Biophys. Acta. 1815(2): 189–196. 2011.
115. *Ho-Tin-Noe B., Goerge T., Cifuni S.M., Duerschmied D., Wagner D.D.* Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. Cancer Res. 68(16): 6851–6858. 2008.
116. *Li R., Ren M., Chen N., Luo M., Deng X., Xia J., Yu G., Liu J., He B., Zhang X., Zhang Z., Zhang X., Ran B., Wu J.* Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. BMC Cancer. 14: 167. 2014.
117. *Gremmel T., Frelinger A.L., 3rd, Michelson A.D.* Platelet Physiology. Semin. Thromb. Hemost. 42(3): 191–204. 2016.
118. *Metelli A., Salem M., Wallace C.H., Wu B.X., Li A., Li X., Li Z.* Immunoregulatory functions and the therapeutic implications of GARP-TGF-beta in inflammation and cancer. J. Hematol. Oncol. 11(1): 24. 2018.
119. *Cho M.S., Bottsford-Miller J., Vasquez H.G., Stone R., Zand B., Kroll M.H., Sood A.K., Afshar-Kharghan V.* Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. Blood. 120(24): 4869–4872. 2012.

120. *Yuan L., Liu X.* Platelets are associated with xenograft tumor growth and the clinical malignancy of ovarian cancer through an angiogenesis-dependent mechanism. Mol. Med. Rep. 11(4): 2449–2458. 2015.
121. *Boucharaba A., Serre C.M., Gres S., Saulnier-Blache J.S., Bordet J.C., Guglielmi J., Clezardin P., Peyruchaud O.* Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. J. Clin. Invest. 114(12): 1714–1725. 2004.
122. *Thiele W., Rothley M., Dimmler A., Bugert P., Salomo Coll C., Sleeman J.P.* Platelet deficiency in Tpo(–/–) mice can both promote and suppress the metastasis of experimental breast tumors in an organ-specific manner. Clin. Exp. Metastasis. 35(7): 679–689. 2018.
123. *Kailashiya J.* Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. Anal. Biochem. 546: 78–85. 2018.
124. *Randriamboavonjy V., Fleming I.* Platelet communication with the vascular wall: role of platelet-derived microparticles and non-coding RNAs. Clin. Sci. (Lond). 132(17): 1875–1888. 2018.
125. *Freyssinet J.M., Toti F.* Formation of procoagulant microparticles and properties. Thromb. Res. 125. Suppl 1: S46–S48. 2010.
126. *Plantureux L., Crescence L., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Dubois C.* Effects of platelets on cancer progression. Thromb. Res. 164. Suppl 1: S40–S47. 2018.
127. *Tesselaar M.E., Romijn F.P., van der Linden I.K., Bertina R.M., Osanto S.* Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. J. Thromb. Haemost. 7(8): 1421–1423. 2009.
128. *Zara M., Guidetti G.F., Boselli D., Villa C., Canobbio I., Seppi C., Visconte C., Canino J., Torti M.* Release of Prometastatic Platelet-Derived Microparticles Induced by Breast Cancer Cells: A Novel Positive Feedback Mechanism for Metastasis. TH Open. 1(2): e155–e163. 2017.
129. *Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., Reca R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z.* Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. Exp. Hematol. 30(5): 450–459. 2002.
130. *Janowska-Wieczorek A., Marquez-Curtis L.A., Wysoczynski M., Ratajczak M.Z.* Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. Transfusion. 46(7): 1199–1209. 2006.
131. *Dashevsky O., Varon D., Brill A.* Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. Int. J. Cancer. 124(8): 1773–1777. 2009.
132. *Gasperi V., Vangapandu C., Savini I., Ventimiglia G., Adorno G., Catani M.V.* Polyunsaturated fatty acids modulate the delivery of platelet microvesicle-derived microRNAs into human breast cancer cell lines. J. Nutr. Biochem. 74: 108242. 2019.
133. *Lee Y., El Andaloussi S., Wood M.J.* Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. Hum. Mol. Genet. 21(R1): R125–134. 2012.
134. *Wong L.L., Wang J., Liew O.W., Richards A.M., Chen Y.T.* MicroRNA and Heart Failure. Int. J. Mol. Sci. 17(4): 502. 2016.
135. *Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D.* Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA. 10(2): 185–191. 2004.
136. *Krol J., Loedige I., Filipowicz W.* The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat. Rev. Genet. 11(9): 597–610. 2010.
137. *Turchinovich A., Tonevitsky A.G., Burwinkel B.* Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. Trends Biochem. Sci. 41(10): 883–892. 2016.
138. *Landry P., Plante I., Ouellet D.L., Perron M.P., Rousseau G., Provost P.* Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. Nat. Struct. Mol. Biol. 16(9): 961–966. 2009.
139. *Tang M., Jiang L., Lin Y., Wu X., Wang K., He Q., Wang X., Li W.* Platelet microparticle-mediated transfer of miR-939 to epithelial ovarian cancer cells promotes epithelial to mesenchymal transition. Oncotarget. 8(57): 97464–97475. 2017.
140. *Liang H., Yan X., Pan Y., Wang Y., Wang N., Li L., Liu Y., Chen X., Zhang C.Y., Gu H., Zen K.* MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. Mol. Cancer. 14: 58. 2015.
141. *Pan B., Chen Y., Song H., Xu Y., Wang R., Chen L.* Mir-24-3p downregulation contributes to VP16-DDP resistance in small-cell lung cancer by targeting ATG4A. Oncotarget. 6(1): 317–331. 2015.
142. *Zhu H., Wu H., Liu X., Evans B.R., Medina D.J., Liu C.G., Yang J.M.* Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. Biochem. Pharmacol. 76(5): 582–588. 2008.
143. *Miao X., Rahman M.F., Jiang L., Min Y., Tan S., Xie H., Lee L., Wang M., Malmstrom R.E., Lui W.O., Li N.* Thrombin-reduced miR-27b attenuates platelet angiogenic activities in vitro via enhancing platelet synthesis of anti-angiogenic thrombospondin-1. J. Thromb. Haemost. 16(4): 791–801. 2018.

144. *Anene C., Graham A.M., Boyne J., Roberts W.* Platelet microparticle delivered microRNA-Let-7a promotes the angiogenic switch. Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1864(8): 2633–2643. 2018.
145. *Coupland L.A., Chong B.H., Parish C.R.* Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. Cancer Res. 72(18): 4662–4671. 2012.
146. *Jackson W., 3rd, Sosnoski D.M., Ohanessian S.E., Chandler P., Mobley A., Meisel K.D., Mastro A.M.* Role of Megakaryocytes in Breast Cancer Metastasis to Bone. Cancer Res. 77(8): 1942–1954. 2017.
147. *Wang Z., Huang H.* Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): an angiostatic chemokine for cancer therapy. Cancer Lett. 331(2): 147–153. 2013.
148. *Michael J.V., Wurtzel J.G.T., Mao G.F., Rao A.K., Kolpakov M.A., Sabri A., Hoffman N.E., Rajan S., Tomar D., Madesh M., Nieman M.T., Yu J., Edelstein L.C., Rowley J.W., Weyrich A.S., Goldfinger L.E.* Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. Blood. 130(5): 567–580. 2017.
149. *Cao L., Zhang X., Cao F., Wang Y., Shen Y., Yang C., Uzan G., Peng B., Zhang D.* Inhibiting inducible miR-223 further reduces viable cells in human cancer cell lines MCF-7 and PC3 treated by celastrol. BMC Cancer. 15: 873. 2015.
150. *Pinatel E.M., Orso F., Penna E., Cimino D., Elia A.R., Circosta P., Dentelli P., Brizzi M.F., Provero P., Taverna D.* miR-223 is a coordinator of breast cancer progression as revealed by bioinformatics predictions. PLoS One. 9(1): e84859. 2014.
151. *Sun X., Li Y., Zheng M., Zuo W., Zheng W.* MicroRNA-223 Increases the Sensitivity of Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Targeting HAX-1. PLoS One. 11(9): e0162754. 2016.
152. *Liu B., Peng X.C., Zheng X.L., Wang J., Qin Y.W.* MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. Lung Cancer. 66(2): 169–175. 2009.
153. *Shi L., Fisslthaler B., Zippel N., Fromel T., Hu J., Elgheznawy A., Heide H., Popp R., Fleming I.* MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting beta1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells. Circ. Res. 113(12): 1320–1330. 2013.
154. *Li N.* Platelets in cancer metastasis: To help the "villain" to do evil. Int. J. Cancer. 138(9): 2078–2087. 2016.
155. *Patrignani P., Patrono C.* Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. Biochim. Biophys. Acta. 1851(4): 422–432. 2015.
156. *Patrignani P., Patrono C.* Aspirin, platelet inhibition and cancer prevention. Platelets. 29(8): 779–785. 2018.
157. *Xu X.R., Yousef G.M., Ni H.* Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. Blood. 131(16): 1777–1789. 2018.
158. *Patrignani P., Tacconelli S., Piazuelo E., Di Francesco L., Dovizio M., Sostres C., Marcantoni E., Guillem-Llobat P., Del Boccio P., Zucchelli M., Patrono C., Lanas A.* Reappraisal of the clinical pharmacology of low-dose aspirin by comparing novel direct and traditional indirect biomarkers of drug action. J. Thromb. Haemost. 12(8): 1320–1330. 2014.
159. *Sostres C., Gargallo C.J., Lanas A.* Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther. 5(1): 40–49. 2014.
160. *Thun M.J., Jacobs E.J., Patrono C.* The role of aspirin in cancer prevention. Nat. Rev Clin. Oncol. 9(5): 259–267. 2012.
161. *Algra A.M., Rothwell P.M.* 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(5): 518–527. 2012.
162. *Rothwell P.M., Fowkes F.G., Belch J.F., Ogawa H., Warlow C.P., Meade T.W.* Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. Lancet. 377(9759): 31–41. 2011.
163. *Sandler R.S., Halabi S., Baron J.A., Budinger S., Paskett E., Keresztes R., Petrelli N., Pipas J.M., Karp D.D., Loprinzi C.L., Steinbach G., Schilsky R.* A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 348(10): 883–890. 2003.
164. *Baron J.A., Cole B.F., Sandler R.S., Haile R.W., Ahnen D., Bresalier R., McKeown-Eyssen G., Summers R.W., Rothstein R., Burke C.A., Snover D.C., Church T.R., Allen J.I., Beach M., Beck G.J., Bond J.H., Byers T., Greenberg E.R., Mandel J.S., Marcon N., Mott L.A., Pearson L., Saibil F., van Stolk R.U.* A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. N. Engl. J. Med. 348(10): 891–899. 2003.
165. *Hull M.A., Sprange K., Hepburn T., Tan W., Shafayat A., Rees C.J., Clifford G., Logan R.F., Loadman P.M., Williams E.A., Whitham D., Montgomery A.A., se A.C.G.* Eicosapentaenoic acid and aspirin, alone and in combination, for the prevention of colorectal adenomas (seAFOod Polyp Prevention trial): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, 2 × 2 factorial trial. Lancet. 392(10164): 2583–2594. 2018.
166. *Chan A.T., Ogino S., Fuchs C.S.* Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. N. Engl. J. Med. 356(21): 2131–2142. 2007.

167. *Jiang M.J., Dai J.J., Gu D.N., Huang Q., Tian L.* Aspirin in pancreatic cancer: chemopreventive effects and therapeutic potentials. Biochim. Biophys. Acta. 1866(2): 163–176. 2016.
168. *Ye X., Fu J., Yang Y., Gao Y., Liu L., Chen S.* Frequency-risk and duration-risk relationships between aspirin use and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 8(7): e71522. 2013.
169. *Vidal A.C., Howard L.E., Moreira D.M., Castro-Santamaria R., Andriole G.L., Freedland S.J.* Aspirin, NSAIDs, and risk of prostate cancer: results from the REDUCE study. Clin. Cancer Res. 21(4): 756–762. 2015.
170. *Lucotti S., Cerutti C., Soyer M., Gil-Bernabe A.M., Gomes A.L., Allen P.D., Smart S., Markelc B., Watson K., Armstrong P.C., Mitchell J.A., Warner T.D., Ridley A.J., Muschel R.J.* Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived COX-1/thromboxane A2. J. Clin. Invest. 129(5):1845-1862. 2019.
171. *Nguyen T.A., Diodati J.G., Pharand C.* Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. J. Am. Coll. Cardiol. 45(8): 1157–1164. 2005.
172. *Bambace N.M., Levis J.E., Holmes C.E.* The effect of P2Y-mediated platelet activation on the release of VEGF and endostatin from platelets. Platelets. 21(2): 85–93. 2010.
173. *Rodriguez-Miguel A., Garcia-Rodriguez L.A., Gil M., Montoya H., Rodriguez-Martin S., de Abajo F.J.* Clopidogrel and Low-Dose Aspirin, Alone or Together, Reduce Risk of Colorectal Cancer. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 17(10): 2024–2033 e2. 2019.
174. *Hicks B.M., Murray L.J., Hughes C., Cardwell C.R.* Clopidogrel use and cancer-specific mortality: a population-based cohort study of colorectal, breast and prostate cancer patients. Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 24(8): 830–840. 2015.
175. *Elmariah S., Doros G., Benavente O.R., Bhatt D.L., Connolly S.J., Yusuf S., Steinhubl S.R., Liu Y., Hsieh W.H., Yeh R.W., Mauri L.* Impact of Clopidogrel Therapy on Mortality and Cancer in Patients With Cardiovascular and Cerebrovascular Disease: A Patient-Level Meta-Analysis. Circ. Cardiovasc. Interv. 11(1): e005795. 2018.
176. *Serebruany V.L., Dinicolantonio J.J., Can M.M., Pershukov I.V., Kuliczkowski W.* Gastrointestinal adverse events after dual antiplatelet therapy: clopidogrel is safer than ticagrelor, but prasugrel data are lacking or inconclusive. Cardiology. 126(1): 35–40. 2013.
177. *Gresele P., Momi S., Malvestiti M., Sebastiano M.* Platelet-targeted pharmacologic treatments as anti-cancer therapy. Cancer Metastasis Rev. 36(2): 331–355. 2017.
178. *Kotronias R.A., Kwok C.S., Wong C.W., Kinnaird T., Zaman A., Mamas M.A.* Cancer Event Rate and Mortality with Thienopyridines: A Systematic Review and Meta-Analysis. Drug Saf. 40(3): 229–240. 2017.
179. *Leader A., Zelikson-Saporta R., Pereg D., Spectre G., Rozovski U., Raanani P., Hermoni D., Lishner M.* The Effect of Combined Aspirin and Clopidogrel Treatment on Cancer Incidence. Am. J. Med. 130(7): 826–832. 2017.
180. *Durrant T.N., van den Bosch M.T., Hers I.* Integrin alphaIIbbeta3 outside-in signaling. Blood. 130(14): 1607–1619. 2017.
181. *Lavergne M., Janus-Bell E., Schaff M., Gachet C., Mangin P.H.* Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? Cancers (Basel). 9(10): 1–17. 2017.
182. *Amirkhosravi A., Mousa S.A., Amaya M., Blaydes S., Desai H., Meyer T., Francis J.L.* Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. Thromb. Haemost. 90(3): 549–554. 2003.
183. *Zhang W., Dang S., Hong T., Tang J., Fan J., Bu D., Sun Y., Wang Z., Wisniewski T.* A humanized single-chain antibody against beta 3 integrin inhibits pulmonary metastasis by preferentially fragmenting activated platelets in the tumor microenvironment. Blood. 120(14): 2889–2898. 2012.
184. *Chew D.P., Bhatt D.L., Sapp S., Topol E.J.* Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. Circulation. 103(2): 201–206. 2001.
185. *Schwarz M., Meade G., Stoll P., Ylanne J., Bassler N., Chen Y.C., Hagemeyer C.E., Ahrens I., Moran N., Kenny D., Fitzgerald D., Bode C., Peter K.* Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. Circ. Res. 99(1): 25–33. 2006.
186. *Li J., Vootukuri S., Shang Y., Negri A., Jiang J.K., Nedelman M., Diacovo T.G., Filizola M., Thomas C.J., Coller B.S.* RUC-4: a novel alphaIIbbeta3 antagonist for prehospital therapy of myocardial infarction. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 34(10): 2321–2329. 2014.
187. *Gieseler F., Ungefroren H., Settmacher U., Hollenberg M.D., Kaufmann R.* Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. Cell Commun. Signal. 11: 86. 2013.
188. *Wojtukiewicz M.Z., Hempel D., Sierko E., Tucker S.C., Honn K.V.* Protease-activated receptors (PARs)–biology and role in cancer invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 34(4): 775–796. 2015.
189. *Posma J.J., Posthuma J.J., Spronk H.M.* Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. J. Thromb. Haemost. 14(10): 1908–1916. 2016.

190. *Liu X., Yu J., Song S., Yue X., Li Q.* Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer. Oncotarget. 8(63): 107334–107345. 2017.
191. *Wojtukiewicz M.Z., Hempel D., Sierko E., Tucker S.C., Honn K.V.* Endothelial Protein C Receptor (EPCR), Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) and Their Interplay in Cancer Growth and Metastatic Dissemination. Cancers (Basel). 11(1): 1–18. 2019.
192. *Chanakira A., Westmark P.R., Ong I.M., Sheehan J.P.* Tissue factor-factor VIIa complex triggers protease activated receptor 2-dependent growth factor release and migration in ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 145(1): 167–175. 2017.
193. *Covic L., Kuliopulos A.* Protease-Activated Receptor 1 as Therapeutic Target in Breast, Lung, and Ovarian Cancer: Pepducin Approach. Int. J. Mol. Sci. 19(8): 1–16. 2018.
194. *Goto S., Ogawa H., Takeuchi M., Flather M.D., Bhatt D.L., Investigators J.L.* Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. Eur. Heart J. 31(21): 2601–2613. 2010.
195. *Sun J., Du Y., Zhang X., Wang Z., Lin Y., Song Q., Wang X., Guo J., Li S., Nan J., Yang J.* Discovery and evaluation of Atopaxar hydrobromide, a novel JAK1 and JAK2 inhibitor, selectively induces apoptosis of cancer cells with constitutively activated STAT3. Invest. New Drugs.38(4): 1003–1011. 2019.
196. *Gresele P., Momi S., Falcinelli E.* Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. Br. J. Clin. Pharmacol. 72(4): 634–646. 2011.
197. *Rhodes E.L., Misch K.J., Edwards J.M., Jarrett P.E.* Dipyridamole for treatment of melanoma. Lancet. 1(8430): 655–712. 1985.
198. *Todd K.E., Gloor B., Lane J.S., Isacoff W.H., Reber H.A.* Resection of locally advanced pancreatic cancer after downstaging with continuous-infusion 5-fluorouracil, mitomycin-C, leucovorin, and dipyridamole. J. Gastrointest. Surg. 2(2): 159–166. 1998.
199. *New M.L., White C.M., McGonigle P., McArthur D.G., Dwyer-Nield L.D., Merrick D.T., Keith R.L., Tennis M.A.* Prostacyclin and EMT Pathway Markers for Monitoring Response to Lung Cancer Chemoprevention. Cancer Prev. Res. (Phila). 11(10): 643–654. 2018.
200. *Keith R.L., Blatchford P.J., Kittelson J., Minna J.D., Kelly K., Massion P.P., Franklin W.A., Mao J., Wilson D.O., Merrick D.T., Hirsch F.R., Kennedy T.C., Bunn P.A., Jr., Geraci M.W., Miller Y.E.* Oral iloprost improves endobronchial dysplasia in former smokers. Cancer Prev. Res. (Phila). 4(6): 793–802. 2011.
201. *Dwyer-Nield L., Hickey G.A., Friedman M., Choo K., McArthur D.G., Tennis M.A., New M.L., Geraci M., Keith R.L.* The Second-Generation PGI2 Analogue Treprostinil Fails to Chemoprevent Tumors in a Murine Lung Adenocarcinoma Model. Cancer Prev. Res. (Phila). 10(11): 671–679. 2017.
202. *Sarkar S., Alam M.A., Shaw J., Dasgupta A.K.* Drug delivery using platelet cancer cell interaction. Pharm. Res. 30(11): 2785–2794. 2013.
203. *Cagel M., Grotz E., Bernabeu E., Moretton M.A., Chiappetta D.A.* Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. Drug Discov. Today. 22(2): 270–281. 2017.
204. *Xu P., Zuo H., Zhou R., Wang F., Liu X., Ouyang J., Chen B.* Doxorubicin-loaded platelets conjugated with anti-CD22 mAbs: a novel targeted delivery system for lymphoma treatment with cardiopulmonary avoidance. Oncotarget. 8(35): 58322–58337. 2017.
205. *Li J., Sharkey C.C., Wun B., Liesveld J.L., King M.R.* Genetic engineering of platelets to neutralize circulating tumor cells. J. Control. Release. 228: 38–47. 2016.
206. *Du Y., Chen B.* Combination of drugs and carriers in drug delivery technology and its development. Drug. Des Devel. Ther. 13: 1401–1408. 2019.
207. *Hu Q., Sun W., Qian C., Wang C., Bomba H.N., Gu Z.* Anticancer Platelet-Mimicking Nanovehicles. Adv. Mater. 27(44): 7043–7050. 2015.
208. *Shang Y., Wang Q., Wu B., Zhao Q., Li J., Huang X., Chen W., Gui R.* Platelet-Membrane-Camouflaged Black Phosphorus Quantum Dots Enhance Anticancer Effect Mediated by Apoptosis and Autophagy. ACS Appl. Mate.r Interfaces. 11(31): 28254–28266. 2019.
209. *Kim M.W., Lee G., Niidome T., Komohara Y., Lee R., Park Y.I.* Platelet-Like Gold Nanostars for Cancer Therapy: The Ability to Treat Cancer and Evade Immune Reactions. Front. Bioeng. Biotechnol. 8(133): 1–11. 2020.
210. *Kailashiya J., Gupta V., Dash D.* Engineered human platelet-derived microparticles as natural vectors for targeted drug delivery. Oncotarget. 10(56): 5835–5846. 2019.
211. *Wu M., Le W., Mei T., Wang Y., Chen B., Liu Z., Xue C.* Cell membrane camouflaged nanoparticles: a new biomimetic platform for cancer photothermal therapy. Int. J. Nanomed. 14: 4431–4448. 2019.
212. *Klement G.L., Yip T.T., Cassiola F., Kikuchi L., Cervi D., Podust V., Italiano J.E., Wheatley E., Abou-Slaybi A., Bender E., Almog N., Kieran M.W., Folkman J.* Platelets actively sequester angiogenesis regulators. Blood. 113(12): 2835–2842. 2009.
213. *Nilsson R.J., Balaj L., Hulleman E., van Rijn S., Pegtel D.M., Walraven M., Widmark A., Gerritsen W.R., Verheul H.M., Vandertop W.P., Noske D.P., Skog J., Wurdinger T.* Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. Blood. 118(13): 3680–3683. 2011.

214. *Calverley D.C., Phang T.L., Choudhury Q.G., Gao B., Oton A.B., Weyant M.J., Geraci M.W.* Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. Clin. Transl. Sci. 3(5): 227–232. 2010.
215. *Dovizio M., Bruno A., Contursi A., Grande R., Patrignani P.* Platelets and extracellular vesicles in cancer: diagnostic and therapeutic implications. Cancer Metastasis Rev. 37(2–3): 455–467. 2018.
216. *Best M.G., Sol N., Kooi I., Tannous J., Westerman B.A., Rustenburg F., Schellen P., Verschueren H., Post E., Koster J., Ylstra B., Ameziane N., Dorsman J., Smit E.F., Verheul H.M., Noske D.P., Reijneveld J.C., Nilsson R.J.A., Tannous B.A., Wesseling P., Wurdinger T.* RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. Cancer Cell. 28(5): 666–676. 2015.
217. *Mege D., Panicot-Dubois L., Ouaissi M., Robert S., Sielezneff I., Sastre B., Dignat-George F., Dubois C.* The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. Int. J. Cancer. 138(4): 939–948. 2016.
218. *Wang C.C., Tseng C.C., Chang H.C., Huang K.T., Fang W.F., Chen Y.M., Yang C.T., Hsiao C.C., Lin M.C., Ho C.K., Yip H.K.* Circulating microparticles are prognostic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients. Oncotarget. 8(44): 75952–75967. 2017.
219. *Sudhakar A.* History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. J. Cancer Sci. Ther. 1(2): 1–4. 2009.
220. *Wu T., Dai Y.* Tumor microenvironment and therapeutic response. Cancer Lett. 387: 61–68. 2017

Platelets in Cancer Deseases

V. S. Shpakova[a], * and S. P. Gambaryan[a]

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

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

Platelets play a crucial role in hemostasis, participate in immune response, inflammation, angiogenesis and tissue regeneration. On the other hand, platelets can actively participate in different pathological processes including tumorigenesis. Platelets can directly interact with cancer cells in circulation and contribute to metastasis, tumor angiogenesis and outgrowth. During the last few decades a large amount of data concerning platelet engagement in cancer progression was accumulated. These data require thorough analysis and systematization in view of the fact that even though platelets can be involved in cancer development and metastasis due to their physiological characteristics their role can be exaggerated. In this review, interplay between platelets and cancer is discussed. In addition, we provide an insight into platelet-targeted pharmacologic approaches to cancer treatment and their limitations, as well as the potential role of platelets and platelet microparticles in innovative therapeutic approaches.

Keywords: platelets, cancer, anticancer therapy, thrombocytosis, tumor angiogenesis, antiplatelet therapy, microparticles

ЦИТИРОВАТЬ:

Шпакова В.С., Гамбарян С.П. Роль тромбоцитов в онкологических заболеваниях. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1209–1237.

DOI: 10.31857/S0869813920100106

TO CITE THIS ARTICLE:

Shpakova V.S., Gambaryan S.P. Platelets in Cancer Deseases. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1209–1237.

DOI: 10.31857/S0869813920100106

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1238–1250

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОГО И МЕЛАНОКОРТИНОВОГО ОЖИРЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ 2 В НЕЙРОНАХ СРЕДНЕГО МОЗГА И ГИПОТАЛАМУСА МЫШЕЙ

© 2020 г.
Е. В. Михайлова[1], Д. Л. Свиридова[1], И. В. Романова[1, *], К. В. Деркач[1], А. О. Шпаков[1]

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

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

Поступила в редакцию 31.03.2020 г.
После доработки 01.05.2020 г.
Принята к публикации 30.05.2020 г.

Серотониновая система мозга играет ключевую роль не только в регуляции поведения и когнитивных функций, но и в контроле пищевого поведения и энергетического обмена. В это вовлечены серотонинергические нейроны среднего мозга, экспрессирующие фермент триптофангидроксилазу 2-го типа (ТПГ-2), катализирующую синтез серотонина, и гипоталамические нейроны, экспрессируюшие серотониновые рецепторы. В настоящее время изменения экспрессии и распределения ТПГ-2 в нейронах среднего мозга при ожирении остаются мало изученными. Наряду с этим предполагается, что серотонин может синтезироваться и в гипоталамических нейронах, оказывая влияние на серотониновую систему гипоталамуса, но данные об экспрессии и возможной локализации ТПГ-2 в гипоталамических нейронах отсутствуют. Целью работы было изучение экспрессии ТПГ-2 в среднем мозге и ее распределение в нейронах аркуатных, паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса у мышей с диета-индуцированным ожирением (ДИО) и у агути-мышей с генетически-обусловленным ожирением меланокортинового типа. В гипоталамусе мышей C57Bl/6J выявлена экспрессия гена ТПГ-2 и с помощью двойного иммуномечения впервые показана локализация фермента в иммунопозитивных к проопиомеланокортину (ПОМК) нейронах аркуатных ядер и в иммунопозитивных к вазопрессину нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер. При обоих типах ожирения количество ТПГ-2-иммунопозитивных гранул в ПОМК- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах повышалось, хотя экспрессия гена *Tph2* повышалась только у агути-мышей. В среднем мозге ДИО-мышей содержание ТПГ-2 снижалось, в то время как у агути-мышей оно не менялось. Эти результаты свидетельствуют о важной роли синтезируемого в гипоталамусе серотонина, который совместно с серотонином, поступающим из среднего мозга, вовлечен в компенсаторные изменения гипоталамического сигналинга при ожирении. Обнаружение ТПГ-2-иммунопозитивных гипоталамических нейронов различной эргичности, способных синтезировать серотонин, указывает на существование новых механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции в гипоталамусе, в том числе при ожирении.

Ключевые слова: серотонин, триптофангидроксилаза-2, средний мозг, гипоталамус, диета-индуцированное ожирение, агути-мыши

DOI: 10.31857/S0869813920100064

Нейротрансмиттер серотонин в мозге человека, обезьян и грызунов синтезируется преимущественно в среднем мозге, в том числе в серотонинергических нейронах ядер шва B7 и B8 (dorsal and median raphe nuclei, DRN and MRN), которые посылают проекции в гипоталамус [1–4]. В дальнейшем по отросткам этих серотонинергических нейронов серотонин поступает в соседние области мозга, включая гипоталамические ядра, где специфически связывается с расположенными там серотониновыми рецепторами и осуществляет регуляцию таких процессов, как нейрональная пластичность, память, пищевое поведение, углеводный и липидный обмен, а также контролирует функции сердечно-сосудистой системы [5–8]. Синтез серотонина в ЦНС осуществляется с помощью фермента – триптофангидроксилазы 2-го типа (ТПГ-2), которая катализирует превращение 5-гидрокситриптофана в серотонин (скорость-лимитирующая стадия синтеза серотонина) и потому является основным маркером серотонинергических нейронов мозга [9, 10]. Показана положительная корреляция между интенсивностью синтеза серотонина в нейронах и уровнем в них экспрессии и активности ТПГ-2 [11, 12].

Серотониновая система мозга, а также различные отделы гипоталамуса играют определяющую роль в контроле пищевого поведения и энергетического обмена и претерпевают значительные изменения в условиях метаболических расстройств – ожирения и метаболического синдрома. Вследствие этого значительный интерес представляет сравнительное изучение активности системы синтеза серотонина в среднем мозге и гипоталамусе, а также интегративных взаимосвязей между серотонинергическими нейронами среднего мозга и нейронами аркуатного, паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса в норме и при различных метаболических расстройствах. Несмотря на значительное число работ, посвященных функциональным изменениям серотониновой системы при ожирении и метаболическом синдроме, их влияние на экспрессию гена и белка для ТПГ-2 в среднем мозге мало изучено [13]. В отношении распределения ТПГ-2 в гипоталамических структурах имеется только одна работа, в которой с помощью иммуногистохимического подхода показано наличие ТПГ-2-иммунопозитивных гранул в латеральном гипоталамусе, но при этом неясно, являются ли иммунопозитивные структуры окончаниями отростков серотонинергических нейронов, приходящих из среднего мозга, или они соответствуют экспрессирующим ТПГ-2 гипоталамическим нейронам различной эргичности [14]. Следует отметить, что вопрос об источниках серотонина в гипоталамусе и о возможности его синтеза серотонина в гипоталамических нейронах de novo остается открытым.

Целью работы было изучение экспрессии ТПГ-2 в среднем мозге и распределение ТПГ-2 в нейронах аркуатных, паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса у мышей с диета-индуцированным ожирением (ДИО) и у агути-мышей с ожирением меланокортинового типа. Для исследования были выбраны два типа ожирения, различающихся по этиологии и патогенезу – ожирение у мышей линии C57Bl/6J (*a/a*), индуцированное комбинированной высокожировой и высокоуглеводной диетой, сходное с абдоминальным ожирением у человека [13], и генетически-обусловленное ожирение у агути-мышей, вызванное мутацией в локусе *agouti* (*Ay/a*), результатом которой является повышенная экспрессии агути-сигнального пептида, эндогенного ингибитора меланокортиновых рецепторов, опосредующих анорексигенные эффекты α-меланоцитстимулирующего гормона [15]. Для мечения нейронов в аркуатных ядрах гипоталамуса использовали антитела к проопиомеланокортину (ПОМК), прекурсору анорексигенных пептидов меланокортинового семейства, который интенсивно экспрессируется в этой области гипоталамуса [15, 16]. Для иммуномечения нейронов в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса, где локализованы тела вазопрессин-иммунопозитивных нейронов (нейросекреторных клеток), использовали антитела к вазопрессину [17].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все эксперименты проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive (2010/63/EEC) и правилами, изложенными в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. На проведение экспериментов получено разрешение Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН.

В экспериментах использовали виргинных самок мышей C57Bl/6J (*a/a*) и самок агути-мышей C57Bl/6J (*Ay/a*), генетически предрасположенных к ожирению. Возраст животных в начале эксперимента во всех группах составил четыре месяца. Мыши C57Bl/6J (*a/a*) были получены из питомника Рапполово (Ленинградская область, Россия), агути-мыши – из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). После двух недель адаптации мыши C57Bl/6J (*a/a*) были разделены на две группы – контроль, который содержали на стандартном сухом корме (контроль-1), и ДИО-мыши, которые получали высококалорийную диету в течение 16 недель (группа ДИО). Высококалорийная диета включала животный жир, обогащенный насыщенными жирными кислотами (свиное сало), и 30%-ный раствор сахарозы, который животным давали вместо питьевой воды. Агути-мыши (*Ay/a*) и контрольные для них мыши C57Bl/6J генотипа *a/a* того же возраста (контроль-2) содержались на стандартной диете.

Уровни инсулина и лептина в крови, взятой из сердца животных в конце эксперимента, определяли с помощью наборов Mouse Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция) и ELISA Kit for Leptin (Cloud-Clone Corp., США). Уровень глюкозы в крови после ее забора из хвостовой вены измеряли с помощью глюкометра Life Scan Johnson & Johnson (Дания) и тест-полосок One Touch Ultra (США). Нагрузку глюкозой осуществляли из расчета 2 г/кг массы тела животного после шестичасового голодания, и оценивали уровень глюкозы через 120 мин после нагрузки, как описано ранее [18].

Для изучения оценки экспрессии гена *Tph2*, кодирующего ТПГ-2 (NM_173391.3), в гипоталамусе и среднем мозге использовали ПЦР в реальном времени, сопряженную с обратной транскрипцией (ОТ), для приготовления которой использовали 1 мкг общей РНК и набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Протокол реакции и используемые реактивы были описаны ранее [15]. Амплификацию осуществляли в 96-луночных планшетах в смеси (25 мкл), содержащей 10 нг ОТ-продукта из ткани среднего мозга или 20 нг ОТ-продукта из ткани гипоталамуса, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реакционной смеси с красителем SYBR Green и референсным красителем ROX (qPCRmix-HS SYBR + LowROX, Евроген, Россия). Каждую пробу повторяли 3 раза. Для определения экспрессии гена *Tph2* использовали праймеры, синтезированные фирмой Evrogen (Россия) – CAATCGAGTTCGGCCTTTGC (For) и GCGTCCTGAAAGGTGGTGAT (Rev). В качестве референсных использовали ген *Hprt1* (KR817915), кодирующий гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу – AGCCGACCGGTTCTGTCAT (For) и GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC (Rev), а также ген *18s* рибосомальной РНК (NR_003278) – GGGAGCCTGAGAAACGGC (For) и GGGTCGGGAGTGGGTAATTT (Rev). Амплификационный сигнал детектировали с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies ABI, США). Количественный анализ относительного уровня мРНК проводили с помощью метода delta-delta Ct.

Концентрацию серотонина (5-HT) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в гипоталамусе мышей *Ay/a* с ожирением и контрольных для

них мышей генотипа *a/a* определяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [19]. Хроматографическая система включала инжектор Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл, колонку Phenomenex (250.0 × 4.6 мм) с сорбентом Sphere Clone 5 u ODS(2) и амперометрический детектор LC-4C BAS. Определение концентраций исследуемых веществ проводили при потенциале +0.70 В. Подвижная фаза включала 5.5 мМ цитратно-фосфатного буфера, содержащего 0.7 мМ октансульфоновой кислоты, 0.5 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (pH 3.0). Скорость элюции подвижной фазы составила 1 мл/мин, время анализа одной пробы – около 20 мин. Результаты представлены в процентах относительно контрольного, принятого за 100%, уровня серотонина и 5-ГИУК в гипоталамусе мышей генотипа *a/a*.

Для иммуногистохимических исследований ($n = 4$ в каждой группе) мышей анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг, в/б), транскардиально перфузировали 0.1 М Na^+-фосфатным буфером (PB, pH 7.4) и раствором 4%-ного параформальдегида в 0.2 М PB. Мозг дофиксировали в течение ночи в том же фиксаторе (4°C), для криопротекции помещали в 30%-ный раствор сахарозы в 0.02 М PB с 0.9% NaCl (PBS, pH 7.4) и через 3 суток замораживали с помощью изопентана при –42°C. Из области гипоталамуса были приготовлены фронтальные срезы мозга толщиной 16 мкм с помощью криостата Leica CM-1510 (Leica, Германия), которые монтировали на стеклах. На срезах мозга контрольных мышей (контроль-1 и контроль-2), ДИО-мышей и агути-мышей (*Ay/a*) проводили двойное флуоресцентное иммуномечение, для чего использовали ранее разработанный протокол [15]. Для блокировки неспецифического связывания перед нанесением блокирующего раствора проводили преинкубацию в течение 30 мин в 100 мМ растворе глицина, разведенного в PBS. Для реакции использовали смесь первичных антител кролика к ТПГ-2 (Millipore Corp., США; 1 : 500) с антителами мыши к ПОМК (Abcam, Великобритания; 1 : 1000) или вазопрессину (антитела любезно предоставлены профессором Harold Gainer, NIH, США; 1 : 1000). Также использовали смесь вторичных антител (Invitrogen, США; 1 : 1000), конъюгированных с различными флуорохромами – цыпленка против Ig кролика – Alexa-488 и осла против Ig мыши – Alexa-568. После промывки в PBS срезы инкубировали в течение 2 мин с красителем DAPI (Sigma, США; 1 : 2000), промывали, заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при 4°C до ее полимеризации. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первичных или вторичных антител).

Анализ флуоресцентного иммуномечения проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия). Последовательное сканирование проводили с помощью иммерсионного объектива x63, лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Съемку структур соответствующей контрольной и экспериментальной групп производили парами при одинаковых установках при максимальной интенсивности свечения по Z-позиции.

Интенсивность свечения ТПГ-2 в нейронах анализировали количественно с помощью пакета программ Leica LAS AF. Для анализа выбирали нейроны, в которых область, где локализовано ядро, располагалась в центре и была окружена перикарионом. Значения интенсивности свечения нормировали по их значениям в контроле. Изображения с DAPI анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A1 с флуоресцентной установкой (HB-100) (Carl Zeiss, Германия), что было необходимо для подтверждения локализации ТПГ-2 в перикарионе исследуемых нейронов.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Оценку нормальности распределения

Таблица 1. Масса тела, уровни глюкозы, инсулина и лептина у мышей с различными моделями ожирения в сравнении с контрольными животными
Table 1. The body weight and the glucose, insulin and leptin levels in mice with different models of obesity as compared to control animals

Показатель Indicators	Контроль-1, C57Bl/6J, $n = 10$ Control-1, C57Bl/6J	ДИО-мыши, C57Bl/6J, $n = 10$ DIO mice, C57Bl/6J	Контроль-2, C57Bl/6J, $n = 11$ Control-2, C57Bl/6J	Агути-мыши C57Bl/6J (*Ay/a*), $n = 11$ Agouti mice, C57Bl/6J (*Ay/a*)
Масса тела, г Body weight, g	19.8 ± 0.7	24.4 ± 0.9[a]	20.3 ± 1.0	38.8 ± 1.7[b]
Глюкоза, мМ* Glucose, mM*	4.8 ± 0.4	6.7 ± 0.6[a]	4.9 ± 0.5	11.2 ± 1.4[b]
Глюкоза (120 мин), мМ** Glucose (120 min), mM**	4.9 ± 0.6	7.4 ± 0.4[a]	4.9 ± 0.5	12.8 ± 1.3[b]
Инсулин, нг/мл Insulin, ng/mL	0.36 ± 0.07	0.59 ± 0.07[a]	0.31 ± 0.09	1.11 ± 0.22[b]
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	1.09 ± 0.21	2.43 ± 0.43[a]	1.18 ± 0.17	12.97 ± 0.95[b]

* – уровень постпрандиальной глюкозы, ** – уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки (2 г глюкозы на 1 кг массы тела).

Все значения представлены как $M \pm SD$. [a] – различия между контролем-1 и ДИО-мышами статистически значимы при $p < 0.05$; [b] – различия между контролем 2 и агути-мышами с генотипом *Ay/a* статистически значимы при $p < 0.05$.

* – the postprandial glucose level, ** – the glucose level 120 min after glucose loading (2 g/glucose per kg of body weight).

All values are presented as the $M \pm SD$. [a] – the differences between control-1 and DIO mice are significant at $p < 0.05$; [b] – the differences between control-2 and agouti mice with the *Ay/a* genotype are significant at $p < 0.05$.

данных проводили с использованием теста D'Agostino–Pearson. В случае нормального распределения ($\alpha = 0.05$) различия между группами результатов метаболических, биохимических и ПЦР-анализа оценивали с помощью непарного *t*-теста, а результатов иммуногистохимических исследований оценивали с помощью парного *t*-теста. Различия считали статистически значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У ДИО- и агути-мышей имелись отчетливо выраженное ожирение, постпрандиальная гипергликемия, гиперинсулинемия и гиперлептинемия, что указывает на развитие у них метаболического синдрома с характерными для него нарушенной толерантностью к глюкозе и инсулиновой резистентностью (табл. 1). При этом метаболические нарушения у агути-мышей с генотипом *Ay/a* были выражены в значительно большей степени, чем у ДИО-мышей.

С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что экспрессия гена *Tph2* в среднем мозге ДИО-мышей ($n = 6$) достоверно снижается по сравнению с контрольной группой ($n = 6$), в то время как в гипоталамусе экспрессия этого гена при ДИО не менялась (рис. 1*A*). У агути-мышей (*Ay/a*, $n = 7$) не было выявлено изменений экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге по сравнению с соответствующим контролем ($n = 7$), в то время как его экспрессия в гипоталамусе повышалась (рис. 1*B*).

Эти данные указывают на различия в экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге и гипоталамусе мышей с различными типами ожирения. Поскольку ТПГ-2 является основным ферментом синтеза серотонина в ядрах шва и других отделах мозга [10],

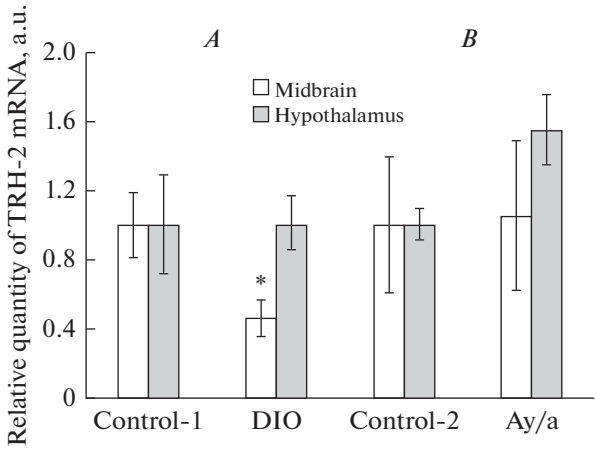


Рис. 1. Экспрессия гена *Tph2* в среднем мозге и гипоталамусе мышей C57BL/6J с диета-индуцированным ожирением (ДИО) (*A*) и мышей Agouti yellow (*Ay/a*) с меланокортиновым типом ожирения (*B*) по сравнению с соответствующими контрольными группами. * – достоверность отличий ($p < 0.05$).

Fig. 1. The expression of the *Trh2* gene in the midbrain and hypothalamus of C57BL/6J mice with diet-induced obesity (DIO) (*A*) and Agouti yellow (*Ay/a*) mice with the melanocortin type of obesity (*B*) as compared with the corresponding control groups. * – the difference is significance at the $p < 0.05$.

то имеются основания полагать, что выявленные изменения экспрессии гена *Tph2* будут коррелировать с изменениями уровня серотонина, который играет ключевую роль в контроле пищевого поведения и энергетического баланса. Для проверки этого с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ были оценены уровни серотонина и его основного метаболита 5-ГИУК в гипоталамусе агути-мышей. Показано, что как уровень серотонина, так и 5-ГИУК, в гипоталамусе агути-мышей ($n = 7$) были повышены в сравнении с контрольной группой ($n = 7$) при отсутствии значимых изменений в соотношении 5-ГИУК/5-НТ (рис. 2). Результаты количественного анализа уровня серотонина в гипоталамусе агути-мышей хорошо коррелирует с изменениями в этой области мозга экспрессии гена, кодирующего ТПГ-2.

Другими авторами при изучении овариэктомированных обезьян *Callithrix jacchus* из семейства игрунковых, находящихся на высокожировой диете, было показано небольшое снижение базального уровня экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге и полное отсутствие в отличие от животных, находящихся на низкокалорийной диете, стимулирующего эффекта на нее эстрогенов, важнейших активаторов экспрессии гена *Tph2* в ЦНС [20]. У японских макак, которые родились от матерей, находящихся на высокожировой диете, вне зависимости от того, находились ли они в дальнейшем, после молочного вскармливания, на нормальной или на высокожировой диете, отмечали достоверное снижение экспрессии гена *Tph2* в дорсальном ядре шва. Парадоксально, но у обезьян, родившихся от матерей, находящихся на нормальной диете и при этом получавших высокожировую диету, уровень экспрессии гена *Tph2* в этой области среднего мозга имел тенденцию к снижению, но статистически значимо от контрольной группы не отличался [21].

При изучении влияния ДИО на уровни ТПГ-2 у грызунов были получены следующие результаты. В мозге мышей, которые на протяжении семи недель получали высокожировую диету, экспрессия гена *Tph2* сохранялась на уровне, близком к таковому в контроле [22]. Содержание белка ТПГ-2 в ядре шва у крыс с ожирением, вызванным семинедельной высококалорийной диетой, статистически значимо

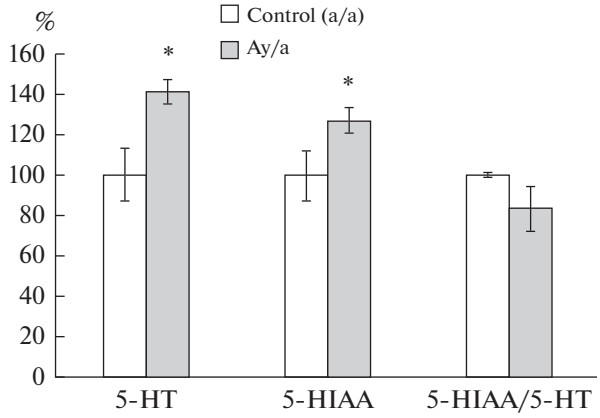


Рис. 2. Оцениваемое с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ содержание серотонина (5-HT) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-HIAA), а также их соотношение в гипоталамусе агути-мышей (*Ay/a*) с меланокортиновым ожирением в сравнении с контрольными мышами (*a/a*) того же возраста.

Данные представлены в процентах от контроля, * – достоверность различий между агути-мышами и контрольной группой ($p < 0.05$).

Fig. 2. The content of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), as well as their ratio in the hypothalamus of agouti mice (*Ay/a*) with the melanocortin obesity as compared to control mice (*a/a*) of the same age, estimated using reverse-phase HPLC.

The data are presented as a percentage of control, * – the difference between agouti mice and control group is significant at the $p < 0.05$.

также не отличалось от такового в контроле [23]. Следует, однако, отметить, что в обеих работах исследовали либо мозг в целом [22], либо только дорсальное и медианное ядра шва [23], в то время как мы изучали средний мозг. Необходимо обратить внимание на то, что содержание ТПГ-2 в дорсальном и медианном ядрах шва у обезьян в условиях нарушенного питания матерей менялось разнонаправленно – в дорсальном ядре шва оно снижалось, а в медианном ядре возрастало [21]. Выявленные нами различия между ДИО-мышами и агути-мышами в отношении изменений экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге могут быть обусловлены тем, что в случае ДИО изменения являются результатом компенсаторной реакции уже сформированной серотонинергической системы мозга на избыточное потребление калорий, направленной на снижение гиперфагии. В случае же агути-мышей с генетически детерминированным меланокортиновым типом ожирения эти компенсаторные изменения могли произойти еще в раннем онтогенезе, что, как мы полагаем, и обусловливает нормальные значения экспрессии ТПГ-2 и синтеза серотонина в среднем мозге.

Обнаружение экспрессии гена, кодирующего ТПГ-2 в гипоталамусе, хотя и существенно менее выраженной в сравнении со средним мозгом, поставило перед нами задачу идентифицировать нейроны, экспрессирующие этот фермент в структурах гипоталамуса. Имеющиеся сведения о наличии активности ТПГ-2 и присутствии иммунопозитивных к этому ферменту гранул в гипоталамусе не позволяют ответить на вопрос – является ли это результатом локализации ТПГ-2 в отростках и окончаниях серотонинергических нейронов среднего мозга или это указывает на присутствие в гипоталамусе нейронов различной эргичности, способных экспрессировать ТПГ-2 [24, 14]. Нами с помощью двойного иммуномечения было впервые

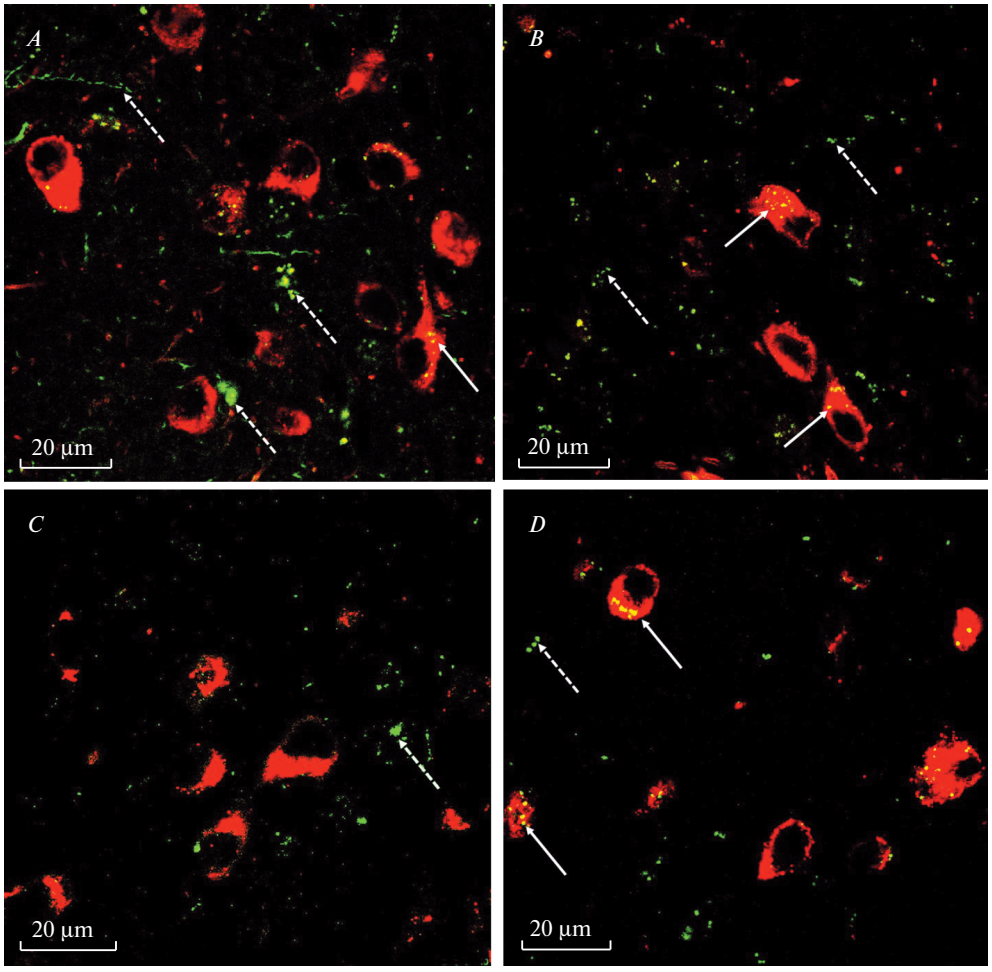


Рис. 3. Двойная иммуногистохимическая реакция к триптофангидроксилазе-2 и проопиомеланокортину в аркуатных ядрах гипоталамуса мышей.

A – контроль-1; *B* – ДИО; *C* – контроль-2; *D* – агути-мыши с генотипом *Ay/a*.

Представлено иммуномечение ТПГ-2 (*зеленый)* и ПОМК (*красный*). Сплошными стрелками отмечены иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в телах ПОМК-иммунопозитивных нейронов, прерывистыми стрелками – иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в других структурах аркуатных ядер. Масштаб – 20 мкм.

Fig. 3. Double immunohistochemical reaction to tryptophan hydroxylase-2 and proopiomelanocortin (POMC) in the arcuate nuclei of the mice hypothalamus.

A – control-1; *B* – DIO; *C* – control-2; *D* – agouti mice with the *Ay/a* genotype.

The immunolabeling of TRH-2 (*green*) and POMC (*red*) is presented. The solid arrows indicate the immunopositive granules for TRH-2 in the POMC-immunopositive neurons, and the dashed arrows indicate the immunopositive granules for TPH-2 in the other structures of the arcuate nuclei. The scale bars – 20 μm.

показано, что во всех изученных группах мышей в аркуатных ядрах гипоталамуса имелись иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы, в том числе локализованные в телах ПОМК-иммунопозитивных нейронов (рис. 3). В паравентрикулярных ядрах также отмечали ТПГ-2-иммунопозитивные гранулы, часть которых была расположена в

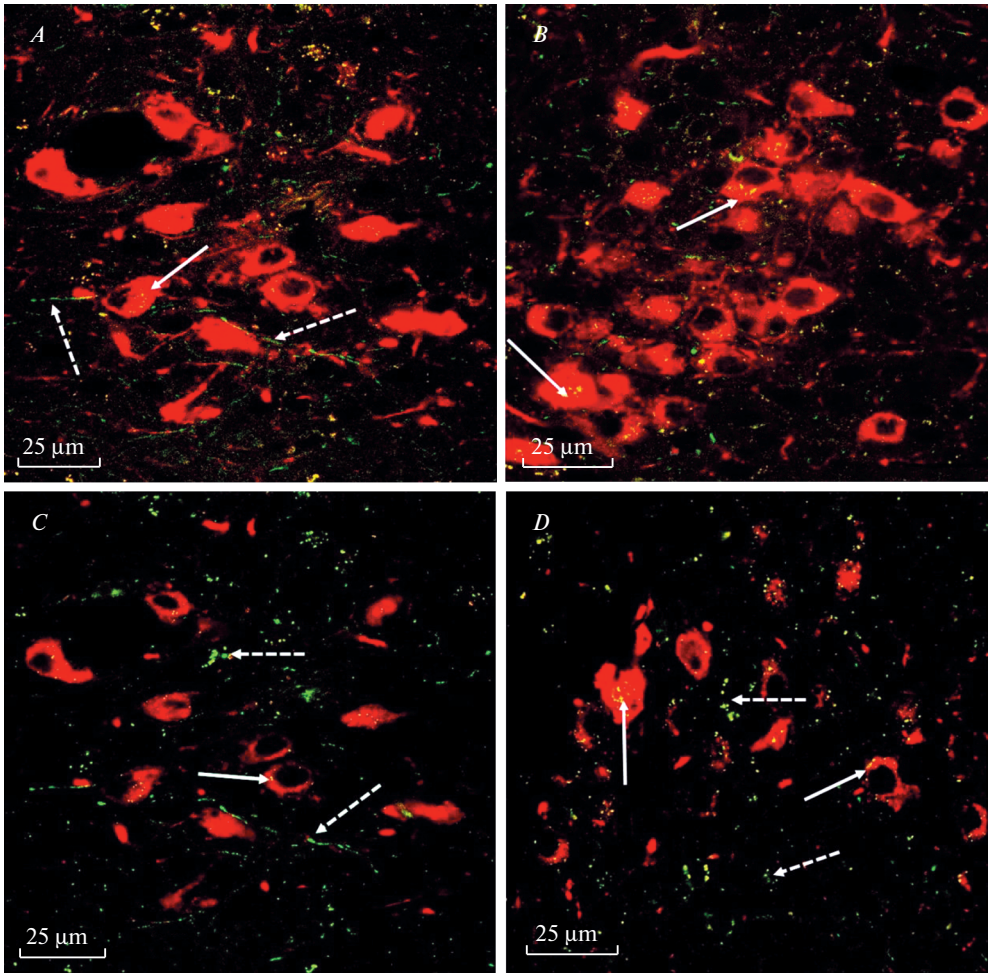


Рис. 4. Двойная иммуногистохимическая реакция к триптофангидроксилазе-2 и вазопрессину в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса мышей.

A – контроль-1, *B* – ДИО, *C* – контроль-2, *D* – агути-мыши с генотипом *Ay/a*.

Представлено иммуномечение ТПГ-2 (*зеленый*) и вазопрессина (*красный*). Сплошными стрелками отмечены иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в телах вазопрессин-иммунопозитивных нейронов, прерывистыми стрелками – иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в других структурах паравентрикулярных ядер. Масштаб – 25 мкм.

Fig. 4. Double immunohistochemical reaction to tryptophan hydroxylase-2 and proopiomelanocortin (POMC) in the paraventricular nuclei of the hypothalamus of mice.

A – control-1; *B* – DIO; *C* – control-2; *D* – agouti mice with the *Ay/a* genotype.

The immunolabeling of TPH-2 (*green*) and POMC (*red*) is presented. The solid arrows indicate the immunopositive granules for TRH-2 in the vasopressin-immunopositive neurons, and the dashed arrows indicate the granules immunopositive for TRH-2 in the other structures of the paraventricular nuclei. The scale bars – 25 μm.

вазопрессин-иммунопозитивных нейронах (рис. 4). Сходная картина отмечалась и в супраоптических ядрах гипоталамуса (фотографии не приведены). Полученные данные свидетельствуют о том, что в различных гипоталамических структурах фер-

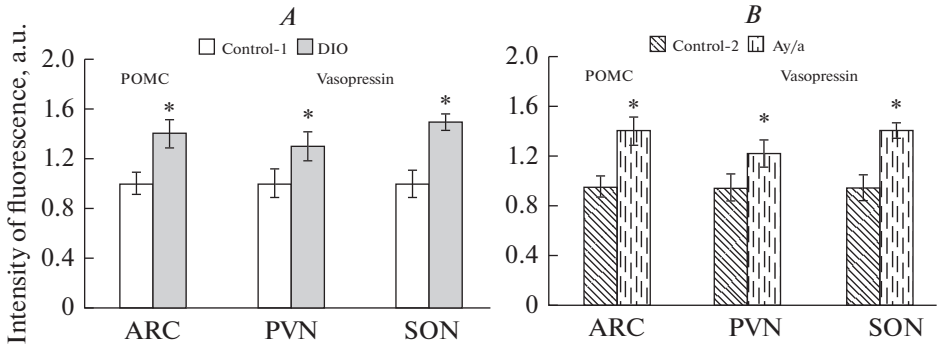


Рис. 5. Интенсивность свечения триптофангидроксилазы-2 в ПОМК- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах гипоталамуса мышей с ДИО (*A*) и с генетически обусловленным меланокортиновым ожирением (агути мыши с генотипом *Ay/a*) (*B*).

ARC, PVN и SON – аркуатные, паравентрикулярные и супраоптические ядра гипоталамуса. Данные представлены в условных единицах (у. ед.). * – различия между группой с ожирением и соответствующей контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$.

Fig. 5. The intensity of the luminescence of tryptophan hydroxylase-2 in the POMC- and vasopressin-immunopositive neurons of the hypothalamus of the mice with DIO (*A*) and genetically-induced melanocortin obesity (agouti mice with the *Ay/a* genotype) (*B*).

ARC, PVN, and SON are the arcuate, paraventricular, and supraoptic nuclei of the hypothalamus. The data are presented in arbitrary units (a. u.). * – the differences between the obese and corresponding control group are significant at $p < 0.05$.

мент ТПГ-2 может быть локализован не только в отростках и окончаниях нейронов среднего мозга (изолированные иммунопозитивные гранулы к ТПГ-2-антителам), но и в гипоталамических нейронах, экспрессирующих различные гипоталамические нейрогормоны – ПОМК, прекурсор меланокортиновых пептидов, и вазопрессин.

Далее с помощью двойного иммуномечения оценивали количество иммунопозитивных к ТПГ-2 гранул, локализованных в ПОМК- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах гипоталамуса, у ДИО- и агути-мышей в сравнении с контрольными животными. Показано, что у мышей с различными типами ожирения иммунопозитивность к ТПГ-2 в ПОМК-нейронах аркуатного ядра и в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер была выше, чем в контроле (рис. 3–5). В наибольшей степени такое повышение выявлялось в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах супраптических ядер, в наименьшей степени – в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных ядер (рис. 5). Повышение экспрессии ТПГ-2 в гипоталамических нейронах может быть обусловлено необходимостью усиления серотониновой регуляции в гипоталамусе в условиях ожирения, направленной на снижение потребления высококалорийной пищи при ДИО и на ослабление орексигенных влияний, вызванных подавлением меланокортинового сигналинга в гипоталамусе при гиперэкспрессии агути-сигнального пептида, антагониста меланокортиновых рецепторов, у агути-мышей. Это согласуется с ролью серотонина как нейрогормона, ослабляющего орексигенные каскады в гипоталамусе [25, 26]. Как было показано нами ранее, в условиях ДИО и меланокортинового ожирения в гипоталамусе также повышается экспрессия серотониновых рецепторов 1B- и 2C-подтипов, в том числе на ПОМК-иммунопозитивных нейронах, что также указывает на компенсаторное

усиление серотонинового сигналинга в условиях ожирения [13]. Интраназальное введение крысам с ДИО серотонина или совместное введение мышам агонистов серотониновых рецепторов 1B- и 2C-подтипов снижает у них потребление пищи, что приводит к снижению массы тела животных и в случае ДИО-крыс нормализует их метаболические показатели [18, 27].

Таким образом, в гипоталамусе мышей C57Bl/6J выявлена экспрессия гена, кодирующего ТПГ-2, и с помощью двойного иммуномечения впервые показана локализация этого фермента в ПОМК-иммунопозитивных нейронах аркуатных ядер и в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса. При ДИО и меланокортиновом ожирении количество ТПГ-2-иммунопозитивных гранул в ПОМК- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах повышалось, хотя экспрессия гена *Tph2* повышалась только у агути-мышей. В среднем мозге ДИО-мышей содержание ТПГ-2 снижалось, в то время как у агути-мышей оно не менялось. Эти результаты свидетельствуют о важной роли синтезируемого в гипоталамусе серотонина, который совместно с серотонином, поступающим в гипоталамус из среднего мозга, вовлечен в компенсаторные изменения гипоталамического сигналинга у мышей с ожирением и ассоциированными с ним метаболическими и гормональными расстройствами. Обнаружение гипоталамических ТПГ-2-иммунопозитивных нейронов различной эргичности, способных синтезировать серотонин, указывает на существование новых механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции в гипоталамусе, в том числе, реализуемых при ожирении.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Halliday G.M., Tork I.* Serotonin-like immunoreactive cells and fibres in the rat ventromedial mesencephalic tegmentum. Brain Res. Bull. 22: 725–735. 1989.
2. *Baker K.G., Halliday G.M., Hornung J.P., Geffen L.B., Cotton R.G., Tork I.* Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. Neuroscience. 42: 757–775. 1991.
3. *Chen G.L., Novak M.A., Hakim S., Xie Z., Miller G.M.* Tryptophan hydroxylase-2 gene polymorphisms in rhesus monkeys: association with hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and in vitro gene expression. Mol. Psychiatry. 11(10): 914–928. 2006. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001870
4. *Carkaci-Salli N., Salli U., Kuntz-Melcavage K.L., Pennock M.M., Ozgen H., Tekin I., Freeman W.M., Vrana K.E.* TPH2 in the ventral tegmental area of the male rat brain. Brain Res. Bull. 84(6): 376–80. 2011. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.01.006
5. *Nezafati M.H., Eshraghi A., Vojdanparast M., Abtahi S., Nezafati P.* Selective serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular events: A systematic review. J. Res. Med. Sci. 21: 66. 2016. eCollection 2016. https://doi.org/10.4103/1735-1995.189647
6. *Yabut J.M., Crane J.D., Green A.E., Keating D.J., Khan W.I., Steinberg G.R.* Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. Endocr. Rev. 40(4): 1092–1107. 2019. https://doi.org/10.1210/er.2018-00283
7. *Bacqué-Cazenave J., Bharatiya R., Barrière G., Delbecque J-P., Bouguiyoud N., Di Giovanni G., Cattaert D., De Deurwaerdère P.* Serotonin in Animal Cognition and Behavior. Int. J. Mol. Sci. 21(5): E1649. 2020. https://doi.org/10.3390/ijms21051649
8. *Bamalan O.A., Al Khalili Y.* Physiology, Serotonin. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020–2019.

9. *Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hortnagl H., Voits M., Fink H., Bader M.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science. 299: 76. 2003.
10. *Heydendael W., Jacobson L.* Glucocorticoid status affects antidepressant regulation of locus coeruleus tyrosine hydroxylase and dorsal raphé tryptophan hydroxylase gene expression. Brain Res. 1288: 69–78. 2009.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.082
11. *Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H., Bader M., Alenina N.* Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. Transl. Psychiatry. 2(5): e122. 2012.
https://doi.org/10.1038/tp.2012.44
12. *Wang L., Han D., Yin P., Teng K., Xu J., Ma Y.* Decreased tryptophan hydroxylase 2 mRNA and protein expression, decreased brain serotonin concentrations, and anxiety-like behavioral changes in a rat model of simulated transport stress. Stress. 22(6): 707–717. 2019.
https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1625328
13. *Mikhailova E.V., Romanova I.V., Derkach K.V., Vishnevskaya O.N., Shpakov A.O.* The Effect of Diet-Induced and Melanocortin Obesity on Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in the Dorsal Raphe Nucleus and Ventral Tegmental Area in Mice. J. Evol. Biochem. Physiol. 55(4): 293–301. 2019.
https://doi.org/10.1134/S0022093019040057
14. *Clark J.A., Flick R.B., Pai L.Y., Szalayova I., Key S., Conley R.K., Deutch A.Y., Hutson P.H., Mezey E.* Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. Mol. Psychiatry. 13(5): 498–506. 2008.
https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002041
15. *Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O.* The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. Neurochem. Res. 43(4): 821–837. 2018.
https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z
16. *Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J.* Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein and Proopiomelanocortin in Brain. J. Neurosci. 19: 1–7. 1999.
17. *Altstein M., Gainer H.* Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development. J. Neurosci. 8: 3967–3977. 1988.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-11-03967.1988
18. *Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A.* The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PloS One. 14(3), e0213779. 2019.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779
19. *Krasnova I.N., Bychkov E.R., Lioudyno V.I. Zubareva O.E., Dambinova S.A.* Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. Neuroscience. 95(1): 113–117. 2000.
20. *Bethea C.L., Reddy A.P., Flowers M., Shapiro R.A., Colman R.J., Abbott D.H., Levine J.E.* High fat diet decreases beneficial effects of estrogen on serotonin-related gene expression in marmosets. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 58: 71–80. 2015.
https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.11.008
21. *Thompson J.R., Valleau J.C., Barling A.N., Franco J.G., De Capo M., Bagley J.L., Sullivan E.L.* Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates. Front. Endocrinol. (Lausanne). 8: 164. 2017.
https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00164
22. *Pan Q., Liu Q., Wan R., Kalavagunta P.K., Liu L., Lv W., Qiao T., Shang J., Wu H.* Selective inhibition of intestinal 5-HT improves neurobehavioral abnormalities caused by high-fat diet mice. Metab. Brain Dis. 34(3): 747–761. 2019.
https://doi.org/10.1007/s11011-019-0392-x
23. *Park S., Harrold J.A., Widdowson P.S., Williams G.* Increased binding at 5-HT(1A), 5-HT(1B), and 5-HT(2A) receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. Brain Res. 847(1): 90–97. 1999.
24. *Deguchi T., Barchas J.* Regional distribution and developmental change of tryptophan hydroxylase activity in rat brain. J. Neurochem. 19 (3): 927–929. 1972.
25. *Burke L.K., Doslikova B., D'Agostino G., Garfield A.S., Farooq G., Burdakov D., Low M.J., Rubinstein M., Evans M.L., Billups B., Heisler L.K.* 5-HT obesity medication efficacy via POMC activation is maintained during aging. Endocrinology. 155 (10): 3732–3738. 2014.
26. *Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M.* Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. Future Sci. OA. 1(3): FSO25. 2015.
https://doi.org/10.4155/fso.15.23
27. *Doslikova B., Garfield A.S., Shaw J., Evans M.L., Burdakov D., Billups B., Heisler L.K.* 5-HT2C receptor agonist anorectic efficacy potentiated by 5-HT1B receptor agonist coapplication: an

effect mediated via increased proportion of pro-opiomelanocortin neurons activated. J. Neurosci. 33 (23): 9800–9804. 2013.

The Effect of the Diet-Induced and Melanocortine-Type Obesity on the Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in Midbrain and Hypothalamus of Mice

E. V. Mikhailova[a], D. L. Sviridova[a], I. V. Romanova[a, *], K. V. Derkach[a], and A. O. Shpakov[a]

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

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

The brain serotonin system plays a key role in the regulation of behavior and cognitive functions, but also in the control of food intake and energy metabolism. This involves the serotonergic midbrain neurons expressing the type 2 tryptophan hydroxylase (TPH-2), which catalyzes the synthesis of serotonin, and the hypothalamic neurons expressing the serotonin receptors. Currently, the changes in the expression and distribution of TPH-2 in midbrain neurons in obesity remain poorly understood. Along with this, it is assumed that serotonin can also be synthesized in the hypothalamic neurons, affecting the serotonin system within the hypothalamus, but there are no data on the expression and possible localization of TPH-2 in the hypothalamic neurons. The aim of the work was to study the TPH-2 expression in the midbrain and its distribution in the neurons of the arcuate, paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in mice with diet-induced obesity (DIO) and in agouti mice with genetically-induced obesity of the melanocortin type. The TPH-2 gene expression was detected in the hypothalamus of C57Bl/6J mice, and the double immunolabeling showed the localization of this enzyme in proopiomelanocortin (POMC)-immunopositive neurons and paraventricular of the arcuate nuclei and in vasopressin-immunopositive neurons of the paraventricular and supraoptic nucleus. In both types of obesity, the number of TPH-2-immunopositive granules in the POMC- and vasopressin-immunopositive neurons was increased, although the expression of the *Tph2* gene was increased only in agouti mice. In the midbrain of DIO mice, the content of TPH-2 was decreased, while in agouti mice it did not change. These results indicate the important role of serotonin synthesized in the hypothalamus, which, together with serotonin coming from the midbrain, is involved in the compensatory changes of hypothalamic signaling in obesity. The detection of TPH-2-immunopositive hypothalamic neurons of different types, capable of synthesizing serotonin, indicates the existence of new mechanisms of the autocrine and paracrine serotonin regulation in the hypothalamus, including the obesity conditions.

Keywords: serotonin, tryptophan hydroxylase-2, midbrain, hypothalamus diet-induced obesity, agouti mouse

ЦИТИРОВАТЬ:

Михайлова Е.В., Свиридова Д.Л., Романова И.В., Деркач К.В., Шпаков А.О. Влияние диета-индуцированного и меланокортинового ожирения на экспрессию триптофангидроксилазы 2 в нейронах среднего мозга и гипоталамуса мышей. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1238–1250.

DOI: 10.31857/S0869813920100064

TO CITE THIS ARTICLE:

Mikhailova E.V., Sviridova D.L., Romanova I.V., Derkach K.V., Shpakov A.O. The Effect of the Diet-Induced and Melanocortine-Type Obesity on the Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in Midbrain and Hypothalamus of Mice. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1238–1250.

DOI: 10.31857/S0869813920100064

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1251–1265

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ С ИНДУКТОРОМ ШАПЕРОНОВ U133 В МОДЕЛИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У ПОЖИЛЫХ КРЫС

© 2020 г. Д. В. Белан[1, *], С. Г. Полоник[2], И. В. Екимова[1]

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

[2]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

**e-mail: daf205@yandex.ru*

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.
После доработки 25.05.2020 г.
Принята к публикации 12.07.2020 г.

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое неуклонно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с преимущественным поражением дофамин (ДА-)ергических нейронов нигростриатной системы головного мозга. БП чаще всего поражает пожилых людей и относится к числу неизлечимых. Нарушение конформации белка α-синуклеина и его гиперфосфолирование, а также развитие хронического нейровоспаления являются основными звеньями патогенеза нейродегенерации при БП. Фармакотерапия, направленная на мобилизацию стресс-индуцируемого шаперона Hsp70, играющего решающую роль в контроле качества белковых молекул и обладающего иммуномодулирующей активностью, представляется перспективной для разработки превентивной терапии БП. В настоящем исследовании в модели доклинической стадии БП у крыс пожилого возраста, созданной путем интраназального введения ингибитора протеасом лактацистина, применена терапия, основанная на системном введении индуктора шаперона Hsp70 – низкомолекулярного хиноидного соединения U133 (ацетилированного 2,3,7-трис-О-глюкозида эхинохрома). Показано, что соединение U133 вызывает отставленное во времени повышение содержания Hsp70 в компактной части черной субстанции (кчЧС) у пожилых животных. Превентивная Hsp70-индуцирующая терапия с U133 в модели доклинической стадии БП у крыс пожилого возраста ослабляет процесс нейродегенерации в кчЧС и противодействует развитию нейровоспаления. При этом отмечается уменьшение количества агрегированного α-синуклеина и регрессия посттрансляционно модифицированного фосфорилированного по Ser129 α-синуклеина. Полученные данные свидетельствуют, что пролекарство, низкомолекулярный препарат U133, обладает значимым терапевтическим потенциалом при развитии Паркинсон-подобной патологии в пожилом возрасте. Результаты исследования имеют научно-практическую значимость для разработки инновационной технологии превентивной фармакотерапии БП на основе отечественного препарата U133.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, нейровоспаление, агрегат α-синуклеина, фосфорилированный α-синуклеин, хиноидное соединение U133, черная субстанция, пожилая крыса

DOI: 10.31857/S0869813920100027

Список сокращений: HSP70 – белки теплового шока массой 70 кДа; PBS – апирогенный фосфатный буфер pH 7.4; БП – болезнь Паркинсона; ДА – дофамин; кчЧС – компактная часть черной субстанции; ЛЦ – лактацистин; ТГ – тирозингидроксилаза.

Болезнь Паркинсона (БП) – это мультисистемное хроническое неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которым страдают преимущественно пожилые люди. БП занимает второе место в мире по частоте встречаемости, уступая лишь болезни Альцгеймера [1]. Основным патоморфологическим признаком БП является прогрессирующая дегенерация дофамин (ДА)-ергических нейронов в компактной части черной субстанции, сопряженная с формированием телец Леви, содержащих в качестве одного из основных компонентов агрегированный α-синуклеин, и развитием нейровоспаления [2]. Помимо нейронов кчЧС среднего мозга, при БП поражаются вегетативные ядра ствола, голубое пятно, базальное ядро Мейнерта, обонятельные луковицы, кора больших полушарий. В нейронах вышеперечисленных структур также выявляются тельца Леви [3]. В настоящее время лечение БП носит симптоматический характер и не способно повлиять на патогенез нейродегенерации. Успех в лечении БП связывают с разработкой превентивной нейропротективной фармакотерапии, нацеленной на основные молекулярные мишени, определяющие гибель нейронов при БП. В настоящее время не существует средств, доказательно замедляющих прогрессирование БП.

В качестве одного из основных молекулярных звеньев патогенеза нейродегенерации при БП рассматривается нарушение конформации белка α-синуклеина, приводящее к его агрегированию [4, 5]. В результате агрегации формируются токсичные олигомеры или протофибриллы, которые затем превращаются в нерастворимые фибриллы α-синуклеина [6]. Наличие аберрантных форм α-синуклеина в нейронах кчЧС характерно как для наследственной, так и для спорадической формы БП [7]. Посттрансляционные модификации α-синуклеина (фосфорилирование, нитрирование и окисление) могут усиливать его способность к агрегации [5]. Большая часть (около 90%) α-синуклеина, входящего в состав телец Леви, фосфорилирована в положении Ser129, это указывает на то, что такая посттрансляционная модификация может быть связана с образованием и/или токсичностью агрегированных форм белка [8]. Олигомерные формы α-синуклеина способны покидать нейроны и распространяться между “здоровыми” нервными клетками по прион-подобному механизму; проникая в нейроны, аберрантный α-синуклеин инициирует переход внутриклеточного растворимого мономерного α-синуклеина в агрегированную патологическую форму [9]. Показано, что патологические формы α-синуклеина могут нарушать процесс синтеза ДА и его загрузки в везикулы, повышая тем самым уровень цитозольного ДА [7]. Помимо того, что цитозольный ДА увеличивает уровень внутриклеточного окислительного стресса, он способен связываться с токсичными α-синуклеиновыми протофибриллами и замедлять их превращение в нерастворимые, менее токсичные фибриллы [10]. Кроме этого, агрегаты α-синуклеина способны увеличивать частоту спонтанной спайковой активности ДА-ергических нейронов в кчЧС, истощая тем самым запасы АТФ в клетке и повышая уровень активных форм кислорода [11]. Также внеклеточные олигомеры α-синуклеина активируют систему микроглии через Toll-like рецепторы на поверхности микроглиоцитов, что приводит к повышению синтеза провоспалительных цитокинов и развитию хронического нейровоспаления, которое способствует прогрессированию нейродегенерации [12–14].

Важнейшими молекулярными механизмами защиты нейронов от процесса агрегации белковых молекул являются механизмы, направленные на поддержание протеостаза, в которых участвуют около 2000 факторов, однако ключевыми являются убиквитин-протеасомная система и система белков теплового шока HSP70. Эти системы составляют основные функциональные модули протеостазной сети, которые уравновешивают биосинтез белков, фолдинг и рефолдинг, транслокацию, сборку, разборку и утилизацию белков; неисправности в этих системах могут привести к развитию ряда нейродегенеративных заболеваний. Одним из прямых свидетельств, подтверждающих вовлечение молекулярных шаперонов в патогенез БП,

явились результаты исследований тканей головного мозга (postmortem) у пациентов с БП, которые указывают не только на присутствие шаперонов семейства HSP70 в тельцах Леви [15], но и на их колокализацию с агрегатами α-синуклеина [16]. Кроме того, показано низкое содержание некоторых шаперонов семейства HSP70 в секционном материале кчЧС при БП, что отражает ослабление механизмов конформационного контроля белков и клеточной защиты при развитии заболевания [17]. Ряд данных, имеющихся в литературе, указывает, что увеличение содержания стресс-индуцируемого белка Hsp70 в ДА-ергических нейронах кчЧС приводит к повышению их выживаемости в моделях БП у животных [18, 19]. Поэтому в последние 20 лет идет поиск препаратов, способных мобилизовать шаперонный механизм Hsp70 в нейронах головного мозга. Особое внимание уделяется так называемым химическим шаперонам, т.е. малым молекулам, хорошо проникающим через гематоэнцефалический барьер и не обладающим побочными токсическими эффектами. В этом отношении одним из перспективных индукторов Hsp70 является активатор транскрипционного фактора белков теплового шока HSF1, нетоксичное низкомолекулярное соединение трисацетилглюкозид эхинохрома U133 [20, 21]. Ранее нами показано, что препарат U133, вызывающий повышение уровней Hsp70 и HSP40 в кчЧС, значительно ослабляет процесс нейродегенерации в нигростриатной системе в модели клинической стадии БП у крыс среднего возраста [22]. При этом возрастание уровня Hsp70 сопряжено с уменьшением количества агрегатов α-синуклеина и нейровоспаления в кчЧС. Однако спорадическая форма БП обычно развивается в позднем возрасте [23], для которого характерна потеря функции шаперонной и убиквитин-протеасомной систем [24]. У пожилых лиц отмечено снижение уровня и активности транскрипционного фактора HSF1, скорости транскрипции генов белка Hsp70 и синтеза шаперонов [24–26]. Оставалось неясным, будет ли проявляться Hsp70-индуцирующий эффект соединения U133 в пожилом возрасте и каковы перспективы применения препарата U133 для превентивной нейропротективной терапии БП при старении. Задача настоящего исследования – оценить нейропротективный эффект препарата U133 и его способность противодействовать развитию α-синуклеиновой патологии и хронического нейровоспаления у крыс в пожилом возрасте в лактацистиновой модели доклинической стадии БП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар пожилого возраста (20–22 мес.), которых содержали в виварии при постоянной температуре окружающей среды 23 ± 1°C и свободном доступе к воде и пище. Манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с принципами Базельской декларации и протоколом, утвержденным этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Для моделирования нейродегенеративной патологии нигростриатной системы, характерной для БП, использовали специфический ингибитор ферментативной активности протеасом лактацистин (ЛЦ, Enzo, США), который растворяли в апирогенном фосфатном буфере (pH 7.4) и вводили в дозе 100 мкг/8 мкл в каждую ноздрю крысы (n = 16) дважды с недельным интервалом; общая доза на одну крысу составила 400 мкг. Методология интраназального введения ЛЦ описана нами ранее [27]. Препарат U133 (5 мг/кг) растворяли в DMSO и вводили внутрибрюшинно животным (n = 8) через 4 ч после каждого введения ЛЦ и через 7 дней после последнего введения ЛЦ. Контрольной группе животных (n = 10) вводили эквивалентный объем растворителя ЛЦ и U133.

Отечественный препарат U133 получен в лаборатории органического синтеза природных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН путем глюкозилирования эхинохрома (2,3,5,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинона) – природного пигмента морских ежей – и является ацетилированным 2,3,7-трис-О-глюкозидом эхинохрома [28, 29]. Соединение U133 относится к классу малых молекул (М = 1257 Да) и хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер. В микромолярных концентрациях U133 способен вызывать активацию транскрипционного фактора теплового шока HSF1, что приводит к индукции синтеза белков теплового шока Hsp70 и HSP40 (Hsp40/Hdj1) [21, 22]. U133 не обладает токсическим свойством и проявляет разнообразную биологическую активность, в частности, антиоксидантную и антиканцерогенную [22, 30, 31]. Тестирование нейропротективного эффекта препарата U133 и его способности противодействовать развитию α-синуклеиновой патологии и хронического нейровоспаления у крыс пожилого возраста в модели доклинической стадии БП ранее никем не проводилось.

На 21-й день после первой микроинъекции ЛЦ крыс декапитировали, головной мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида при 4°С в течение 5 дней, промывали в PBS и переносили в 20%-ный раствор сахарозы при 4°С для криопротекции. Спустя 3–5 дней мозг замораживали в изопентане при температуре –45°С и хранили при –80°С. При помощи криостата Leica (Германия) при –20°С приготавливали чередующиеся серии фронтальных срезов головного мозга толщиной 10 мкм, содержащие кчЧС. Для проведения анализа Вестерн-блот после декапитации из головного мозга выделяли кчЧС, замораживали и хранили при –80°С.

Для сравнительного анализа содержания в кчЧС белка Hsp70 и различных форм α-синуклеина (общей и фосфорилированной в положении Ser129) применяли метод Вестерн-блот. Предварительно образцы тканей головного мозга лизировали с использованием High RIPA буфера и гомогенизировали металлической палочкой. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносили на PVDF-мембрану Immobilon-P (Millipore Corporation, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 3% бычьего сывороточного альбумина в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммуномечение проводили с использованием первичных моноклональных антител мыши к индуцибельному Hsp70 (клон 3С5 [32], любезно предоставлен г.н.с. лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН Маргулисом Б.А.), поликлональных антител кролика к общей водорастворимой форме α-синуклеина (1 : 500; Abcam, Великобритания) или к α-синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129 (1 : 700; Abcam, Великобритания). В качестве лоадинг-контроля использовали GAPDH (моноклональные антитела мыши, 1 : 1000; Abcam, Великобритания). Денситометрический анализ количества белка осуществляли с помощью программы ImageJ. Уровень серого бэндов, иммунореактивных к Hsp70, общему α-синуклеину и α-синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129, скорректирован по фоновому сигналу и нормирован на сигнал GAPDH, выявляемый для определения общего количества белка в пробах.

Биотин-стрептавидиновый метод использовали для иммуномечения ДА-ергических нейронов и микроглиоцитов в кчЧС. Срезы промывали в PBS, затем в течение 10 мин выполняли термическую демаскировку антигенов в цитратном буфере (96–98°С; pH 6.0). Для гашения активности эндогенной пероксидазы срезы 20 мин выдерживали в 0.3%-ном растворе пероксида водорода на метаноле. После трехкратной промывки в PBS срезы на 10 мин помещали в PBS с добавлением Triton X-100 (Sigma, США) для повышения проницаемости плазматических мембран и затем преинкубировали в блокирующем растворе (3%-ная сыворотка козы (Sigma, США)

с 0.01% Triton X-100 на ФБ) в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего инкубировали в течение 24 ч при температуре 4°С с первичными поликлональными антителами кролика против тирозингидроксилазы (ТГ; 1 : 900; Abcam, Великобритания) или Iba1 (маркер микроглии; 1 : 500, Sigma, США), затем последовательно в течение 1 ч во вторичных антителах против IgG кролика, конъюгированных с биотином (1 : 450; VectorLab, США), и в комплексе стрептавидин-пероксидаза (1 : 400; VectorLab, США). После синхронной визуализации реакции с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина срезы заключали под покровное стекло с помощью среды BioMount (Италия) и хранили при комнатной температуре. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли негативным контролем без первичных или вторичных антител. Изображения кчЧС получали с помощью микроскопа KarlZeiss (Германия) с встроенной видеокамерой и программного обеспечения для захвата изображения. Подсчет количества иммунопозитивных к ТГ нейронов в кчЧС и Iba1-иммунопозитивных микроглиоцитов проводили с помощью программы PhotoM (Черниговский, http://t-lambda.chart.ru). По каждому животному анализировали 10–12 снимков кчЧС.

Методом двойного иммуномечения с применением антител против общей или фосфорилированной в положении Ser129 форм α-синуклеина и ТГ изучена локализация различных форм α-синуклеина и наличие их агрегатов в ДА-ергических нейронах кчЧС. После стандартной предварительной обработки, описанной выше, срезы инкубировали с поликлональными антителами кролика к общему α-синуклеину (1 : 500; Abcam, Великобритания) или α-синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129 (1 : 700; Abcam, Великобритания) в течение 24 ч при температуре 4°С, затем в течение 1 ч при комнатной температуре во вторичных антителах козы против IgG кролика, конъюгированных с флуоресцентной меткой CF^{TM}488 (1 : 600; Sigma, США), после чего срезы промывали в PBS и инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против ТГ (1 : 1000; Sigma, США) в течение ночи при комнатной температуре, затем в течение 1 ч во вторичных антителах козы против IgG мыши, конъюгированных с флуоресцентной меткой CF^{TM}568 (1 : 600; Sigma, США). Срезы заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при температуре 4°С. Специфичность всех иммуногистохимических реакций проверяли негативным контролем без первичных или вторичных антител.

Флуоресцентную микроскопию проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия). Использовали иммерсионный объектив ×63 и лазеры с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF. Подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS5.

Анализ всех полученных данных осуществлялся с помощью программы Statistica 7.0. Статистический анализ данных, полученных посредством Вестерн-блота или иммуногистохимических исследований, выполняли с помощью параметрического дисперсионного анализа ANOVA для несвязанных выборок. Полученные результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения задачи работы использована ранее разработанная в лаборатории сравнительной термофизиологии Института эволюционной физиологии и биохимии РАН модель доклинической стадии БП у крыс, созданная на основе угнетения активности протеасом в головном мозге [27]. Данная модель характеризуется: а) допороговым (30–35%) уровнем гибели ДА-ергических нейронов в кчЧС по сравнению с уровнем клинической стадии (60–70%); б) развитием нейродегенератив-

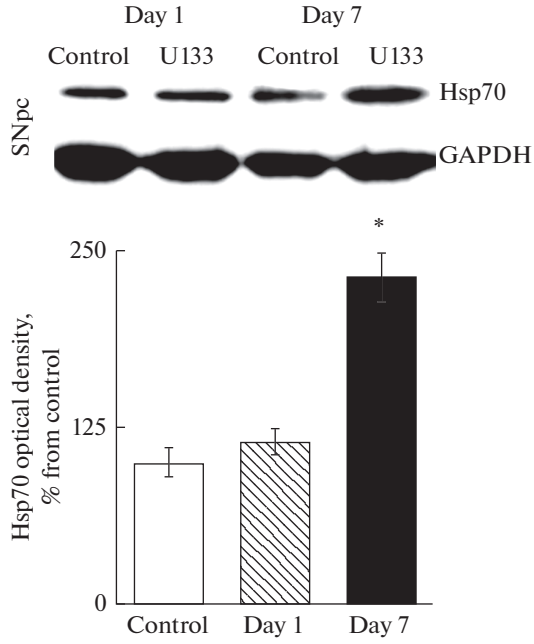


Рис. 1. Содержание Hsp70 в компактной части черной субстанции у пожилых крыс в контроле (Control), через 1 (Day 1) и 7 дней (Day 7) после однократного внутрибрюшинного введения U133 в дозе 5 мг/кг. В верхней части рисунка представлены репрезентативные иммуноблоты компактной части черной субстанции (SNpc). На графике по вертикали – оптическая плотность Hsp70, % от контроля. Достоверность различий в опыте относительно контроля * – $p < 0.05$.

Fig. 1. Hsp70 content in the substantia nigra pars compacta in elderly rats in the control condition, day 1 and day 7 after a single intraperitoneal administration of U133 at a dose of 5 mg/kg. The upper part of the figure shows representative immunoblots of the substantia nigra pars compacta (SNpc). The significance of differences relative to control * – $p < 0.05$.

ного процесса в экстранигральных структурах (обонятельные луковицы, вентральная тегментальная область, голубое пятно); в) наличием α-синуклеиновой патологии и хронического нейровоспаления в кчЧС и экстранигральных структурах; г) нарушением сна, эмоционального поведения и когнитивных функций [33–37].

В предыдущих исследованиях мы показали, что введение препарата U133 крысам среднего возраста приводит к значительному возрастанию уровня стресс-индуцируемого Hsp70 в кчЧС через 1 сутки с момента инъекции [22]. В данной работе методом Вестерн-блота установлено, что после введения U133 пожилым крысам прирост Hsp70 в кчЧС составил 130% по сравнению с контролем. При этом повышение уровня Hsp70 отмечалось только через 7 сут с момента введения U133; в 1-е сутки изменений в содержании Hsp70 не обнаружено (рис. 1). Отставленное во времени повышение синтеза Hsp70 может быть связано с возрастным снижением уровня и активности транскрипционного фактора белков теплового шока HSF1 и, как следствие, уменьшением скорости экспрессии генов и синтеза белка Hsp70 в головном мозге [38–40]. Показано, что базальный уровень HSF1, а также скорость транскрипции генов белка Hsp70 при действии теплового шока значительно ниже в старых Т-лимфоцитах человека по сравнению с молодыми [26].

Методом иммуногистохимии установлено, что интраназальное введение ЛЦ вызывает у пожилых крыс уменьшение количества тел ТГ-позитивных нейронов в

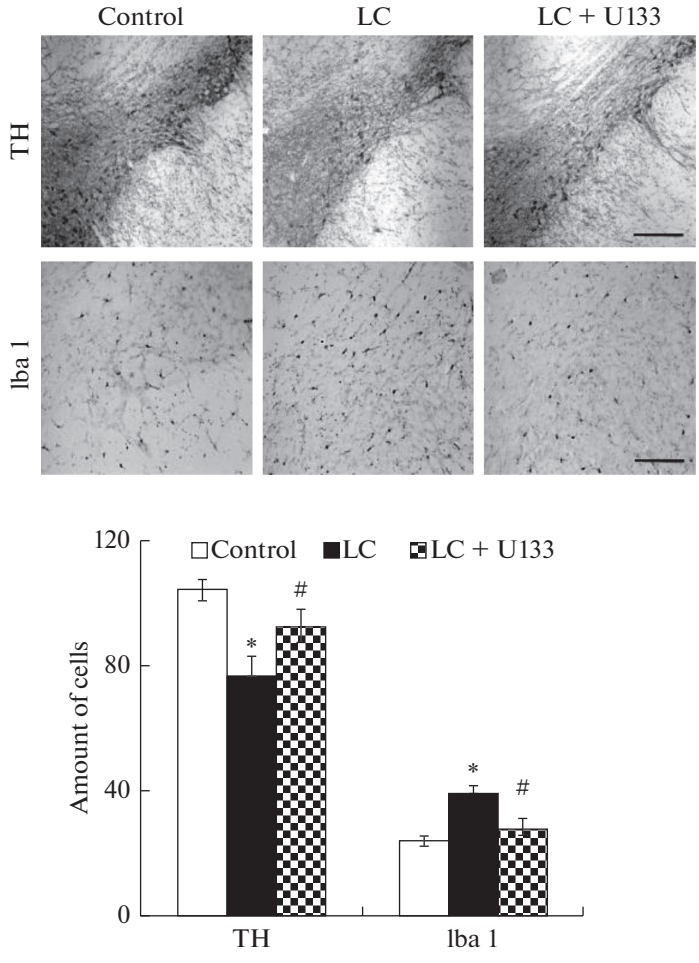


Рис. 2. Изменение количества дофаминергических нейронов и микроглиоцитов в компактной части черной субстанции у пожилых крыс в модели болезни Паркинсона при терапии с U133. Световая микроскопия: ТГ-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (верхний ряд, TH; масштаб 50 мкм); Iba1-иммунореактивные микроглиоциты в компактной части черной субстанции (нижний ряд, Iba1; масштаб 20 мкм). На графике по вертикали – количество клеток. Control – введение контрольного раствора, LC – модель болезни Паркинсона, LC + U133 – терапия с U133 в модели болезни Паркинсона. Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$; LC + U133 по сравнению с действием LC # – $p < 0.05$.

Fig. 2. The change in the number of dopaminergic neurons and microgliocytes in the substantia nigra pars compacta in elderly rats in the Parkinson's disease model after the therapy with U133. Microphotographs: tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the substantia nigra pars compacta (upper panel, TH; scale 50 μm); Iba1-immunoreactive microgliocytes in substantia nigra pars compacta (bottom panel, Iba1; scale 20 μm). Control – the administration of a control solution, LC – the model of Parkinson's disease, LC + U133 – therapy with U133 in the model of Parkinson's disease. The significance of differences relative to: control * – $p < 0.05$; LC + + U133 compared with the LC # – $p < 0.05$.

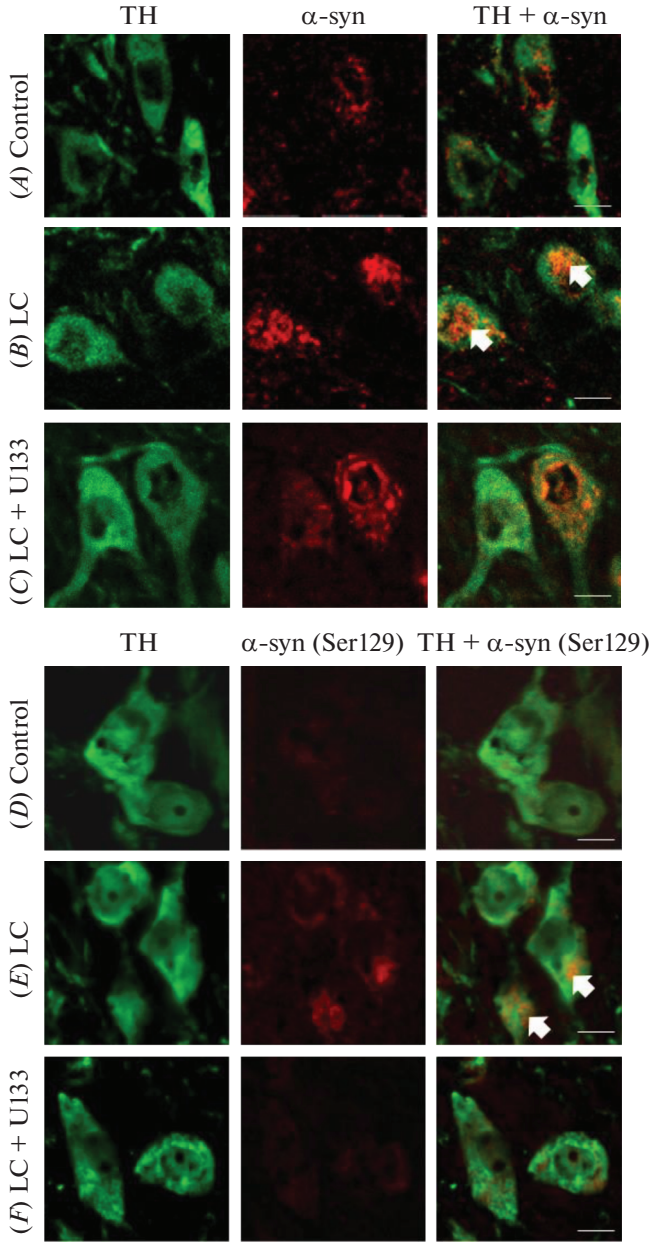
кчЧС на 27% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем, что сопряжено с развитием хронического нейровоспаления, о чем свидетельствует возрастание количества активированных микроглиоцитов в кчЧС (рис. 2). Проведенная терапия с помощью U133 привела к ослаблению процесса нейродегенерации в кчЧС, на что указывает

увеличение на 16% ($p < 0.05$) количества выживших ДА-ергических нейронов (уменьшение в 2.4 раза уровня нейродегенерации), и препятствовала возрастанию количества активированных микроглиоцитов в кчЧС (рис. 2). Следовательно, трис-ацетилглюкозид эхинохрома U133 уменьшает воспаление в кчЧС, ведущее к гибели нейронов и прогрессии БП. В предыдущих исследованиях мы экспериментально доказали, что повышение уровня стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 лежит в основе защитного действия соединения U133: нокдаун Hsp70 с помощью специфической shRNA в C6 клетках глиомы устранял нейропротективный эффект U133 от токсичности, вызванной ЛЦ [22]. С другой стороны, интраназальная доставка в мозг рекомбинантного Hsp70 препятствовала прогрессии нейродегенерации в нигростриатной системе в модели БП у крыс среднего возраста [18]. Противовоспалительный эффект шаперона Hsp70 может быть связан с его негативным влиянием на экспрессию транскрипционного фактора STAT3, активирующего транскрипцию провоспалительных цитокинов, и ингибированием JNK- и NF-κB-опосредованного сигналлинга [41, 42]. Помимо этого, Hsp70 способен модулировать активность макрофагов, связываясь с Toll-like рецепторами на их поверхности, и влиять на синтез и секрецию провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α [43, 44]. Противовоспалительный потенциал Hsp70 продемонстрирован и другими авторами при системном введении Hsp70 в 6-гидроксидофаминовой модели БП у мышей [45].

Поскольку в основе патогенеза нейродегенерации при БП лежит накопление в ДА-ергических нейронах кчЧС агрегированных и модифицированных форм α-синуклеина, мы провели морфологическое и биохимическое исследование, применив антитела против общего водорастворимого и фосфорилированного по Ser129 α-синуклеина, чтобы выяснить эффективность Hsp70-индуцирующей терапии на α-синуклеиновую патологию. С помощью конфокальной микроскопии установлено, что в контрольных условиях α-синуклеин распределен диффузно в цитоплазме нейронов кчЧС и не обнаруживается в ядре (рис. 3*A*). В модели доклинической стадии БП у пожилых крыс на результирующем изображении кчЧС прослеживается накопление α-синуклеина в виде крупных агрегатов белка в цитоплазме и в ядрах ДА-ергических нейронов (рис. 3*B*). При этом, агрегаты α-синуклеина у пожилых животных были более крупного размера по сравнению с агрегатами у крыс среднего возраста в модели БП [46]. Эти факты могут свидетельствовать об усилении про-

Рис. 3. Влияние терапии с индуктором белков теплового шока U133 на развитие α-синуклеиновой патологии в компактной части черной субстанции (кчЧС) в модели болезни Паркинсона у крыс пожилого возраста. Немодифицированная общая форма растворимого α-синуклеина (α-syn); пострансляционно модифицированная форма α-синуклеина, фосфорилированного по Ser129 (α-syn (Ser129)). Control – введение контрольного раствора, LC – модель болезни Паркинсона, LC + U133 – терапия с U133 в модели болезни Паркинсона. Конфокальные микрофотографии препаратов кчЧС: (*A*)–(*C*). Двойное иммуномечение с применением антител против тирозингидроксилазы (TH) и α-syn; масштаб 10 мкм. Стрелками показаны агрегаты α-синуклеина. (*D*)–(*F*). Двойное иммуномечение с применением антител против тирозингидроксилазы (TH) и α-syn (Ser129); масштаб 10 мкм. Стрелками показаны агрегаты α-синуклеина, фосфорилированного в положении Ser129.

Fig. 3. The effect of therapy with heat shock proteins inducer U133 on the development of α-synuclein pathology in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in the Parkinson's disease model in elderly rats. Unmodified form of soluble α-synuclein (α-syn); post-translationally modified form of α-synuclein phosphorylated at Ser129 (αpsyn (Ser129)). Control – the administration of a control solution, LC – the model of Parkinson's disease, LC + U133 – therapy with U133 in the model of Parkinson's disease. Confocal microphotographs of SNpc: (*A*)–(*C*). Double immunolabeling using antibodies against tyrosine hydroxylase (TH) and α-syn; scale 10 μm. Arrows indicate α-synuclein aggregates. (*D*)–(*F*). Double immunolabeling with antibodies against TH and α-syn (Ser129); scale 10 μm. Arrows indicate aggregates of α-synuclein phosphorylated at Ser129.



цесса агрегации белка α-синуклеина по мере старения вследствие ослабления работы протеасом в кчЧС. У пожилых пациентов с БП postmortem в нейронах кчЧС также обнаружены крупные агрегаты α-синуклеина подобной морфологии, локализованные как в цитоплазме, так и в ядре ДА-ергических нейронов [47, 48]. Применение Hsp70-индуцирующей терапии с U133 привело к значительному сокращению количества крупных агрегатов α-синуклеина в ДА-ергических нейронах кчЧС, судя по анализу изображения на конфокальных микрофотографиях (рис. 3*C*).

Это может указывать на дезагрегационную активность Hsp70. Сходные результаты при морфологическом анализе кчЧС были получены нами ранее при лечении крыс среднего возраста с помощью U133 в модели клинической стадии БП [22]. Также эти данные были подтверждены методом ловушки на фильтре (Filter Trap Assay), с помощью которого показано, что терапия с U133 сопровождалась двукратным снижением оптической плотности иммунореактивного вещества к α-синуклеину в нерастворимом осадке проб кчЧС крыс в модели БП [22]. Следует отметить, что снижение агрегации α-синуклеина и связанной с ним токсичности продемонстрировал и другой перспективный индуктор шаперонов, препарат FLZ, в модели α-синуклеиновой патологии у мышей [49].

Одной из основных патологических модификаций α-синуклеина является его фосфорилирование по Ser129, которое может влиять на растворимость этого белка и способствовать его патогенной агрегации [5, 50]. Поэтому важным представлялось исследовать влияние U133 на содержание фосфорилированного α-синуклеина (Ser129) в кчЧС при моделировании БП у пожилых крыс. Проведенный морфологический анализ показал, что в контрольных условиях α-синуклеин (Ser129) представлен скудно в ДА-ергических нейронах кчЧС, в то время как в модели доклинической стадии БП отмечается его накопление и агрегирование в телах ДА-ергических нейронов кчЧС (рис. 3*D*, *E*). Судя по результирующему изображению, терапия с U133 препятствовала избыточному образованию модифицированной формы α-синуклеина и ее агрегированию в модели БП у пожилых животных (рис. 3*F*).

Результаты морфологического анализа были подтверждены Вестерн-блоттингом. Показано, что у крыс пожилого возраста в модели БП содержание общей водорастворимой формы α-синуклеина возрастает в 1.4 раза ($p < 0.01$) в кчЧС по сравнению с контролем, что является следствием ослабления работы протеасом. Накопление α-синуклеина в телах ДА-ергических нейронов кчЧС сопряжено с возрастанием в 2.9 раза ($p < 0.01$) уровня фосфорилированного α-синуклеина (Ser129) по сравнению с контролем (рис. 4). Курсовое введение индуктора шаперонов U133 модельным животным приводило к приросту уровня водорастворимого α-синуклеина в кчЧС, что может указывать на уменьшение агрегированных водонерастворимых форм α-синуклеина. При этом содержание фосфорилированного α-синуклеина (Ser129) снижалось до контрольных значений в кчЧС (рис. 4). Можно полагать, что повышение выживаемости ДА-ергических нейронов в кчЧС при применении Hsp70-индуцирующей терапии связано со способностью шаперона стабилизировать основное состояние молекулы α-синуклеина, что препятствует его химической модификации, которая усиливает агрегационную способность α-синуклеина и его токсичность. Экспериментально доказано, что накопление фосфорилированного α-синуклеина (Ser129) токсично для клетки и сопряжено с усилением нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе при моделировании у крыс наследственной формы БП [51]. Уменьшению содержания растворимых форм α-синуклеина может способствовать глубокий медленный сон, во время которого создаются условия для клиренса амилоидогенных белков посредством глимфатической системы [52]. Установлено, что при проведении терапии с U133 в модели доклинической стадии БП глубокий медленный сон значимо возрастает у пожилых крыс [37]. Однако вследствие того, что созданная нами модель БП основана на ингибировании работы протеасом, повышенный уровень водорастворимой неагрегированной формы α-синуклеина в кчЧС сохраняется. Это указывает на то, что для полноценной терапии α-синуклеиновой патологии при БП нужен комплексный подход, нацеленный как на молекулярные механизмы, противодействующие образованию конформационно дефектных белков (активация шаперонной системы белков теплового шока), так и на механизмы их утилизации (использование активаторов протеасом и шаперон-опосредованной аутофагии). В совокупности

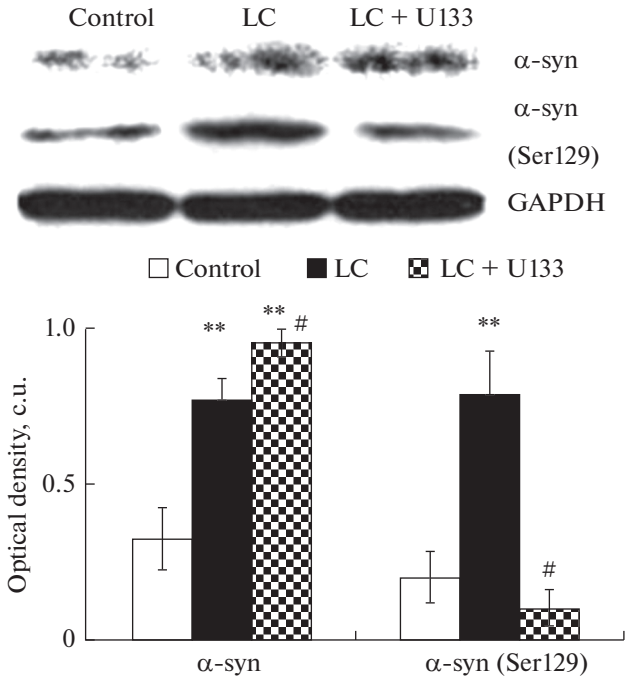


Рис. 4. Содержание общего α-синуклеина (α-syn) и его фосфорилированной по Ser129 фракции (α-syn (Ser129)) в компактной части черной субстанции у крыс в модели болезни Паркинсона при терапии с U133. В верхней части рисунка представлены репрезентативные иммуноблоты компактной части черной субстанции. На графике по вертикали – оптическая плотность, у.е. Control – введение контрольного раствора, LC – модель болезни Паркинсона, LC + U133 – терапия с U133 в модели болезни Паркинсона. Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; LC + U133 по сравнению с действием LC # – $p < 0.05$.

Fig. 4. The content of total α-synuclein (α-syn) and its Ser129-phosphorylated fraction (α-syn (Ser129)) in the substantia nigra pars compacta of rats in the Parkinson's disease model after the therapy with U133. The upper panel of the figure shows representative immunoblots of the substantia nigra pars compacta. Control – the administration of a control solution, LC – the model of Parkinson's disease, LC + U133 - therapy with U133 in the model of Parkinson's disease. The significance of differences relative to: control * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; LC + U133 compared with the LC # – $p < 0.05$.

данные морфологического и биохимического анализа указывают на то, что Hsp70-индуцирующая терапия с помощью низкомолекулярного препарата U133 в пожилом возрасте способствует уменьшению количества агрегатов α-синуклеина и препятствует посттрансляционной модификации α-синуклеина в фосфорилированную форму в нейронах кчЧС в модели доклинической стадии БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует, что фармакологическая активация транскрипционного фактора HSF1 в стареющем мозге с помощью трисацетилглюкозида эхинохрома U133 способна вызвать Hsp70-индуцирующий ответ в кчЧС, являющейся наиболее значимой структурой головного мозга при БП. Проведение Hsp70-индуцирующей терапии в модели доклинической стадии

БП у пожилых крыс приводит к уменьшению прогрессирования нейродегенерации в нигростриатной системе, сопряженной с ослаблением признаков нейровоспаления и α-синуклеиновой патологии. В совокупности полученные факты свидетельствуют, что пролекарство – низкомолекулярный препарат U133 – обладает значительным терапевтическим потенциалом при Паркинсон-подобной патологии. Результаты исследования имеют научно-практическую значимость для разработки инновационной технологии превентивной фармакотерапии БП на основе отечественного препарата U133 у людей как среднего, так и пожилого возраста.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при поддержке госзадания (№ АААА-А18-118012290427-7) для Д.В. Белан и И.В. Екимовой, которые выполнили все эксперименты на животных, иммуногистохимическое и биохимическое исследования, а также подготовили рукопись статьи. Трисацетилглюкозид эхинохрома U133 синтезирован под руководством С.Г. Полоника при частичной финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 19-14-00047). Морфологические и биохимические исследования проводились в Центре коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Синтез трисацетилглюкозида эхинохрома U133 выполнен в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Erkkinen M.G., Kim M.O., Geschwind M.D.* Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 10(4): a033118. 2018.
2. *Fujita K.A., Ostaszewski M., Matsuoka Y., Ghosh S., Kitano H., Balling R.* Integrating pathways of parkinson's disease in a molecular interaction map. Mol. Neurobiol. 49(1): 88–102. 2014.
3. *Braak H., Ghebremedhin E., Rьb U., Bratzke H., Del Tredici K.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res. 318(1): 121–134. 2004.
4. *Verma M., Basu S., Singh M., Rachana R., Kaur S., Goel N.* Molecular Interactions of a-Synuclein, Mitochondria, and Cellular Degradation Pathways in Parkinson's Disease. Qual. Control Cell. Protein Neurodegener. Disord. 212–234. 2020.
5. *Rocha E.M., De Miranda B., Sanders L.H.* Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. 109: 249–257. 2018.
6. *Giasson B.I., Duda J.E., Murray I.V.J., Chen Q., Souza J.M., Hurtig H.I., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y.* Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α-Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. Science. 290(5493): 985–989. 2000.
7. *Lotharius J., Brundin P.* Pathogenesis of parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α-synuclein. Nat. Rev. Neurosci. 3(12): 932–942. 2002.
8. *Hara S., Arawaka S., Sato H., MacHiya Y., Cui C., Sasaki A., Koyama S., Kato T.* Serine 129 phosphorylation of membrane-associated α-synuclein modulates dopamine transporter function in a G protein-coupled receptor kinase-dependent manner. Mol. Biol. Cell. 24(11): 1649–1660. 2013.
9. *Marques O., Outeiro T.F.* Alpha-synuclein: From secretion to dysfunction and death. Cell Death Dis. 3(7): e350. 2012.
10. *Rochet J.C., Outeiro T.F., Conway K.A., Ding T.T., Volles M.J., Lashuel H.A., Bieganski R.M., Lindquist S.L., Lansbury P.J.* Interactions among α-synuclein, dopamine, and biomembranes: Some clues for understanding neurodegeneration in Parkinson's disease. J. Mol. Neurosci. 23(1–2): 23–33. 2004.
11. *Subramaniam M., Althof D., Gispert S., Schwenk J., Auburger G., Kulik A., Fakler B., Roeper J.* Mutant α-synuclein enhances firing frequencies in dopamine substantia nigra neurons by oxidative impairment of A-type potassium channels. J. Neurosci. 34(41): 13586–13599. 2014.

12. *Ferrari C.C., Pott Godoy M.C., Tarelli R., Chertoff M., Depino A.M., Pitossi F.J.* Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1β in the substantia nigra. Neurobiol. Dis. 24(1): 183–193. 2006.
13. *Perez-Alvarez S., Solesio M.E., Manzanares J., Jordбn J., Galindo M.F.* Lactacystin requires reactive oxygen species and Bax redistribution to induce mitochondria-mediated cell death. Br. J. Pharmacol. 158(4): 1121–1130. 2009.
14. *Karpenko M.N., Muruzheva Z.M., Pestereva N.S., Ekimova I. V.* An Infection Hypothesis of Parkinson's Disease. Neurosci. Behav. Physiol. 49(5): 555–561. 2019.
15. *Auluck P.K., Chan H.Y.E., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y., Bonini N.M.* Chaperone suppression of α-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science. 295(5556): 865–868. 2002.
16. *Leverenz J.B., Umar I., Wang Q., Montine T.J., McMillan P.J., Tsuang D.W., Jin J., Pan C., Shin J., Zhu D., Zhang J.* Proteomic Identification of Novel Proteins in Cortical Lewy Bodies. Brain Pathol. 17(2): 139–145. 2007.
17. *Chu Y., Dodiya H., Aebischer P., Olanow C.W., Kordower J.H.* Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. Neurobiol. Dis. 35(3): 385–398. 2009.
18. *Pastukhov Y.F., Plaksina D.V., Lapshina K.V., Guzhova I.V., Ekimova I.V.* Exogenous protein HSP70 blocks neurodegeneration in the rat model of the clinical stage of Parkinson's disease. Dokl. Biol. Sci. 457(1). 2014.
19. *Белан Д.В., Екимова И.В.* Белки теплового шока при конформационных болезнях мозга. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(12): 1465–1485. 2019. [*Belan D.V., Ekimova I.V.* Heat shock proteins in conformational diseases of the brain. Russ. J. Physiol. 105(12): 1465–1485. 2019. (In Russ)].
20. *Eremenko E.M., Antimonova O.I., Shekalova O.G., Polonik S.G., Margulis B.A., Guzhova I.V.* Novel compounds that increase expression of Hsp70 and their biological activity. Cell Tissue Biol. 4(3): 251–257. 2010.
21. *Lazarev V.F., Onokhin K.V., Antimonova O.I., Polonik S.G., Guzhova I.V., Margulis B.A.* Kinetics of chaperone activity of proteins Hsp70 and Hdj1 in human leukemia u-937 cells after preconditioning with thermal shock or compound u-133. Biochemistry. 76(5): 590. 2011.
22. *Ekimova I.V., Plaksina D.V., Pastukhov Y.F., Lapshina K.V., Lazarev V.F., Mikhaylova E.R., Polonik S.G., Pani B., Margulis B.A., Guzhova I.V., Nudler E.* New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. Exp. Neurol. 306: 199–208. 2018.
23. *de Lau L.M., Breteler M.M.* Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 5(6): 525–535. 2006.
24. *Labbadia J., Morimoto R.I.* The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. Annu. Rev. Biochem. 84(1): 435–464. 2015.
25. *Soti C., Csermely P.* Chaperones and aging: Role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. Neurochem. Int. 41(6): 383–389. 2002.
26. *Jurivich D.A., Choo M., Welk J., Qiu L., Han K., Zhou X.* Human aging alters the first phase of the molecular response to stress in T-cells. Exp. Gerontol. 40(12): 948–958. 2005.
27. *Ekimova I.V., Simonova V.V., Guzeev M.A., Lapshina K.V., Chernyshev M.V., Pastukhov Y.F.* Changes in sleep characteristics of rat preclinical model of Parkinson's disease based on attenuation of the ubiquitin–proteasome system activity in the brain. J. Evol. Biochem. Physiol. 52(6): 463–474. 2016.
28. *Полоник С., Толкач А., Уварова Н.* Гликозилирование эхинохрома и родственных гидроксинафтазаринов ортоэфирным методом. Журн. орган. химии. 30(2): 248–253. 1994. [*Polonik S., Tolkach A., Uvarova N.* Glycosylation of echinochrome and related hydroxynaphthazarines by the orthoester method. Zh. Organ. Himii. 30(2): 248–253. 1994. (In Russ)].
29. *Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Bagirova V.L.* Histochrome: a New Original Domestic Drug. Pharm. Chem. J. 37(1): 48–52. 2003.
30. *Lazarev V.F., Nikotina A.D., Mikhaylova E.R., Nudler E., Polonik S.G., Guzhova I.V., Margulis B.A.* Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 470(3): 766–771. 2016.
31. *Yurchenko E.A., Menchinskaya E.S., Polonik S.G., Agafonova I.G., Guzhova I. V., Margulis B.A., Aminin D.L.* Hsp70 Induction and Anticancer Activity of U-133, the Acetylated Trisglucosydic Derivative of Echinochrome. Med. Chem. 5(6): 263–271. 2015.
32. *Lasunskaia E.B., Fridlianskaia I., Arnoldt A.V., Kanashiro M., Guzhova I., Margulis B.A.* Sublethal heat shock induces plasma membrane translocation of 70-kDa heat shock protein in viable, but not in apoptotic, U-937 leukaemia cells. APMIS. 118(3): 179–187. 2010.

33. *Plaksina D.V., Chernyshev M.V., Karpenko M.N., Gazizova A.R., Pazi M.B., Ekimova I.V.* Experimental modeling of a preclinical Parkinson's disease stage in rats by intranasal lactacystin administration. Neurodegen. Dis. (Suppl). 17(1): 1655. 2017.

34. *Ekimova I.V., Gazizova A.R., Karpenko M.N., Plaksina D.V.* Signs of anhedonia and destructive changes in the ventral tegmental area of the midbrain in the model of the preclinical Parkinson's disease stage in experiment. Zh. Nevrol. Psikhiatrii Im. S.S. Korsakova. 118(9): 61–67. 2018.

35. *Abdurasulova I.N., Ekimova I.V., Matsulevich A.V., Gazizova A.R., Klimenko V.M., Pastukhov Y.F.* Impairment of non-associative learning in a rat experimental model of preclinical stage of Parkinson's disease. Dokl. Biol. Sci. 476(1): 188–190. 2017.

36. *Pastukhov Y.F., Simonova V.V., Chernyshev M.V., Guzeev M.A., Shemyakova T.S., Ekimova I.V.* Signs of sleep and behavior disorders indicating the initial stage of neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. J. Evol. Biochem. Physiol. 53(5): 431–434. 2017.

37. *Pastukhov Y.F., Simonova V.V., Shemyakova T.S., Guzeev M.A., Polonik S.G., Ekimova I.V.* U-133, a heat shock proteins inducer, precludes sleep disturbances in a model of the preclinical stage of Parkinson's disease in aged rats. Adv. Gerontol. 32(6): 935. 2019.

38. *Calderwood S.K., Murshid A., Prince T.* The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging. Gerontology. 55(5): 550–558. 2009.

39. *Shemesh N., Ben-Zvi A.* HSF1 Regulation in Aging and Its Role in Longevity. Heat Shock Factor. 93–113. 2016.

40. *Chesnokova A.Y., Ekimova I.V., Pastukhov Y.F.* Parkinson's Disease and Aging. Adv. Gerontol. 9(2): 164–173. 2019.

41. *Yu W.W., Cao S.N., Zang C.X., Wang L., Yang H.Y., Bao X.Q., Zhang D.* Heat shock protein 70 suppresses neuroinflammation induced by α-synuclein in astrocytes. Mol. Cell. Neurosci. 86: 58–64. 2018.

42. *Guzhova I.V., Darieva Z.A., Melo A.R., Margulis B.A.* Major stress protein Hsp70 interacts with NF-kB regulatory complex in human T-lymphoma cells. Cell Stress Chaperones. 2(2): 132. 1997.

43. *Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. Nat. Med. 6(4): 435–442. 2000.

44. *Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray P.J., Theriault J.R.* Extracellular heat shock proteins in cell signaling. FEBS Lett. 581(19): 3689–3694. 2007.

45. *Tunesi M., Raimondi I., Russo T., Colombo L., Micotti E., Brandi E., Cappelletti P., Cigada A., Negro A., Ambrosio L., Forloni G., Pollegioni L., Gloria A., Giordano C., Albani D.* Hydrogel-based delivery of Tat-fused protein Hsp70 protects dopaminergic cells in vitro and in a mouse model of Parkinson's disease. NPG Asia Mater. 11(1): 1–15. 2019.

46. *Plaksina D.V., Ekimova I.V.* Age-Related Features of α-Synuclein Pathology in the Brain on Modeling the Preclinical Stage of Parkinson's Disease in Rats. Neurosci. Behav. Physiol. 50(1): 109–114. 2020.

47. *Ma K.L., Song L.K., Yuan Y.H., Zhang Y., Han N., Gao K., Chen N.H.* The nuclear accumulation of alpha-synuclein is mediated by importin alpha and promotes neurotoxicity by accelerating the cell cycle. Neuropharmacology. 82: 132–142. 2014.

48. *Raiss C.C., Braun T.S., Konings I.B.M., Grabmayr H., Hassink G.C., Sidhu A., Le Feber J., Bausch A.R., Jansen C., Subramaniam V., Claessens M.M.A.E.* Functionally different α-synuclein inclusions yield insight into Parkinson's disease pathology. Sci. Rep. 6(1): 1–13. 2016.

49. *Bao X.Q., Wang X.L., Zhang D.* FLZ Attenuates α-Synuclein-Induced Neurotoxicity by Activating Heat Shock Protein 70. Mol. Neurobiol. 54(1): 349–361. 2017.

50. *Anderson J.P., Walker D.E., Goldstein J.M., De Laat R., Banducci K., Caccavello R.J., Barbour R., Huang J., Kling K., Lee M., Diep L., Keim P.S., Shen X., Chataway T., Schlossmacher M.G., Seubert P., Schenk D., Sinha S., Gai W.P., Chilcote T.J.* Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α-synuclein in familial and sporadic lewy body disease. J. Biol. Chem. 281(40): 29739–29752. 2006.

51. *Sato H., Arawaka S., Hara S., Fukushima S., Koga K., Koyama S., Kato T.* Authentically phosphorylated α-synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease. J. Neurosci. 31(46): 16884–16894. 2011.

52. *Xie L., Kang H., Xu Q., Chen M.J., Liao Y., Thiyagarajan M., O'Donnell J., Christensen D.J., Nicholson C., Iliff J.J., Takano T., Deane R., Nedergaard M.* Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. Science. 342(6156): 373–377. 2013.

Efficiency of Preventive Therapy with Chaperon Inducer U133 in the Model of Preclinical Stage of Parkinson's Disease in Elderly Rats

D. V. Belan[a], *, S. G. Polonik[b], and I. V. Ekimova[a]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia*

[b] *Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Vladivostok, Russia*

**e-mail: daf205@yandex.ru*

Parkinson's disease (PD) is a chronic steadily progressing neurodegenerative disease with a predominant lesion of nigrostriatal dopamine (DA-)ergic brain neurons. PD is an incurable disorder, which mostly affects the elderly. Misfolding and hyperphosphorylation of the α-synuclein protein, as well as the development of chronic neuroinflammation, are the main links in the pathogenesis of neurodegeneration in PD. Pharmacotherapy aimed at mobilizing the stress-inducible chaperone Hsp70, which plays a key role in protein quality control and possess immunomodulating activity, seems to be promising for the development of preventive therapy for PD. In the present study, we used a model of the preclinical stage of PD in elderly rats created by intranasal administration of a proteasome inhibitor lactacystin. A therapy based on the systemic administration of the chaperone inducer Hsp70, a low molecular weight quinoid compound U133 (acetylated 2,3,7-tris-O-glucoside echinochrome), was applied in the model of PD. We showed that the compound U133 causes a delayed increase in the Hsp70 content in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in elderly animals. Preventive Hsp70-inducing therapy with U133 in the model of preclinical stage of PD in elderly rats weakened the process of neurodegeneration in SNpc and counteracted the development of neuroinflammation. At the same time, there was a decrease in the amount of aggregated α-synuclein and regression of post-translationally modified α-synuclein, phosphorylated at Ser129. The data obtained indicate that the prodrug, the small molecule, derivative of echinochrome U133 has significant therapeutic potential in the Parkinson-like pathology in elderly age. The results of the study are of scientific and practical importance for the development of innovative technology for preventive PD pharmacotherapy based on the domestic drug U133.

Keywords: Parkinson's disease, neuroinflammation, α-synuclein aggregate, phosphorylated α-synuclein, quinoid compound U133, substantia nigra, elderly rat

ЦИТИРОВАТЬ:

Белан Д.В., Полоник С.Г., Екимова И.В. Оценка эффективности превентивной терапии с индуктором шаперонов U133 в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1251–1265.

DOI: 10.31857/S0869813920100027

TO CITE THIS ARTICLE:

Belan D.V., Polonik S.G., Ekimova I.V. Efficiency of Preventive Therapy with Chaperon Inducer U133 in the Model of Preclinical Stage of Parkinson's Disease in Elderly Rats. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1251–1265.

DOI: 10.31857/S0869813920100027

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1266–1277

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ ПРИ РАЗВИТИИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

© 2020 г.
И. В. Кубасов[1, *], О. В. Чистякова[1], И. Б. Сухов[1], А. А. Панов[1], М. Г. Добрецов[1]

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

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

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.
После доработки 05.05.2020 г.
Принята к публикации 30.05.2020 г.

С использованием метода внеклеточной микроэлектродной регистрации (loose patch метод) были исследованы левые желудочки изолированных сердец контрольных крыс (n = 7) и крыс, инъецированных стрептозотоцином в дозе 30–45 мг/кг массы тела (СТЗ крысы, n = 21).Через 4 нед. после инъекции стрептозотоцина сахарный диабет развился у 3-х крыс (СТЗ-СД крысы; содержание случайной глюкозы в крови больше 11 мМ). Оставшиеся 18 крыс сохранили нормогликемичность (СТЗ-НГ; уровень случайной глюкозы в крови меньше 11 мМ). Было показано, что в сердцах как контрольных, так и СТЗ крыс регистрируются два типа внеклеточно регистрируемых потенциалов действия: сигналы, представленные одним или двумя негативными пиками (ПД1 и ПД2 соответственно). Временные характеристики ПД1 были сходны во всех исследованных группах животных. Однако время полуспада ПД2, регистрируемых от СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс, статистически значимо превышали аналогичные значения ПД2 контрольных животных. В 28% СТЗ-НГ и 67% СТЗ-СД сердец крыс дополнительно регистрировались аномальные потенциалы действия 3-го типа (ПД3). Их характерной особенностью была затянутая во времени и сложная негативная фаза, представляющая собой агломерат из трех-четырех пиков, и присутствие выраженной фазы следовой гиперполяризации. Появление ПД3 было связано с уменьшением числа регистрируемых ПД2 (с 80–85% до 55–60%). Встречаемость ПД1 оставалась постоянной (15–20%), вне зависимости от присутствия или отсутствия ПД3. Предположительно, наблюдаемые электрофизиологические изменения связаны с ремоделированием Т-системы вентрикулярных кардиомиоцитов СТЗ животных. Вне зависимости от справедливости данного предположения, представляется важным, что начало изменений в электрогенезе кардиомиоцитов фиксируется не только у СТЗ-СД крыс, но и у СТЗ-НГ животных с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови, что соответствует стадии раннего предиабета.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, предиабет, диабетическая кардиомиопатия, кардиомиоцит, потенциал действия, Т-система

DOI: 10.31857/S0869813920100052

Сахарный диабет (СД) является самым распространенным метаболическим заболеванием в мире, а диабетическая кардиомиопатия – ведущей причиной сердечной недостаточности и высокой смертности среди пациентов с СД [1–3]. Риск сер-

дечной недостаточности начинает нарастать с самых ранних стадий СД, что, основываясь на имеющихся данных литературы, может быть связано со структурно-функциональными изменениями в Т-системе кардиомиоцитов. Т-система представляет собой сеть поперечных инвагинаций поверхностной мембраны миоцита внутрь клетки (t-трубочки), обеспечивающих синхронность и мощность мышечного сокращения. Так, существует множество подтверждений того, что структурные (дилатация t-трубочек и закрытие их выходов на поверхность клетки) и функциональные (изменение в активности специфических для t-трубочек ионных каналов и транспортеров) нарушения в Т-системе представляют универсальную и раннюю стадию патогенеза кардиомиопатий различной этиологии, в том числе и диабетической [4–11]. По крайней мере по двум причинам вопрос о действительной роли перестроек в Т-системе кардиомиоцитов в развитии диабетической кардиомиопатии остается открытым. Во-первых, это связано со сложностями функциональных исследований (изучение активности ионных каналов и транспортеров мембраны t-трубочек) в этом компартменте кардиомиоцита. Рутинно используемые электрофизиологические регистрации с помощью крупных внеклеточных электродов и внутриклеточные регистрации характеризуют интегральную электрическую активность агломератов клеток или всей цитоплазматической мембраны клетки соответственно без возможности дискриминации электрогенных механизмов, локализованных в поверхностной мембране и в мембране Т-системы кардиомиоцита. Кроме того, эксперименты с внутриклеточной регистрацией токов или потенциалов обычно проводятся на изолированных из нормального окружения клетках сердца, что еще более ограничивает интерпретацию результатов этих исследований. Оптико-флуоресцентные исследования с использованием потенциалчувствительных мембранных красителей также требуют изоляции клеток и трудоемки [12]. Во-вторых, хотя клинические данные строго указывают на то, что патогенез диабетической кардиомиопатии начинается на доклинических стадиях СД (предиабет) [11, 13], кардиология этих стадий практически не изучена на соответствующих животных моделях.

С учетом вышесказанного, основная фундаментальная задача предлагаемого исследования состояла в получении данных о функциональных изменениях в t-трубочках кардиомиоцитов в составе изолированного сердца крысы на ранних (1 мес.) сроках стрептозотоцинового диабета и предиабета (последний был определен как состояние нормогликемии или умеренной гликемии, уровень случайной глюкозы на момент начала экспериментов не достигающий 11 мМ). Для дискриминационного анализа электрогенеза поверхностной мембраны и мембраны t-трубочек кардиомиоцитов использовался апробированный нами ранее метод внеклеточной регистрации потенциалов действия (ПД) с использованием стеклянных электродов с тонким кончиком (loose patch метод). Ранее в данной методике с использованием фармакологических и оптико-флуоресцентных методов, а также компьютерно-графического моделирования было выявлено 2 типа внеклеточно регистрируемых ПД в желудочках крысы. ПД 1-го типа (быстрые однопиковые ответы) регистрировались в участках мембраны кардиомиоцитов, не содержащих выходов устьев t-трубочек и формировались, в основном, за счет натриевых токов. ПД 2-го типа представляли собой ответы с двумя выраженными пикам, формируемыми как натриевыми токами наружной мембраны, так и кальциевыми токами мембраны тубулярного компартмента [12, 14]. В соответствии с этим выбранный метод позволяет достаточно просто охарактеризовать и выполнить первичный анализ изменений в электрогенезе t-трубочек по форме ПД2.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего было исследовано 28 крыс (самцы линии Вистар, масса 230–430 г, возраст 3–6 мес.). Из них 21-й особи случайно выбранных крыс был инъецирован панкреатический токсин – стрептозотоцин (СТЗ, СТЗ группа), растворенный в цитратном буфере (pH 6.0, интраперитонеально в дозе 30–45 мг/кг массы тела), а оставшиеся 7 животных получили инъекцию эквивалентного объема буфера (контроль). Диабетический статус животных определялся на основании измерений в крови уровня случайной глюкозы (СГ), определяемого независимо от времени предыдущего приема пищи в последний, 28-й день эксперимента. Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания).

Электрофизиологические эксперименты проводили на левых желудочках (ЛЖ) изолированных сердец крыс в условиях сохраненного синусового ритма, при постоянной перфузии аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа. Животных анестезировали с помощью раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего сердце извлекали и помещали на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой микроэлектродной регистрации [12]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный раствор Тироде следующего состава (в мМ): 140 NaCl, 4.5 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 глюкоза, pH 7.2–7.4. Устранение сократительных ответов сердца обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФ-азы 2,3-бутандион моноксима в концентрации 20 мМ. В течение эксперимента температуру перфузирующего раствора поддерживали на постоянном уровне (36–37°C) с помощью автоматического контроллера TC-324 (Warner Instruments, США). Удаление из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществляли через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору.

Для изготовления микроэлектродов с наружным диаметром кончика ~5.0 мкм использовали боросиликатные стеклянные капилляры BF150-86-10 и программируемый пуллер (модель P-1000, Sutter Instruments, США). Сопротивление кончика микроэлектрода, заполненного раствором Тироде, составляло около 2 МОм. Микроэлектрод, подключенный к входу усилителя AM-1500 (National Instruments, США), подводили к поверхности сердца при помощи микроманипулятора Sensapex (Финляндия). Запись данных, хранение и обработку производили при помощи аналого-цифрового преобразователя NIUSB-6211 (National Instruments, США) и программного пакета Clampfit и Origin-7.5. При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода с поверхностью желудочка сердца регистрировали авторитмические систолические внеклеточные ПД с частотой в диапазоне 0.3–1 Гц. Длительность непрерывной регистрации ответов от конкретного сайта по времени могла составлять более часа. После регистрации 10–20-ти последовательных внеклеточных ПД кардиомиоцитов от данного сайта кончик микропипетки перемещали с шагом 50–100 мкм в соседний сайт данного локуса поверхности желудочка. Размер каждого локуса составлял ≈500 × 500 мкм. В среднем в каждом эксперименте выполнялось картирование 5–10 локусов с аналогичным числом регистрируемых сайтов в пределах исследуемого локуса. Длительность восходящей фазы (Тв) сигналов измерялась от базовой линии до вершины их первого негативного (и в случае простых сигналов единственного) пика. Параметры реполяризации сложных сигналов (Т50 и Т90), содержащих два или более негативных пиков, всегда были измерены в отношении последнего из этих пиков. Соответственно на всех рисунках представлены ПД, нормализованные к амплитуде их негативного пика или последнего из негативных пиков. Схема измерения и типичные примеры записей нормализованных внеклеточных ПД, полученных от различных сайтов в одном из

локусов левого желудочка контрольного сердца, представлены на рис. 1. Полученные данные проверяли на нормальность распределения (критерий Шапиро–Уилка). Последующий статистический анализ проводили в соответствии с результатами этой проверки, используя параметрические или непараметрические тесты. Статистически значимыми считали различия данных при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

До начала эксперимента для всех 28 исследованных животных средняя величина содержания случайной глюкозы ($СГ_0$) в крови составляла 5.4 ± 0.1 мМ. $СГ_{28}$, глюкоза, измеренная на последний, 28-й день эксперимента в контрольной группе животных не отличалась от $СГ_0$, составляя в среднем 5.4 ± 0.2 мМ ($n = 7$). Используя 11.1 мМ СГ как нижний предел для определения СД, только 3 из 21 СТЗ крыс (14%) развили СД и были отнесены к группе СТЗ-СД крыс. Остальные СТЗ крысы составляли группу, в которой $СГ_{28}$ колебалась в пределах значений, характерных для нормогликемии и умеренной гипергликемии (5.6–7.1 мМ, нижний и верхний 95%-ный доверительный интервалы). Эти животные были отнесены к группе СТЗ-нормогликемичных крыс (СТЗ-НГ). Средние значения $СГ_{28}$ СТЗ-СД и СТЗ-НГ крыс составляли 22 ± 4 ($n = 3$) и 6.4 ± 0.4 мМ ($n = 18$) соответственно. Только СТЗ-СД группа достоверно отличалась от контроля по этому параметру (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки для множественных сравнений; величины $СГ_{28}$ были нормально распределены в контрольной и СТЗ-НГ группах, и их нормальное распределение было предположено для маленькой по объему СТЗ-СД выборки).

В электрофизиологических экспериментах внеклеточные ПД, регистрируемые от вентрикулярных кардиомиоцитов сердца контрольных крыс, представляли собой сигналы двух типов. Первый тип сигналов (ПД1 сигнал, характеризующийся наличием одного быстрого негативного пика), встречался относительно редко (рис. 1*B*, a, левый трек, 15% регистраций). Значительно чаще регистрировались ПД 2-го типа (ПД2, 85% регистраций), которые характеризовались наличием двух выраженных негативных пиков: первого – быстрого, и второго – сильно варьирующего от сайта к сайту как по амплитуде, так и по длительности пика (рис. 1*A*, b, c).

Как и в контрольных экспериментах, в большинстве экспериментов на сердцах СТЗ животных, выполненных через 1 мес. после инъекции СТЗ (25 крыс), единственными регистрируемыми сигналами были ПД1 и ПД2. Временные характеристики ПД1 (время развития до пика или длительность восходящей фазы, Тв), время реполяризации до 50 (T_{50}) и 90 (T_{90}) % от пика к базовой линии и процент встречаемости этих сигналов не различались между контрольными, СТЗ-НГ, и СТЗ-СД животными. Процентное соотношение регистрируемых ПД1 и ПД2 также было сходно между этими группами животных. Интересно, что длительность реполяризации ПД2 у СТЗ-НГ (T_{50}) и СТЗ-СД (T_{50} и T_{90}) были достоверно больше, чем соответствующие характеристики ПД2 контрольных крыс (табл. 1).

В ярко выраженном различии с контрольными крысами у части СТЗ-НГ и еще чаще у СТЗ-СД крыс, наряду с описанными выше ПД1 и ПД2 (рис. 2*A*, *B*) регистрировались также аномальные внеклеточные ПД, характерной особенностью которых была затянутая во времени и сложная негативная фаза, представляющая собой агломерат из трех–четырех пиков – ПД 3-го типа (ПД3, рис. 2*C*).

Такие аномальные ПД3 были зарегистрированы у 5-ти из 18-ти исследованных СТЗ-НГ крыс и у двух из трех исследованных сердец СТЗ-СД животных (28 и 67% соответственно), но ни в одном из сердец контрольных крыс (табл. 2).

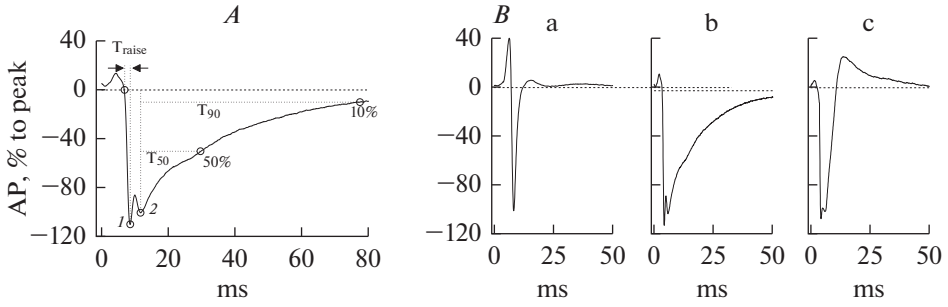


Рис. 1. Иллюстрация измерения временных параметров внеклеточных ПД (*A*) и примеры вариации формы ПД (*B*, a–c), зарегистрированных в разных сайтах одного локуса левого желудочка одного сердца контрольной крысы.

Схема измерения временных параметров ПД (*A*) дана на примере сигнала с двумя негативными пиками (метки 1 и 2). Длительность восходящей фазы сигнала измерена от начала первого негативного пика сигнала (точка пересечения сигнала с базовой линией – горизонтальная штриховая линия) до вершины этого пика (Traise). Полуспад (T50) и спад сигнала до 10% (T90) от исходной величины рассчитаны по отношению к пиковой величине второго (последнего для данного ПД) негативного пика сигнала.

Fig. 1. Measurement of temporal characteristics of extracellular AP (*A*) and examples of variability of AP waveforms (*B*, a–c) recorded from different sites within a given locus of the left ventricle of given control rat heart. Schematic representation of measurement of temporal characteristics of AP (*A*) is given using AP waveform having two distinct negative peaks (labels 1 and 2). Duration of the signal raising time (Traise) is determined as the time from the onset (intersection with the baseline- horizontal dashed line) to the top of the signal waveform's first negative peak. Times to the 50% (T50) and 90% (T90) decay are measured with respect to the second (and last for the given AP) negative peak of the signal waveform.

Кроме того, сравнение значений, приведенных в табл. 1 и 2, показывает, что появление ПД3 в регистрациях в сердцах СТЗ-НГ и СТЗ-СД происходит в основном за счет сокращения доли регистрируемых в этих сердцах ПД2 (с 80–84% до 54–58%), тогда как фракция ПД1 остается практически неизменной (15-20%). Обращает также на себя внимание и то, что T_{50} ПД2 и ПД3 во всех рассмотренных группах СТЗ-НГ и СТЗ-СД всегда достоверно превышает T_{50} ПД2 контрольных животных (9.4 ± 0.4) в 1.5–2 раза, а T_{90} в большинстве групп животных либо превышает, либо достоверно не отличается от соответствующего параметра в контроле. Однако это не так в случае с T_{90} ПД3 СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс. По сравнению с T_{90} у ПД2 контрольных крыс T_{90} ПД3 СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс короче примерно на 30 и 50% соответственно (в последнем случае различия статистически достоверны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Патогенез диабетической кардиомиопатии остается малоизучен. Развившие хроническую гипергликемию после инъекции панкреатического токсина СТЗ грызуны представляют собой классическую модель СД первого типа (инсулин-зависимого СД), позволяя изучать многие осложнения диабета этого типа [15]. В том числе эти животные развивают и многие признаки диабетической кардиомиопатии, включая нарушения в электрической активности кардиомиоцитов [16]. В этом отношении абсолютно новым результатом нашей работы представляется документация изменений в электрогенезе кардиомиоцитов не только у СТЗ-СД крыс, но и у

Таблица 1. Параметры ПД1 и ПД2, регистрируемых в экспериментах, где наблюдались только эти два типа сигналов
Table 1. Parameters of AP1 and AP2 recorded in experiments in which no other types of signals were observed

Отношение числа животных, где единственными регистрируемыми сигналами были ПД1 и ПД2, к общему количеству животных в исследуемой группе Number of experiments in which AP1 and AP2 were the only recorded signals/total number of animals studied within given group	ПД1 % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP1 % of total numbe of recordings and temporal signal characteristics, ms	ПД2$ % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP2 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms
Контроль 7/7 крыс, 340 регистраций ПД Control 7/7 rats 340 AP recordings	16% Тв 2.4 ± 0.3 T_{50} 3.9 ± 0.2 T_{90} 7.7 ± 0.2	84% Тв 4.1 ± 0.2 T_{50} 9.4 ± 0.4 T_{90} 31.6 ± 1.3
СТЗ-НГ 13/18 крыс, 261 регистраций ПД STZ-NG 13/18 rats 261 AP recordings	18% Тв 2.9 ± 0.3 T_{50} 3.8 ± 0.2 T_{90} 7.0 ± 0.2	82% Тв 4.6 ± 0.3 T_{50} 12.1 ± 0.7* T_{90} 34.1 ± 1.8
СТЗ-СД 1/3 крыса 53 регистрации ПД STZ-DM 1/3 rats 53 AP recordings	20% Тв 2.9 ± 0.7 T_{50} 4.0 ± 0.5 T_{90} 6.7± 0.5	80% Тв 5.4 ±0.8 T_{50} 18.5 ± 2.2* T_{90} 48.9 ± 6,2*

* – достоверность отличия средних значений по выборке от контроля (дисперсионный анализ Крускала и Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений);
$ – параметры реполяризации сложных сигналов (T_{50} и T_{90}), содержащих два или более негативных пиков всегда измерены в отношении последнего из этих пиков.
* – indicate statistically significant difference of the group mean value from control (Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by the Dunn's multiple comparisons test);
$ – characteristics of repolarization (T_{50} и T_{90}) of signals having two or more negative peaks are measured with respect of the last of these peaks.

СТЗ животных с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови – состояние, которое соответствует стадии предиабета [15].

Внеклеточные ПД кардиомиоцитов регистрировали в этой работе с использованием стеклянных электродов с тонким (5 мкм) кончиком. В соответствии с нашими предыдущими исследованиями с использованием этого метода [12], в сердцах контрольных животных регистрировались сигналы двух, различных по количеству негативных пиков, типов ПД: ПД1 и ПД2. Все имеющиеся данные, касающиеся техники внеклеточной регистрации, структурной организации Т-системы кардиомиоцитов желудочков сердца и распределения различных ионных каналов и электрогенных транспортеров в поверхностной мембране и в мембране Т-системы кардиомиоцита (см. детали в [12]), свидетельствуют в пользу того, что тип внеклеточно регистрируемых ПД (в наших условиях) определяется, в основном, позицией кончика регистрирующего электрода на поверхности кардиомиоцита по отношению к позиции выходов (устьев) t-трубочек. А именно, ПД1 регистрируются в тех случаях, когда электрод был помещен в локус клетки, не содержащий устьев t-трубочек, и, соответственно, его основной негативный пик формируется токами, генерируемыми электрогенными механизмами поверхностной мембраны клетки: в основ-

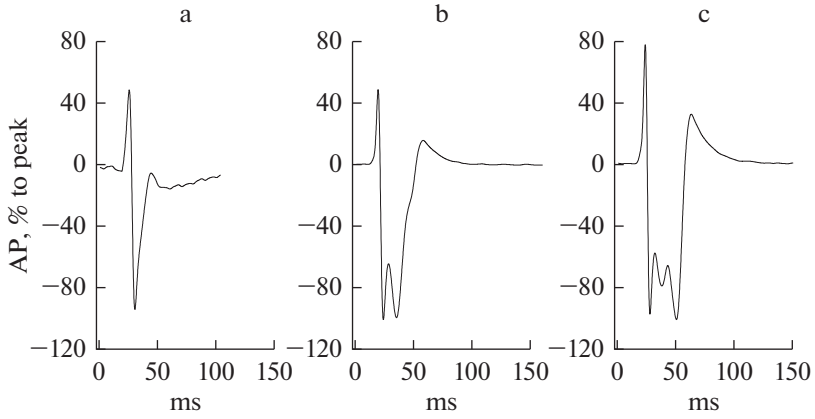


Рис. 2. Примеры индивидуальных записей ПД 1-го (*A*), 2-го (*B*) и 3-го (*C*) типов, полученных от различных сайтов в пределах одного локуса на поверхности левого желудочка СТЗ-НГ крысы.

Fig. 2. Examples of individual recordings of type 1 (*A*), 2 (*B*) and 3 (*C*) AP waveforms obtained in different sites within a single locus on the surface of left ventricle of STZ-NG rat.

ном, натриевым и калиевым токами через соответствующие потенциал-чувствительные каналы. В том же случае, если кончик регистрирующей пипетки перекрыл территорию поверхности миоцита, содержащую одно или более устьев t-трубочек, регистрируется более сложный ПД2 сигнал, в котором присутствие второго негативного пика отражает активность электрогенных механизмов, локализованных в мембране Т-системы кардиомиоцита. Это в первую очередь Ca^{2+}-каналы L-типа, Na^{+}–Ca^{2+}-обменник и некоторые подтипы K^{+}-каналов [17, 18]. В связи с этой интерпретацией интересно, что, согласно полученным результатам, именно временные характеристики ПД2, но не ПД1, оказываются измененными в кардиомиоцитах сердец СТЗ-СД и СТЗ-НГ крыс. Так, сбалансированная активность электрогенных механизмов именно Т-системы представляется более чувствительной к диабетическому и/или предиабетическому состоянию крысы, чем поверхностной мембраны кардиомиоцитов. Работа каких конкретно ионных механизмов претерпевает изменения, приводя к продлению спада ПД2, остается еще выяснить. Однако подобный феномен наблюдался и в исследованиях с внутриклеточной регистрацией ПД кардиомиоцитов, изолированных из сердец крыс с 1–4-х недельным СТЗ-СД. В этих исследованиях затягивание спада внутриклеточно регистрируемых ПД было отнесено к инсулиновой недостаточности и связанным с ней подавлении выходящих калиевых токов задержанного выпрямления: Ito (transient outward), Iss (steady-state) и I_K (fast and slow delayed rectifiers) [19–22]. Все эти токи принимают участие в регуляции длительности плато ПД и реполяризации кардиомиоцита. Интересно также, что существуют свидетельства преимущественной локализации каналов, ответственных за эти токи в Т-системе кардиомиоцита [17, 18]. Этот механизм хорошо подходит и для объяснения наших данных – затягивание спада ПД2 при отсутствии изменения во временных параметрах ПД1, зависимость которых от электрогенеза Т-системы должна быть минимальна. Важной находкой нашего исследования является регистрация в сердцах СТЗ-НГ и еще чаще в сердцах СТЗ-СД крыс аномальных внеклеточных ПД, которые никогда не встречаются в исследованиях контрольных сердец (ПД-3-го типа, рис. 2). Характерной особенностью ПД3 является сложная негативная фаза, представляющая собой агломерат из по крайней мере

Таблица 2. Параметры ПД, регистрируемых в экспериментах, в которых в дополнение к ПД1 и ПД2 встречался также и ПД3-тип сигналов
Table 2. Parameters of APs, recorded in experiments, in addition to AP1 and AP2, type 3 waveform-signals (AP3) could be recorded

Эксперименты с регистрацией ПД1, ПД2 и ПД3 типа сигналов Experiments in which all three types of APs were recorded/total number of animals per group	ПД1 % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP1 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms	ПД2$ % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP2 % of total number of recording and temporal signal characteristics, ms	ПД3$ % к общему числу регистраци и временные параметры, мс AP3 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms
СТЗ-НГ	21%	54%	25%
5/18 крыс 134 регистрации ПД STZ-NG 5/18 rats 134 AP recordings	Тв 2.7 ± 0.4 T_{50} 3.2 ± 0.4 T_{90} 7.9 ± 0.3	Тв 3.9 ± 0.4 T_{50} 15.1 ±1.0* T_{90} 32.2 ± 1.9	Тв 2.2 ± 0.2* T_{50} 15.1 ±1.3* T_{90} 22.5 ± 1.3
СТЗ-СД	15%	58%	27%
2/3 крыс 141 регистрация ПД STZ-DM 2/3 rats 141 AP recordings	Тв 2.8 ± 0.6 T_{50} 3.9 ± 0.4 T_{90} 6.8± 0.5	Тв 4.3 ± 0.4 T_{50} 16.8 ± 1.3* T_{90} 37.1 ± 3.5	Тв 2.9 ± 0.3 T_{50} 10.1 ± 0.8 T_{90} 15.7 +1.2*

* – достоверность отличия средних значений по выборке от контроля (см. табл. 1). Параметры ПД3 сравнены с соответствующими параметрами ПД2 контрольных крыс (дисперсионный анализ Крускала и Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений);
$ – параметры реполяризации сложных сигналов (T50 и T90), содержащих два или более негативных пиков, всегда измерены в отношении последнего из этих пиков.
* – indicate statistically significant difference between given group and control AP2 group mean values (see Table1; Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by the Dunn's multiple comparisons test);
$ – characteristics of repolarization (T_{50} и T_{90}) of signals having two or more negative peaks are measured with respect of the last of these peaks.

трех выраженных пиков, и постоянное присутствие отчетливой позитивной фазы пост-гиперполяризации, ведущей, в частности, к укорочению T_{90} ПД3 сигналов. Появление ПД3 в регистрациях в сердцах СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс сопровождается сокращением доли регистрируемых в этих сердцах ПД 2-го типа (с 80–86 до 25–27%), тогда как фракция ПД1 остается практически неизменной (14–21%). Это означает, что число выходов устьев t-трубочек на поверхность кардиомиоцита на данном этапе развития диабета (1 мес.) не меняется. Однако дезорганизация тубулярной системы может начинаться с нижележащих отделов t-трубочек и отражается в появлении характерных аномальных ПД 3-го типа, не встречающихся в контроле. При этом значительная часть подобных изменений наблюдается и у нормогликемических крыс (СТЗ-НГ группа), когда СД не развился до клинических значений. Такую группу можно охарактеризовать как предиабетическую. Как альтернативный вариант, приведенные факты могут указывать и на то, что функциональные изменения тубулярной мембраны могут опережать структурные. Исходя из этого, есть основания полагать, что ПД 3-го типа представляют собой трансформацию ПД 2-го типа и, соответственно, результат дальнейшего ремоделирования Т-системы кардиомиоцитов. Появление дополнительного негативного пика при предполагаемой трансформации ПД2 в ПД3 очень напоминает феномен так называемой ранней пост-деполяризации (early afterdepolarization, EAD) или вторичной деполяризации, непосредственно предшествующей окончательной реполяризации клетки при ряде сердечных патологий. По мнению многих авторов, этот клеточный феномен является результатом реактивации Ca^{2+}-каналов кардиомиоцитов и пред-

вестником развития желудочковой тахикардии. Подавление выходящего K^+-тока с последующим замедлением реполяризации клетки вполне может создать все необходимые условия для возникновения таких регенеративных волн Ca^{2+}-тока [23, 24].

Другой феномен, электрогенез которого требует отдельного анализа – это следовая гиперполяризация, которая выражена в части ПД2 нормальных кардиомиоцитов (рис. 1*B*, *C*) и универсально присутствует во всех ПД2 и ПД3 в СТЗ группах (рис. 2). Эту фазу обычно связывают с активацией K^+-каналов и, хотя и в меньшей мере, с активацией других механизмов следовой гиперполяризации, таких как активность хлорных каналов, электрогенный транспорт ионов Na, K-АТФазой или натрий-кальциевым обменником (в реверсированной модальности) [23]. Что касается роли калиевых каналов, здесь надо учесть два момента. Первое, как обсуждалось выше, по крайней мере три типа калиевой проводимости подавлены в сердцах грызунов с экспериментальным диабетом: Ito, Iss и I_K (fast and slow delayed rectifiers) [19–22]. Второе, в нормальных условиях мембранный потенциал покоя и потенциал реверсии для K^+ кардиомиоцитов очень близки друг к другу и, по крайней мере в отношении к кардиомиоцитам сердца крысы, кратковременный (1–4 нед.) СД не изменяет этого баланса [19, 25]. Таким образом, какое-либо существенное участие активации K^+-проводимости в формировании следовой гиперполяризации представляется маловероятным. Одновременно с этим показано, что у диабетических крыс дополнительно экспрессируются медленные Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы с малой проводимостью (SK) [26]. SK экспрессируются в сердце в виде 3-х изоформ – SK1, SK2, SK3 [27]. Ток через эти каналы (IKCa) не зависит от напряжения, активируется внутриклеточным Ca^{2+} (0.6–0.7 мМ) [28] и избирательно блокируется апамином – белком, входящим в состав пчелиного яда [29]. Значение и роль SK в реполяризации остаются недостаточно изученными, а имеющиеся данные – противоречивыми. Например, IKCa в вентрикулярных миоцитах укорачивает реполяризацию и способствует периинфарктной аритмии у крыс [30]. И наоборот, блокада IKCa способствует желудочковой аритмии с сердечной недостаточностью как у человека, так и у ряда животных моделей [31], включая кролика [32]. Из оставшихся возможностей гиперактивация АТФ-зависимого K^+ канала, связанная с истощением клеточных запасов АТФ, также представляется как заслуживающая внимательного рассмотрения.

Следует отметить, однако, что приведенные выше данные были получены в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах, что ставит вопрос о селективном отборе во время процедуры изоляции наиболее “здоровых”, включая способность к поддержанию нормальных ионных градиентов, клеток. Действительно, СТЗ-диабет ведет к практически двукратному снижению выживаемости вентрикулярных миоцитов крысы при их энзиматической изоляции [33]. Вне сомнения, с этой точки зрения эксперименты на препарате интактного сердца более представительны, чем эксперименты, использующие культуру клеток.

В заключение, полученные результаты демонстрируют, что краткосрочный СД 1-го типа приводит к увеличению длительности внеклеточных ПД2 и появлению аномальных ПД3, регистрируемых от эпикардиальных миоцитов сердца крыс. Более того, подобные электрофизиологические отклонения обнаруживаются уже в исследованиях сердец СТЗ животных с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови. Последнее предполагает, что патогенез сердечных осложнений СД может начинаться во время предиабета, и хроническая гипергликемия не является единственным этиологическим фактором этих осложнений. Роль преходящей гипергликемии и/или умеренной инсулиновой недостаточности требует дальнейшего исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-015-00139 при частичной поддержке государственного задания № 075-00776-19-02.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с подопытными животными, утвержденными этическим комитетом ИЭФБ РАН (30.12.2015 г.), и согласно требованиям Директивы Европейского парламента (1986 г.). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дедов И.И., Александров А.А.* Диабетическое сердце: causa magna. Сердце: журн. для практикующих врачей. 3(1): 5–8. 2004. *Dedov I.I., Alexandrov A.A.* Diabetic Heart: causa magna. Heart: J. Pract. Physicians. 3(1): 5–8. 2004 (In Russ)].
2. *Калашников В.Ю., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А., Бондаренко И.З., Шестакова М.В., Дедов И.И.* Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний у больных сахарным диабетом, по данным федерального регистра Российской Федерации (2013–2016 гг.). Сахарный диабет. 22(2): 105–114. 2019. *[Kalashnikov V.Y., Vikulova O.K., Zheleznyakova A.V., Isakov M.A., Bondarenko I.Z., Shestakova M.V., Dedov I.I.* Epidemiology of cardiovascular diseases among patients with Diabetes Mellitus according to the Federal Diabetes Register of the Russian Federation (2013–2016). Diabetes Mellitus. 22(2): 105–114. 2019. (In Russ)].
https://doi.org/10.14341/DM10167
3. *Малишевская А.С.* Сахарный диабет 1 типа и сердечная недостаточность. Мед. наука и образование Урала. 19(2): 172–177. 2018. [*Malishevskaya A.S.* Type 1 Diabetes Mellitus and cardiac failure. Med. Sci. and Education of Ural. 19(2): 172–177. 2018 (In Russ)].
4. *Celentano A., Vaccaro O., Tammaro P., Galderisi M., Crivaro M., Oliviero M., Imperatore G., Palmieri V., Iovino V., Riccardi G., de Divitiis O.* Early abnormalities of cardiac function in non-insulin-dependent diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. Am. J. Cardiol. 76: 1173–1176. 1995.
5. *Ren J., Sowers J.R., Walsh M.F., Brown R.A.* Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279: H1708–H714. 2000.
6. *Belke D.D., Swanson E.A., Dillmann W.H.* Decreased Sarcoplasmic Reticulum Activity and Contractility in Diabetic db / db Mouse Heart. Diabetes 53: 3201–3208. 2004.
7. *Giunti S., Bruno G., Veglio M., Gruden G., Webb D.J., Livingstone S., Chaturvedi N., Fuller J.H., Perin P.C.* Electrocardiographic Left Ventricular Hypertrophy in Type 1 Diabetes. Diabetes Care. 28: 2255–2257. 2005.
8. *Kralik P.M., Ye G., Metreveli N.S., Shem X., Epstein P.N.* Cardiomyocyte dysfunction in models of type 1 and type 2 diabetes. Cardiovasc. Toxicol. 5: 285–292. 2005.
9. *Castagno D., Baird-Gunning J., Jhund P.S., Biondi-Zoccai G., MacDonald M.R., Petrie M.C., Gaita F., McMurray J.J.* Intensive glycemic control has no impact on the risk of heart failure in type 2 diabetic patients: evidence from a 37,229 patient meta-analysis. Am. Heart J. 162: 938–948. 2011.
10. *Nunes S., Soares E., Fernandes J., Viana S., Carvalho E., Pereira F.C., Reis F.* Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: Brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. Cardiovasc. Diabetol. 12: 1–11. 2013.
11. *Tadic M., Celic V., Cuspidi C., Ilic S., Pencic B., Radojkovic J., Ivanovic B., Stanisavljevic D., Kocabay G., Marjanovic T.* Right heart mechanics in untreated normotensive patients with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A two- and three-dimensional echocardiographic study. J. Am. Soc. Echocardiogr. 28: 317–327. 2015.
12. *Kubasov I.V., Stepanov A., Bobkov D., Radwanski P.B., Terpilowski M.A., Dobretsov M., Gyorke S.* Subcellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat. Front. Physiol. 2018.
https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061
13. *Huang Y., Cai X., Mai W., Li M., Hu Y.* Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. Bmj.5953. 2016.
14. *Kubasov I.V., Dobretsov M.* Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, Rana temporaria. J. Physiol. 590: 937–944. 2012.
15. *Dobretsov M., Backonja M., Romanovsky D., Stimers J.R.* Animal Models of Diabetic Neuropathic Pain. In: Animal Models of Pain. Eds: Chao Ma, Jun-Ming Zhang. Springer. Series: Neuromethods. 49. 147–170. 2010.

16. *Singh RM., Waqar T., Howarth F.C., Adeghate E., Bidasee K., Singh J.* Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. Heart Fail. Rev. 23: 37–54. 2018.
17. *Brette F., Orchard C.* T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. Circ. Res. 92: 1182–1192. 2003.
18. *Hong T.T., Shaw R.M.* Cardiac T-tubule microanatomy and function. Physiol. Rev. 97: 227–252. 2017.
19. *Jourdon P., Feuvray D.* Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. J. Physiol. 470: 411–429. 1993.
20. *Shimoni Y., Ewart H.S., Severson D.* Type I and II models of diabetes produce different modifications of K^+ currents in rat heart: role of insulin. J. Physiol. 507(2): 485–496. 1998.
21. *Shimoni Y., Ewart H.S., Severson D.* Insulin stimulation of rat ventricular K^+ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. J. Physiol. 514(3): 735–745. 1999.
22. *Casis O., Gallego M., Iriarte M., Sunchez-Chapula J.A.* Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. Diabetologia. 43: 101–109. 2000.
23. *Grunnet M.* Repolarization of the cardiac action potential. Does an increase in repolarization capacity constitute a new anti-arrhythmic principle? Acta Physiol.198 (Suppl. 676): 1–53. 2010.
24. *McMillan B., Gavaghan D.J., Mirams G.R.* Early afterdepolarization tendency as a simulated pro-arrhythmic risk indicator. Toxicol. Res. 6: 912–921. 2017. https://doi.org/10.1039/c7tx00141j
25. *Nygren A., Olson M.L., Chen K.Y., Emmett T., Kargacin G., Shimoni Y.* Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat: reduced conduction reserve. J. Physiol. 580(2): 543–560. 2007.
26. *Xi F., Yilong P., Qian C., Bin L., Shuo W., Hongjiao D., Na D., Xiaodong L.* Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. BMC Cardiovasc. Disorders. 2018. https://doi.org/10.1186/s12872-018-0805-5
27. *Tuteja D., Xu D., Timofeyev V., Lu L., Sharma D., Zhang Z., Xu Y., Nie L, Va'zquez A.E., Young J.N., Glatter K. A, Chiamvimonvat N.* Differential expression of small-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289: H2714–H2723. 2005. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00534.2005
28. *Wei A.D., Gutman G.A., Aldrich R., Chandy K.G., Grissmer W.H.* International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. Pharmacol. Rev. 57: 463–472. 2005. https://doi.org/10.1124/pr.57.4
29. *Grunnet M., Jensen B.S., Olesen S.P., Klaerke D.A.* Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels. Pflugers Arch. 441: 544–550. 2001.
30. *Gui L., Bao Z., Jia. Y., Qin X., Cheng Z.J., Zhu J., Chen Q.H.* Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 304: H118–H130. 2013. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2011
31. *Chang P.C., Turke I., Lopshire J.C., Masroor S., Nguyen B.L.,Tao W., Rubart M., Chen P.S., Chen Z., Ai T.* Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. J. Am. Heart Assoc. 2: e004713. 2013. https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004713
32. *Chua S.K., Chang P.C., Maruyama M., Turker I., Shinohara T., Shen M.J., Chen Z., Shen C., Rubart-von der Lohe M., Lopshire J.C., Ogawa M., Weiss J.N., Lin S.F., Ai T., Chen P.S.* Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. Circ. Res. 108: 971–979. 2011. https://doi.org/10.1161/ CIRCRESAHA.110.238386
33. *Bracken N.K., Woodall A.J., Howarth F.C., Singh. J.* Voltage-dependence of contraction in streptozotocin-induced diabetic myocytes. Mol. Cell. Biochem. 261: 235–243. 2004.

Functional Changes in the T-System of Cardiomyocytes of the Isolated Rat Heart during Development of Streptozotocin-Induced Diabetes

I. V. Kubasov[a], *, O. V. Chistyakova[a], I. B. Sukhov[a], A. A. Panov[a], and M. G. Dobretsov[a]

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

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

Left ventricles (LV) of isolated hearts of the control rats (n = 7) and rats injected with streptozotocin (STZ; n = 21) were studied on the four-week post-injection term using 5-μm tip (O.D.) glass extracellular microelectrodes. STZ-rats that maintained hypergly-

cemia by the time of the study (random glucose > 11 mM; $n = 3$) were designated as diabetic animals (diabetes mellitus group; STZ-DM). Remaining STZ-rats ($n = 18$) were designated as normoglycemic rats (STZ-NG group). In control and in STZ-rat hearts two main types of sinus rhythm action potentials (AP) of epicardial ventricular myocytes could be recorded: signals characterized by a single (AP1) or double negative peaks (AP2). Respective time parameters of AP1 (rise time, and 50 and 90% decay times (T_{50} and T_{90}) not differed between studied groups of rats. However, T_{50} of AP2 of LV myocytes of STZ-NG and STZ-DM rats were statistically significantly longer than T_{50} of AP2 recorded in control rat hearts. Furthermore, in 28% of STZ-NG and in 67% of STZ-DM rat hearts additional type of AP (AP3) featuring a complex, multi-peak negative phase and prominent positive phase of after-hyperpolarization were recorded. Appearance of AP3 was associated with a proportional decrease in the relative frequency of AP2 recordings (from 80–85% to 55–60% of all recordings). Frequency of AP1 recordings remained stable, 15–20% in all experiments in all groups of rats. Tentatively, observed in this study modulation in electrical activity of ventricular myocytes of STZ-rat hearts results from structure-functional changes in organization of the T-system of these myocytes. Regardless of validity of this suggestion, it is important that changes in electrogenesis of cardiomyocytes develop fast (1 month) not only in STZ-DM rats, but also in hearts of STZ-rats with normal or moderately increased blood glucose levels, which may be considered as the state equivalent to the state of early prediabetes.

Keywords: type I diabetes mellitus, prediabetes, diabetic cardiomyopathy, cardiomyocytes, action potentials, T-system

ЦИТИРОВАТЬ:

Кубасов И.В., Чистякова О.В., Сухов И.Б., Панов А.А., Добрецов М.Г. Изменения внеклеточно регистрируемых потенциалов действия изолированного сердца крысы при развитии стрептозотоцинового диабета. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1266–1277.

DOI: 10.31857/S0869813920100052

TO CITE THIS ARTICLE:

Kubasov I.V., Chistyakova O.V., Sukhov I.B., Panov A.A., Dobretsov M.G. Functional Changes in the T-System of Cardiomyocytes of the Isolated Rat Heart during Development of Streptozotocin-Induced Diabetes. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1266–1277.

DOI: 10.31857/S0869813920100052

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1278–1288

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ ФОРМИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ КОРЫ МОЗГА КРЫС

© 2020 г. Д. С. Васильев[1, *], Н. Л. Туманова[1], Д. С. Калинина[1, 2]

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

[2]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: dvasilyev@bk.ru*

Поступила в редакцию 24.03.2020 г.
После доработки 16.04.2020 г.
Принята к публикации 30.05.2020 г.

Пренатальная гипоксия нарушает формирование головного мозга, что приводит к развитию когнитивного дефицита в постнатальный период. Вероятные причины такого дефицита могут быть связаны с нарушением функционирования дорсального гиппокампа и областей новой коры, участвующих в его афферентации, в частности, энторинальной коры, проекционные нейроны которой иннервируют поле CA1. В задачи настоящего исследования входила оценка влияния пренатальной гипоксии на формирование нервной ткани энторинальной коры в раннем онтогенезе крыс, перенесших пренательную гипоксию на 14-й или 18-й дни эмбриогенеза. Путем прижизненного мечения 3'-этинил-5-дезоксиуридином нейробластов, образующихся у эмбрионов в момент действия гипоксии, было показано, что гипоксия нарушала образование и миграцию нейробластов в нижние (при гипоксии на 14-й день беременности) или верхние (при гипоксии на 18-й день) слои энторинальной коры в зависимости от срока гипоксического воздействия. Гипоксия на E14, но не на E18, приводила к снижению количества нейронов в энторинальной коре у крысят в первый месяц постнатального онтогенеза. Такое снижение свидетельствует об их гибели. Нарушение процесса нейрогенеза затрагивало образование проекционных пирамидных нейронов, но не влияло на популяцию тормозных интернейронов. Электронная микроскопия выявила патологические изменения нейронов энторинальной коры крысят на 20-е сутки после рождения (лизис органелл в цитоплазме либо гиперхроматоз). При гипоксии на 18-й день беременности изменений клеточного состава и гибели пирамидных нейронов в постнатальном онтогенезе у потомства не происходило. По-видимому, пренатальная гипоксия на E14 приводит к нарушению радиальной миграции нейробластов в энторинальной коре, усилению элиминации проекционных нейронов в раннем постнатальном онтогенезе. Гибель проекционных нейронов энторинальной коры может приводить к нарушению афферентации нейронов гиппокампа. Избирательное действие пренатальной гипоксии на популяцию возбуждающих нейронов энторинальной коры мозга крыс может приводить к нарушению баланса процессов возбуждения и торможения в ходе дальнейшего развития.

Ключевые слова: энторинальная кора, пренатальная гипоксия, эмбриогенез, крыса, нейрогенез, миграция нейробластов

DOI: 10.31857/S086981392010012X

Пренатальная гипоксия является наиболее частой причиной нарушения развития нервной системы у млекопитающих, при этом молекулярно-клеточные механизмы данного воздействия не до конца ясны. Уязвимость различных отделов мозга в эмбриогенезе обусловлена различиями во времени образования клеточных популяций [1]. Так, на E14 у крыс происходит закладка предшественников проекционных нейронов в различных областях коры мозга, в то время как в более поздний период (E18) в этих отделах формируются преимущественно будущие интернейроны [2]. Закладка гиппокампа начинается позднее, чем закладка нижних слоев новой коры, начиная с E16, а генерация нейронов гиппокампа продолжается в раннем постнатальном онтогенезе [3–5]. Однако нами ранее было показано, что при гипоксии на E14 происходит изменение клеточного состава и гибель определенных популяций нейронов как в теменной коре [6, 7], которая закладывается в этот период эмбриогенеза, так и в гиппокампе [8], который формируется значительно позднее. Также имеются данные о деградации грибовидных дендритных шипиков на апикальных дендритах нейронов пирамидного слоя и нарушении долговременной потенциации в гиппокампе крысят при гипоксии на E14 [9], что несколько неожиданно, учитывая время закладки данного отдела мозга. Аналогичные изменения аксо-шипиковых контактов описаны другими авторами при нарушении афферентации гиппокампа со стороны коры больших полушарий [10]. Это позволяет предположить возможность нарушения кортико-гиппокампального взаимодействия при пренатальной гипоксии, однако данное предположение требует экспериментального подтверждения. Известно, что энторинальная область коры участвует в афферентации поля CA1 гиппокампа [11], где последствия пренатальной гипоксии наиболее выражены [8]. Поэтому одной из вероятных причин нарушений структуры и функций гиппокампа при гипоксии на E14 могут являться патологические изменения в энторинальной коре. Нами ранее были получены данные, свидетельствующие о нарушении миграции нейробластов в теменной области коры мозга крысят из потомства самок, перенесших гипоксию на 14-й день беременности [7], чем объясняется нарушение ее дальнейшего формирования. Принимая во внимание данные о том, что закладка кортикальных клеточных слоев в различных областях коры головного мозга грызунов происходит относительно синхронно [11], аналогичные нарушения можно ожидать в других областях коры, в частности, энторинальной. При этом, в литературе отсутствуют данные о патологических изменениях этой области коры мозга у животных, перенесших гипоксию в период эмбриогенеза, что определило задачу настоящего исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все опыты проводились в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals). Самок крыс линии Вистар подвергали действию нормобарической гипоксии на 14-й день беременности (7% O_2, 3 ч). Контрольных животных содержали при нормальной концентрации кислорода. Структуру ткани энторинальной коры анализировали у крысят из потомства контрольных и экспериментальных самок. Были исследованы 4 группы крысят: 1-я группа – контроль (мечение пролиферирующих клеток на E14) n =1 4; 2-я группа – гипоксия на E14 (мечение клеток на E14) n = 12; 3-я группа – контроль (мечение клеток на E18) n = 9, 4-я группа – гипоксия на E18 (мечение клеток на E18) n = 10.

Прижизненное мечение пролиферирующих клеток на E14 и E18 и анализ их расположения в энторинальной коре

Было проведено мечение 3'-этинил-5-дезоксиуридином (EdU) нейробластов, образующихся у эмбрионов в момент действия пренатальной гипоксии. Беременным самкам экспериментальных и контрольных групп на 14-й или 18-й день беременности (по 4 самки из каждой группы) проводили введение маркера синтеза ДНК – 5'ethynyl-2'deoxyuridine (EdU). За час до введения метки беременные самки экспериментальных групп были подвергнуты действию гипоксии. Подробное описание методики прижизненного мечения клеток EdU опубликовано в [7].

На 5-й день после рождения крысята были декапитированы. Ткань больших полушарий, содержащих энторинальную область коры, в течение двух недель фиксировали 10%-ным раствором формалина на 0.1 М PBS (pH 7.4). Для криопротекции блоки ткани конечного мозга, содержащие энторинальную кору, погружали в 20%-ный раствор сахарозы, фронтальные срезы энторинальной коры толщиной 15 мкм готовили на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия) и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия). Количественное сравнение проводили на серии срезов толщиной 15 мкм, первый срез серии выбирался случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 30 мкм. Визуализацию EdU осуществляли с помощью кита Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit (Invitrogen, США). Часть срезов мозга была фоново окрашена неспецифичным ядерным красителем Hoechst 33342. Морфометрический анализ количества и расположения EdU-позитивных клеток, образованных на E14 или E18, проводили в пределах поперечника энторинальной коры шириной 500 мкм на уровне 4.5 мм от Bregma по Paxinos and Watson [12] (см рис. 3*A*). Среднее количество EdU-позитивных клеток было определено для каждой исследованной области энторинальной коры, для каждого животного определяли среднее значение по 9 срезам.

Светооптическое исследование ткани энторинальной коры в постнатальном онтогенезе

На 20-й, 35-й и 60-й дни после рождения (P20, P35, P60) животные были декапитированы. Мозг фиксировали методом транскардиальной перфузии 4%-ным раствором параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) с последующей дофиксацией в том же растворе в течение 4.5 сут, затем на сутки помещали в 20%-ный раствор сахарозы. Фронтальные срезы толщиной 15 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S и окрашивали по методу Ниссля. Ткань энторинальной коры исследовали с помощью микроскопа AF7000 (Leica, Германия) в пределах поперечника шириной 500 мкм на уровне 4.5 мм от Bregma по Paxinos and Watson [12] (рис. 3*A*), изображение оцифровывали при помощи камеры DFC495 (Leica). Количественное сравнение проводили на серии срезов толщиной 15 мкм, первый срез серии выбирался случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 30 мкм. При проведении анализа клеточного состава ткани использовали программу “Видеотест Мастер-Морфология” (ВидеоТест, Россия). Для каждого животного по 9 исследованным срезам вычисляли средние величины по общему количеству клеток, количеству пирамидных и непирамидных нейронов. В группу пирамидных нейронов включали клетки с вытянутыми телами, с площадью тела более 25 мкм^2 и соотношением длинной и короткой осей тела клетки более 2. В группу непирамидных нейронов включали округлые клетки с площадью тела более 25 мкм^2 и соотношением длинной и короткой осей тела клетки менее 2. Подробное описание классификации клеток коры головного мозга крысы, используемой в данной работе, опубликовано в [6, 7].

Статистическую обработку производили в программе SPSS Statistic 22. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, критерий Ливиня использовали для проверки равенства дисперсий.

Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Тьюки. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные в тексте и на графиках (за исключением рис. 2) представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки.

Электронная микроскопия

На P20 проводили электронномикроскопическое исследование ткани энторинальной коры контрольных ($n = 3$) животных и крыс, перенесших гипоксию на E14 ($n = 4$). Ткань фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного глютарового альдегида и 1%-ного параформальдегида на 0.1 M PBS, pH 7.4, дофиксировали 1%-ным OsO_4, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдид по стандартному протоколу [13, 14]. На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 500 ангстрем, которые затем исследовали с помощью электронного микроскопа FEI Tecnai V2 (FEI, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование распределения и количества EdU-позитивных нейронов, сформировавшихся на E14 и E18

У 5-суточных контрольных крысят большинство клеток энторинальной коры, меченных на E14, было локализовано в нижних (V–VI) слоях (рис. 1*A*), клетки, меченные на E18, располагались в поверхностных слоях (рис. 1*B*).

Пренатальная гипоксия на E14. У животных, подвергнутых гипоксии, так же как у контрольных, большинство клеток, меченных на E14, было локализовано в нижних (V-VI) корковых слоях (рис. 1*A*). Большинство EdU-позитивных нейронов из этих слоев характеризуются диффузным состоянием хроматина. Количество EdU-позитивных клеток в энторинальной коре у 5-суточных крысят, подвергнутых гипоксии на E14 (рис. 1*B*) было в 1.8 раз ниже, чем у контрольной группы (апостериорный тест Тьюки $p < 0.01$). Это указывает на то, что пренатальная гипоксия может вызвать снижение интенсивности пролиферации клеток в эмбриогенезе. У животных, подвергнутых пренатальной гипоксии на E14, доля меченых нейронов, рассеянных в поверхностных слоях энторинальной коры составляла около 42% от общего количества меченых клеток, и было существенно выше (см. рис. 1*Г*; апостериорный тест Тьюки $p = 0.02$), чем у контрольных животных (19%). Таким образом, пренатальная гипоксия на E14 вызывает нарушение миграции нейробластов в V–VI слои энторинальной коры.

Пренатальная гипоксия на E18. Клетки, меченные на E18, располагались в поверхностных слоях (рис. 1*B*), во многих из них хроматин был конденсирован. Это может указывать на более высокую транскрипционную активность нейронов нижних слоев энторинальной коры в сравнении с клетками II–III слоя. Количество EdU-позитивных клеток в энторинальной коре у 5-суточных крысят, подвергнутых гипоксии на E18, было в 1.4 раз ниже уровня контрольной группы (апостериорный тест Тьюки $p < 0.01$). Это указывает на снижение интенсивности пролиферации клеток в эмбриогенезе. У животных, подвергнутых гипоксии на E18, число EdU-позитивных клеток, рассеянных в нижних слоях коры составляло около 48%, и было выше (см. рис. 1*D*; апостериорный тест Тьюки $p = 0.03$), чем у контроля (17%). Таким образом, как и в случае гипоксии на E14, пренатальная гипоксия на E18 вызывает нарушение миграции нейробластов во II–III слои энторинальной коры.

Морфометрическое исследование клеточного состава ткани энторинальной коры крыс при нормальном и нарушенном эмбриогенезе

Пренатальная гипоксия на E14. К концу первого месяца постнатального онтогенеза общее количество клеток в энторинальной коре животных, перенесших гипоксию на E14, было ниже, чем у сверстников из контрольной группы (рис. 2). Так, на P20 оно составляло 82.0% от уровня контроля (апостериорный тест Тьюки $p = 0.04$), а на P35 – 74.1% (апостериорный тест Тьюки $p = 0.02$). На взрослой стадии развития (P60), различий между контрольной и экспериментальной группами не обнаружено (апостериорный тест Тьюки $p = 0.18$). Динамика количественных изменений нейронов, относящихся к различным классам, была неодинаковой. На P20 и P35 у крысят, перенесших гипоксию на E14, отмечалось статистически значимое снижение количества пирамидных нейронов (апостериорный тест Тьюки) которое составляло 72.1% от уровня контроля на P20 ($p = 0.02$) и 67.0% на P35 ($p = 0.03$). На взрослой стадии развития различий между контрольной и экспериментальной группами не было (апостериорный тест Тьюки $p = 0.15$). При этом различий между группами в количестве непирамидных нейронов не было выявлено ни в одной

Рис. 1. Распределение EdU-позитивных клеток в энторинальной коре крыс.

A – микрофотографии ткани энторинальной коры 5-суточных крысят из контрольной (слева) и гипоксической (справа) групп. Мечение пролиферирующих клеток осуществлялось на 14-й день эмбриогенеза. Ядра клеток, образовавшихся на E14, светятся зеленым светом. Фоновое окрашивание ядер неспецифическим ядерным красителем Hoechst 33342 (синее свечение). Масштаб – 200 мкм.

B – микрофотографии ткани энторинальной коры 5-суточных крысят из контрольной (слева) и гипоксической (справа) групп. Мечение пролиферирующих клеток осуществлялось на 18-й день эмбриогенеза. Фоновое окрашивание ядер Hoechst 33342. Масштаб – 200 мкм.

C–D Результаты количественного анализа. На гистограмме *C* белые столбики – среднее количество EdU-позитивных клеток в исследуемом поле энторинальной коры крысят контрольной (K) и гипоксических (HE14 и HE18) групп. Результаты представлены в виде среднее ± ошибка среднего. На гистограммах *C* и *D* серые столбики – среднее количество клеток, находящихся за пределами слоев, закладка которых происходила в период мечения (в верхних слоях в случае мечения на E14, в нижних слоях в случае мечения на E18). Такие клетки элиминируются в ходе раннего постнатального онтогенеза. На гистограмме *D* количество таких клеток выражено в процентах от общего количества EdU-позитивных клеток.

Звездочками обозначены статистически значимые различия между контрольной и гипоксической группами при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (однофакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки).

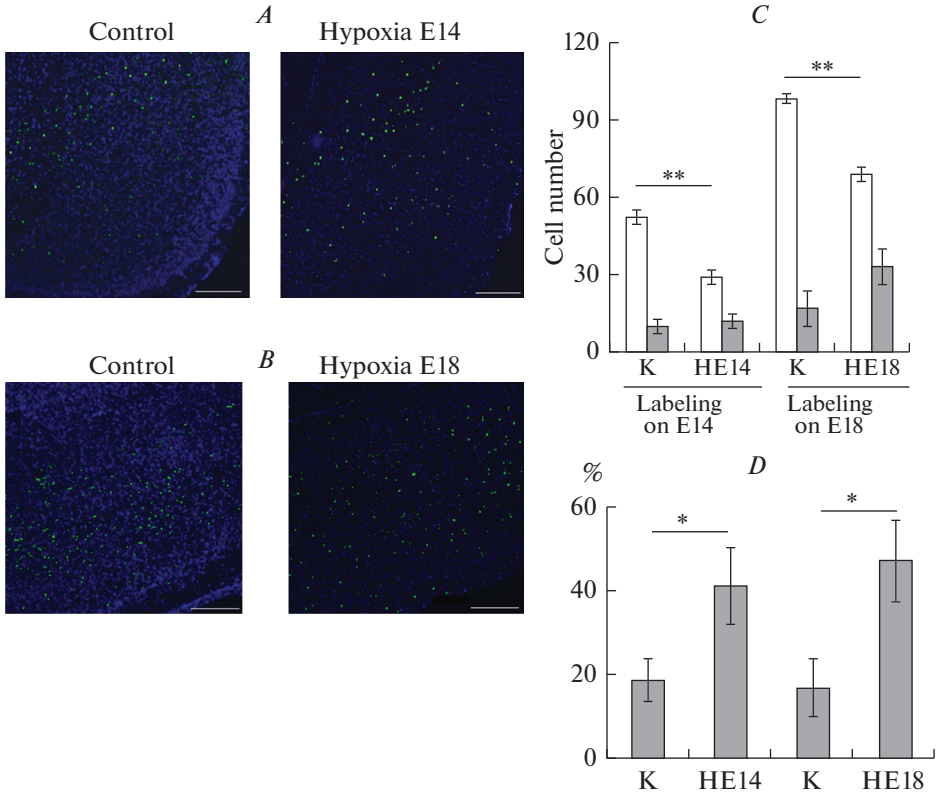
Fig. 1. Distribution of EdU-positive cells in rat entorhinal cortex.

A – micrographs of the entorhinal cortex of 5-day old rat pups from the control (left) and hypoxic (right) groups. Labeling of proliferating cells was carried out on the 14th day of embryogenesis. The nuclei of the cells formed on E14 are green. Background staining of nuclei with the non-specific nuclear dye Hoechst 33342 (blue). Scale – 200 μm.

B – micrographs of the entorhinal cortex of 5-day-old rat pups from the control (left) and hypoxic (right) groups. Labeling of proliferating cells was carried out on day 18 of embryogenesis. Hoechst 33342 background staining. Scale – 200 μm.

C–D Results of quantitative analysis. On the histogram *C*, the white bars show the average number of EdU-positive cells in the analyzed field of the entorhinal cortex in rat pups of the control (K) and hypoxic (HE14 and HE18) groups. The results are presented as mean ± SEM. On the histograms *C* and *D*, the gray bars are the average number of cells outside the layers they destined to move (the upper layers in the case of labeling on E14, the lower layers in the case of labeling on E18). Such cells were eliminated during early postnatal ontogenesis. On histogram *D*, the number of such cells is shown as a percentage of the total number of EdU-positive cells.

Asterisks indicate statistically significant differences between the control and hypoxic groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA, Tukey post-hoc test).



возрастной группе (апостериорный тест Тьюки, p = 0.22 для P20, $p = 0.07$ для P35, $p = 0.10$ для P60).

Пренатальная гипоксия на E18. У крыс, перенесших гипоксию на E18, клеточный состав и плотность расположения нейронов в энторинальной коре не отличались от контроля ни на P20 (апостериорный тест Тьюки $p = 0.08$ для общего количества клеток, $p = 0.12$ для количества пирамидных нейронов, $p = 0.07$ для непирамидных нейронов), ни на P35 (апостериорный тест Тьюки $p = 0.06$ для общего количества клеток, $p = 0.09$ для количества пирамидных нейронов, $p = 0.08$ для непирамидных нейронов), ни на P60 (апостериорный тест Тьюки $p = 0.08$ для общего количества клеток, $p = 0.08$ для количества пирамидных нейронов, $p = 0.11$ для непирамидных нейронов). Данные морфометрического анализа указывают на то, что гипоксия на E18 не оказывает влияние на клеточный состав энторинальной коры.

Изменение состояния нейронов энторинальной коры у крысят, перенесших гипоксию на E14

Снижение количества нейронов в ткани энторинальной коры крыс, перенесших гипоксию на E14, свидетельствовало об их гибели, поэтому у таких животных было проведено исследование возможности нейродегенеративных изменений клеток. У нейронов энторинальной коры крысят, перенесших гипоксию на E14, были хорошо заметны патологические изменения, как на светооптическом (рис. 3*B*, *D*), так и на ультраструктурном уровнях (рис. 3*F*, *G*). У большинства таких дегенериру-

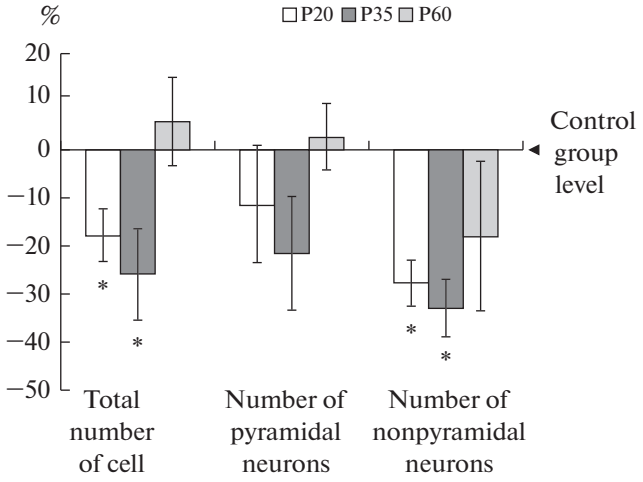


Рис. 2. Результаты морфометрического анализа количества клеток у перенесших пренатальную гипоксию (E14) крыс в возрасте P20 (белые столбики), P35 (черные столбики) или P60 (светло-серые столбики). Результаты представлены в виде среднее ± дисперсия и выражены в процентах от уровня контрольной группы (ноль). Звездочками обозначены статистически значимые отличия от уровня контроля при $*p < 0.05$ однофакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий Тьюки.

Fig. 2. Results of the cell number morphometric analysis in rats subjected to prenatal hypoxia on E14, aged P20 (white bars), P35 (black bars) or P60 (light gray bars).
The results are presented as mean ± variance and are shown in % of the control group level (zero). Asterisks indicate statistically significant differences from the control level at $*p < 0.05$; one-way ANOVA; Tukey post-hoc test.

ющих нейронов происходило набухание клеточных тел и их отростков, появление неокрашенных областей (рис. 3*C*) и лизис органоидов в цитоплазме (рис. 3*F*), свидетельствующие о нейродегенерации по типу хроматолиза. Кроме этого, был отмечен другой тип нейродегенеративных изменений – гиперхроматоз (рис. 3*D*, *G*), при котором происходило сморщивание клеточных тел и их отростков, цитоплазма становилась электронно-плотной (рис. 3*G*). Объем клеточного ядра таких клеток был снижен, вокруг него наблюдался ободок темной цитоплазмы, в которой сложно отличить органоиды: ЭПР и митохондрии. В нейропиле энторинальной коры встречаются глиальные отростки вокруг дегенерирующих нейронов (рис. 3*B*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что пренатальная гипоксия на E14 или E18 вызывает нарушение радиальной миграции нейробластов в V–VI или II–III слоях энторинальной коры соответственно. Также показано, что пренатальная гипоксия, независимо от времени ее действия, может вызвать снижение интенсивности пролиферации клеток. Данные по энторинальной коре, полученные в ходе настоящего исследования, согласуются с нашими результатами, опубликованными ранее для теменной коры крыс из потомства самок, перенесших гипоксию на 14-й или 18-й дни беременности [7], что является первым экспериментальным доказательством сходного действия пренатальной гипоксии на развитие различных областей новой коры. Следует отметить, что данные о нарушении пролиферации и радиальной миграции клеток при пренатальной гипоксии на E14 или E18 согласуются с наблюдениями других авторов, полученных на различных моделях пренатальной патологии (не связанных с гипоксией) в соответствующие пери-

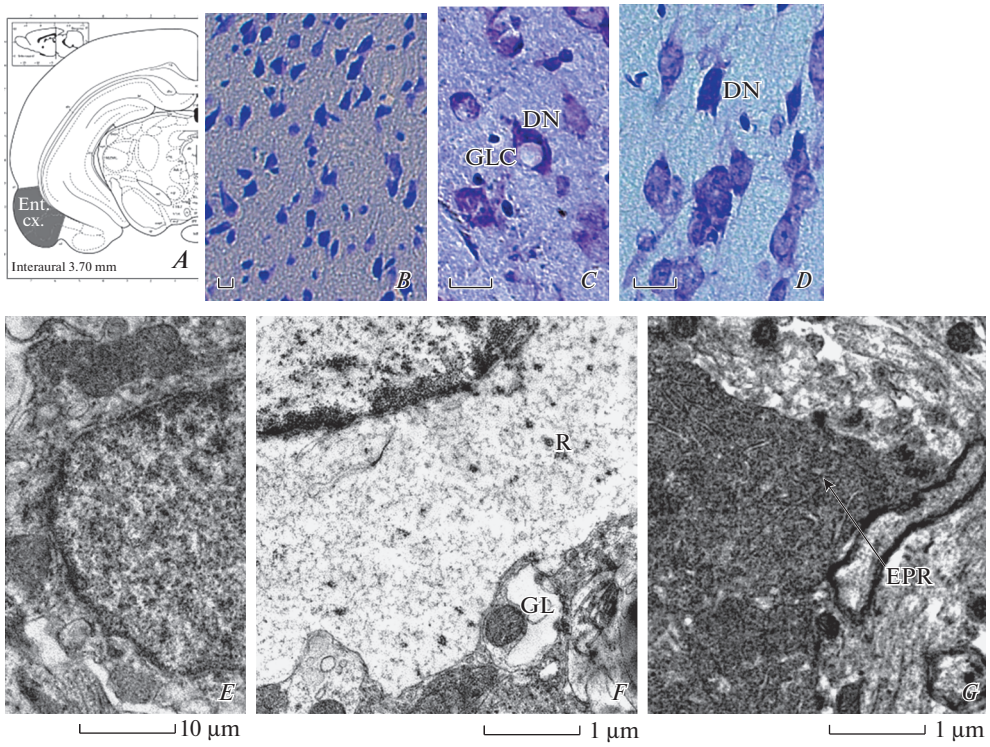


Рис. 3 Нейродегенеративные изменения в энторинальной коре 20-суточных крысят после пренатальной гипоксии.

A – схема расположения анализируемой области энторинальной коры (с изменениями – Paxinos, Watson, 2007).

B–D – микрофотографии ткани II–III слоя энторинальной коры крыс из контрольной (*B*) и экспериментальной (*C*, *D*) групп. Окраска по Нисслю. Масштаб – 20 мкм. DN – дегенерирующие нейроны, GLC – глиальные клетки.

E–G – электронограммы ткани энторинальной коры у крыс из контрольной (*E*) и экспериментальной (*F*, *G*) групп. Масштаб: *E* – 10 мкм, *F*, *G* – 1мкм. *E* – нормальный нейрон, *F* – дегенерирующий нейрон с лизисом органоидов в цитоплазме. *G* – дегенерирующий нейрон с гиперхромной цитоплазмой. GL– отросток глиальной клетки, R – одиночные рибосомы, EPR – эндоплазматический ретикулум.

Fig. 3. Neurodegenerative processes in the entorhinal cortex of 20 days-old rat pups, subjected to prenatal hypoxia.

A – location of the analyzed region of the entorhinal cortex (modified schem from [12]).

B – micrographs of tissue of the II–III layer of the entorhinal cortex in rats from the control (*B*) and “hypoxic” (*C–D*) groups. Nissl staining. Scale 20 μm. DN – degenerating neurons, GLC – glial cells.

E–G – electron microphotographs of the entorhinal cortex in rats from the control (*E*) and experimental (*F*, *G*) groups. Scale: *E* – 10 μm, *F*, *G* – 1 μm. *E*-normal neuron, *F*-degenerating neuron with lysis of organelles in the cytoplasm. *G* – degenerating neuron with hyperchromic cytoplasm. GL is the process of the glial cell, R is the single ribosome, EPR is the endoplasmic reticulum.

оды эмбрионального развития мозга [15–17]. Сходный характер влияния различных неблагоприятных факторов на процессы нейрогенеза и миграции нейробластов нельзя назвать неожиданным, однако в большинстве имеющихся литературных источников отсутствует сравнение структурных нарушений в различных областях новой коры, в том числе в энторинальной.

Ранее мы показали, что снижение общего количества пирамидных нейронов во II–III и V–VI слоях теменной коры головного мозга происходит только у крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E14, но не на E18 [6, 7]. Также для теменной коры было показано, что различия между контрольной и гипоксической группами в количестве пирамидных нейронов наблюдалось только в течение первого месяца постнатального онтогенеза, но не у взрослых животных. В настоящем исследовании продемонстрировано сходство в характере действия пренатальной гипоксии на клеточный состав и состояние нейронов в теменной и энторинальной коре в постнатальном онтогенезе крыс. Следует отметить, что между исследованными областями коры головного мозга существует различие в паттерне изменений клеточного состава. На P20–30 в теменной коре крысят, перенесших гипоксию на E14, наблюдались изменения в количестве непирамидных нейронов [7], в то время как в энторинальной области коры мозга такого не наблюдалось. Избирательное действие пренатальной гипоксии на популяцию возбуждающих нейронов коры головного мозга может приводить к нарушению баланса процессов возбуждения и торможения в ходе дальнейшего развития [18]. Поэтому исследования возбудимости нейронов различных областей коры и гиппокампа обретают актуальность в свете результатов настоящего исследования.

Интересным представляется обсуждение вопроса о возможном нарушении кортико-гиппокампального взаимодействия как причины структурных изменения и долговременной потенциации в гиппокампе крысят, перенесших пренатальную гипоксию. Нами ранее были описаны структурные изменения в гиппокампе крысят из потомства самок, перенесших гипоксию на 14-й день беременности [8]. Эти изменения включали умеренную гибель нейронов пирамидного слоя поля CA1 и снижение количества грибовидных дендритных шипиков с шипиковым аппаратом (в котором содержался маркерный белок цитоскелета – синаптоподин [19]). Уменьшение количества лабильных шипиков свидетельствует об изменениях пластичности нейронной сети [20], позднее было показано, что такое снижение сопровождалось нарушением процесса долговременной потенциации и когнитивными дисфункциями [9]. Аналогичные изменения аксо-шипиковых контактов описаны другими авторами при нарушении афферентации гиппокампа со стороны коры больших полушарий [10]. Это позволяет предположить возможность нарушения взаимодействия энторинальной коры и гиппокампа при пренатальной гипоксии. Результаты настоящей работы свидетельствуют в пользу такого предположения, поскольку показывают нарушение формирования проекционных нейронов энторинальной коры, вовлеченных в афферентацию гиппокампа. Разумеется, такое предположение нельзя считать единственно возможной причиной влияния гипоксии на E14 на структуру и функционирование гиппокампа. Так, в литературе содержатся данные о том, что гипоксия на E17 может нарушать миграцию нейробластов в гиппокампе [21], однако влияние такого нарушения миграции клеток на формирование нейронных сетей в постнатальном онтогенезе остается не изученным. Следует отметить, что прямое влияние пренатальной гипоксии на формирование гиппокампа может служить объяснением структурных изменений при гипоксии на E18, но не в случае гипоксии на E14. Именно для гипоксии на E14 гипотеза о нарушении кортико-гиппокампального взаимодействия приобретает определенный интерес и может служить предметом будущих экспериментальных исследований.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о влиянии пренатальной гипоксии на формирование нервной ткани энторинальной коры крыс.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств госзадания по теме АААА-А18-118012290373-7, РФФИ № 18-315-00239.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Конфокальная и электронная микроскопия выполнены на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН. Авторы благодарят Н.М. Дубровскую и О.С. Алексееву за помощь в создании гипоксических условий в эксперименте с животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rice D., Baron S.* Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models Environ. Health Perspect. 108. (3): 511–533. 2000.
2. *Rakic P.* Specification of cerebral cortical areas. Science. 241(4862): 170–176. 1988.
3. *Bayer S.A.* Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life J. Comp. Neurol. 190(1–2): 115–134. 1980.
4. *Bayer S.A.* Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H -thymidine autoradiography J. Comp. Neurol. 190(1–2): 87–114. 1980.
5. *Kempermann G., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg G.* Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci. 27(8): 447–452. 2004. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013
6. *Vasilyev D.S., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* Change of the neocortex nervous tissue in rat ontogenesis after hypoxia at various times of embryogenesis. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 44: 258–267. 2008.
7. *Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity and rat behavior in postnatal ontogenesis Front. Neurosci. 10: 126. 2016. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00126
8. *Журавин И.А., Туманова Н.Л., Васильев Д.С.* Структурные изменения нервной ткани гиппокампа в онтогенезе крыс после пренатальной гипоксии Журн. эвол. биох. физиол. 45(1): 138–140. 2009. [*Zhuravin I.A., Tumanova N.L., Vasilev D.S.* Structural changes in the nervous tissue of the hippocampus in rat ontogenesis after prenatal hypoxia J. Evol. Biochem. Phyziol. 45(1): 138–140. 2009. (In Russ)].
9. *Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Postnikova T.Yu., Zaitsev A.V.* Prenatal hypoxia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats. Neurobiol. Learning and Memory. 1–10. 2019. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107066
10. *Perez-Cruz C., Nolte M.W., van Gaalen M.M., Rustay N.R., Termont A., Tanghe A., Kirchhoff F., Ebert U.* Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. J. Neurosci. 31(10): 3926–3934. 2011. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6142-10.2011
11. *Bayer S.A., Altman J.* Neurogenetic Timetables in the Telencephalon. In: The Rat Nervous System. 3rd edition. Elsevier, Acad. Press. 28–36. 2004
12. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. Elsevier Inc. 2007.
13. *Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Коваленко А.А., Зубарева О.Е., Калеменев С.В., Магазаник Л.Г.* Нейровоспалительные процессы влияют на структурные изменения в миндалине крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(6): 694–706. 2019. (*Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kovalenko* A.*A., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Magazanik L.G.* Neuroinflammation Affects the Structural Abnormalities in Amygdalain the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy in Rats. Russ. J. Physiol. 105(6): 694–706. (In Russ)]. 2019) https://doi.org/10.1134/S0869813919060098
14. *Tumanova N.L., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A.* Ultrastructural alterations in the sensorimotor cortex upon delayed development of motor behavior in early ontogenesis of rats exposed to the prenatal hypoxia. Cell and Tissue Biology. 12(5): 419–425. 2018. https://doi.org/10.1134/S1990519X18050097
15. *Ang E.S. Jr., Gluncic V., Duque A., Schafer M.E., Rakic P.* Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(34): 12903–10. 2006. https://doi.org/10.1073/pnas.0605294103
16. *Miller M.W.* Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. Science. 233(4770): 1308–1311. 1986.
17. *Aronne M.P., Guadagnoli T., Fontanet P., Evrard S.G., Brusco A.* Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. Exp. Neurology. 229: 364–371. 2011. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.03.002
18. *Kalinina D.S., Vasilev D.S., Volnova A.V., Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A.* Age Dynamics Of Electrocorticogram And 4-Aminopyridine-Induced Seizures In Rats Undergoing Prenatal Hypoxia. Development. Neurosci. 41(1–2): 56–66. 2019. https://doi.org/10.1159/000497224
19. *Zhuravin I.A., Tumanova N.L., Vasilyev D.S.* Changes mechanisms of brain adaptation in postnatal ontogenesis of rats after prenatal hypoxia. Dokl. Akad. Nauk. 425: 123–125. 2009.
20. *Okubo-Suzuki R., Okada D., Sekiguchi M., Inokuchi K.* Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. J. Mol. Cell Neuro-

sci. 38 (2): 266–76. 2008.
https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.03.001

21. *Golan M.H., Mane R., Molczadzki G., Zuckerman M., Kaplan-Louson V., Huleihel M., Perez-Polo J.R.* Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. Neuropharmacology. 57: 511–522. 2009.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.028

Prenatal Hypoxia Disturbs the Formation of Pyramidal Neurons in the Entorhinal Cortex of the Rat Brain

D. S. Vasilev[a, *], N. L. Tumanova[a], and D. S. Kalinina[a, b]

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

[b] *Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: dvasilyev@bk.ru*

Prenatal hypoxia disturbs the formation of the brain, which leads to the development of cognitive deficit. The probable causes of this deficiency may be associated with impaired functioning of the dorsal hippocampus as well as the cortical areas involved in its afferentation, in particular the entorhinal cortex, projection neurons of which innervate the CA1 field. This study was performed to analyze the effect of prenatal hypoxia on the population of pyramidal neurons of the entorhinal cortex in early rat ontogenesis. Female Wistar rats were subjected to hypoxia on 14 or 18th days of pregnancy. The neuroblasts formed in embryos at the time of hypoxia were labeled by 3'-ethynyl-5-deoxyurenedine. The number of labeled cells and their and location in the entorhinal cortex was analyzed in 5-day old rat pups. It was shown that hypoxia disturbed the formation and migration of neuroblasts into the superficial (hypoxia on E18) or lower (hypoxia on E14) layers of the entorhinal cortex, leading to death of pyramidal neurons in the first month of postnatal ontogenesis, but did not affect the formation of inhibitory interneurons. Electron microscopy also revealed degenerative changes in the neurons of the entorhinal cortex in rat pups subjected to hypoxia on E14 (lysis of organelles or hyperchromatosis). It can be suggested that prenatal hypoxia lead to impaired radial migration of neuroblasts in the entorhinal cortex, increased elimination of projection neurons in early postnatal ontogenesis, causing impaired afferentation of hypocampal neurons. The selective effect of prenatal hypoxia on the population of exciting neurons of the cerebral cortex can lead to some disturbance in the balance of the processes of excitation and inhibition in the further development.

Keywords: entorhinal cortex, prenatal hypoxia, embryogenesis, rat, neurogenesis, cell migration

ЦИТИРОВАТЬ:

Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Калинина Д.С. Пренатальная гипоксия приводит к нарушению формирования нервной ткани энторинальной области коры мозга крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1278–1288.

DOI: 10.31857/S086981392010012X

TO CITE THIS ARTICLE:

Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kalinina D.S. Prenatal Hypoxia Disturbs the Formation of Pyramidal Neurons in the Entorhinal Cortex of the Rat Brain. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1278–1288.

DOI: 10.31857/S086981392010012X

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1289–1301

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВОЗМОЖНЫЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЗАПУСКАЕМЫЕ НАНОМОЛЯРНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ УАБАИНА В ПЕРВИЧНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ

© 2020 г.
В. А. Пенниайнен[1], М. М. Халисов[1], С. А. Подзорова[1], А. В. Анкудинов[2], В. Б. Плахова[1], Б. В. Крылов[1, *]

[1]*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
[2]*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*
**E-mail: krylov@infran.ru*

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.
После доработки 24.07.2020 г.
Принята к публикации 18.08.2020 г.

Исследованы ответы первичного сенсорного нейрона на воздействие субнаномолярных и наномолярных концентраций уабаина, которые соответствуют его эндогенным концентрациям (ЭУ). Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) обнаружено, что воздействие ЭУ приводило к увеличению жесткости нейрона. Методом локальной фиксации потенциала установлено, что благодаря лиганд-рецепторному связыванию ЭУ с комплексом Na,K-АТФаза/Src происходит снижение величины эффективного заряда активационной воротной системы каналов $Na_V1.8$. Установлено также, что ЭУ-активируемый внутриклеточный каскад, в котором комплекс Na,K-АТФаза/Src выполняет функцию трансдуктора сигнала, приводит к снижению интенсивности флуоресценции антител к каналам $Na_V1.8$, что было выявлено с помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Полученные результаты позволили высказать предположение о том, что ЭУ, запуская трансдукторную функцию комплекса Na,K-АТФаза/Src и соответствующий внутриклеточный сигнальный каскад, способен модулировать экспрессию гена *SCN10A*, продуцирующего каналы $Na_V1.8$, ответственные за кодирование ноцицептивных сигналов.

Ключевые слова: сенсорные нейроны, Na,K-АТФаза, уабаин, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, метод локальной фиксации потенциала, каналы $Na_V1.8$

DOI: 10.31857/S0869813920100088

Трансдукторная функция Na,K-АТФазы, активируемая низкими концентрациями уабаина, была впервые обнаружена при исследовании кардиомиоцитов [1, 2]. В мембране первичного сенсорного нейрона нами был обнаружен новый механизм мембранной сигнализации. Важнейшую функцию трансдуктора сигналов, как и в кардиомиоцитах, здесь выполняет Na,K-АТФаза, а эффекторным звеном служат каналы $Na_V1.8$, кодирующие ноцицептивную информацию [3–5]. В этом каскадном процессе, направленном тангенциально вдоль мембраны клетки, сигнал, запускаемый ЭУ, приводит к снижению эффективного заряда активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$. Важно отметить, что ЭУ присутствует в гипоталамусе в субнаномолярных и наномолярных концентрациях [6]. В настоящей работе исследована возможная физиологическая функция комплекса Na,K-АТФаза/Src, по-

скольку в соответствии с нашими данными именно этот комплекс должен выполнять функцию трансдуктора сигнала в мембране ноцицептивного нейрона [5, 7].

Мы предполагаем, что указанная функция комплекса Na,K-АТФаза/Src, активируемая ЭУ, приводит к модулированию функциональной активности каналов $Na_V1.8$ двумя способами. Первый способ, направленный, как было отмечено выше, в тангенциальном направлении, характеризуется быстрой передачей сигнала от комплекса Na,K-АТФаза/Src к каналам $Na_V1.8$ вдоль мембраны нейрона [8]. Второй механизм проявляется в радиальной передаче сигнала на геном нейрона, при этом активация трансдукторной функции комплекса Na,K-АТФаза/Src должна приводить к запуску внутриклеточного каскада, эффекторным звеном которого может стать ген *SCN10A*, ответственный за продуцирование каналов $Na_V1.8$ [9]. В том случае, если их плотность в мембране ноцицептивного нейрона уменьшится после воздействия ЭУ, то можно предположить, что указанный агент запускает не только тангенциальный каскад, направленный вдоль мембраны клетки, но и радиальный сигнальный процесс, также ведущий к снижению функциональной активности каналов $Na_V1.8$. Настоящая работа посвящена изучению именно этих двух возможных молекулярных механизмов, участвующих в модуляции функциональной активности каналов $Na_V1.8$, запускаемых при связывании ЭУ с комплексом Na,K-АТФаза/Src.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были разработаны в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЭС). Местный комитет по уходу и использованию животных Института физиологии им. Павлова РАН утвердил все экспериментальные методики с животными, разрешение № 12/03 (20.04.2018).

Метод получения культуры сенсорных нейронов. Этот метод подробно описан в нашей предыдущей работе [10]. Исследования проведены на нативных сенсорных нейронах спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в 50-миллиметровых чашках μ-Dish (ibidi GmbH, Германия) с тонким дном (170 мкм) или 40-миллиметровых чашках Петри, предварительно покрытых 0.01%-ным раствором поли-*L*-лизина (Sigma, США), в CO_2-инкубаторе (Sanyo, Япония) в течение 3-х суток при 37°C и 5% CO_2. Экспериментальные нейроны культивировали в присутствии уабаина (Sigma, США) в концентрации 0.1 нмоль/л в течение трех суток. Клетки исследовали с помощью методов атомно-силовой и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. В последнем случае проводилось иммуноцитохимическое окрашивание нейронов.

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ-метод). Исследование действия ЭУ (0.1 нмоль/л) на механические характеристики изолированных первичных сенсорных нейронов осуществлялось с помощью установки, включающей атомно-силовой микроскоп BioScope Catalyst (Bruker, США) и инвертированный оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Регистрация ответов сенсорных нейронов на механическое воздействие осуществлялась в питательной среде при температуре ≈37°C, которая поддерживалась встроенным в атомно-силовой микроскоп нагревательным элементом под управлением температурного контроллера 335-й модели (Lake Shore Cryotronics, США).

В основе АСМ-измерения механических характеристик клетки лежит техника наноиндентирования – продавливания нейрона зондом с известной силой и отслеживания величины сообщенной изучаемому объекту деформации. Количественное определение механических характеристик производится путем анализа силовых кривых – зависимостей силы взаимодействия от расстояния зонд–нейрон. Более

подробную информацию о принципе АСМ-измерения механических характеристик клеток по силовым кривым можно найти в ряде работ [11, 12].

АСМ-исследование сенсорных нейронов проводили в режиме PeakForce QNM, дающем возможность картировать кажущийся модуль Юнга поверхности клетки за счет автоматического анализа силовых кривых, регистрируемых в каждой точке индентирования. Измерения проводились кантилеверами с низкой жесткостью SNL-D (Bruker, США). Константа жесткости каждого кантилевера определялась по методу тепловых шумов до экспериментов с сенсорными нейронами. Расчет модуля Юнга для сенсорных нейронов производился в соответствии с моделью Снеддона, в которой принимается коническая форма острия зонда [13]. Для обработки АСМ-изображений использовали программы NanoScope Analysis 1.40 (Bruker, США) и Gwyddion 2.55 (свободное ПО) [14]. Сравнение механических характеристик сенсорных нейронов до и после действия ЭУ осуществляли, используя карты модуля Юнга.

Иммуноцитохимический метод. Для визуализации нейронов и дальнейшего иммунофлуоресцентного анализа проводили иммуноцитохимическое окрашивание культуры сенсорных нейронов к маркеру каналов $Na_V1.8$. Использовали следующие первичные и вторичные антитела: anti-sodium channel $Na_V1.8$ (Sigma, США) и anti-rabbit-FITC (Sigma, США). После удаления культуральной среды нейроны промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS; Sigma, США) и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (pH 7.4) в PBS в течение 3 мин, затем снова промывали PBS. После промывания PBS нейроны подвергали пермеабилизации 0.3%-ным Triton X-100 в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, затем клетки инкубировали в 10%-ном растворе фетальной сыворотки коровы в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Нейроны инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C. После этого промывали клетки раствором PBS 3 раза. Инкубировали культуру клеток со вторичными антителами 1 ч в темноте при 37°C. Далее нейроны снова промывали PBS и окрашивали DAPI (Sigma, США) для обнаружения ядер. Препараты хранили при 4°C, затем их использовали для дальнейших исследований.

Иммунофлуоресцентный анализ. Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания, а также для количественного анализа действия ЭУ применяли систему компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящую из лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) интегрированного с инвертированным микроскопом Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ZEN_2012 (Carl Zeiss, Германия). Анализировали данные, полученные при 63-кратном увеличении (LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Korr., Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции антител к каналам $Na_V1.8$ оценивали с использованием пакета программ ZEN_2012 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции количественно регистрировали в относительных единицах (о.е.) в выделенной области над ядром нейрона. Распределение интенсивности флуоресценции в пределах выбранной области подчинялось нормальному закону распределения. Площадь исследуемой области как контрольной, так и после воздействия уабаина, была одинаковой. Работа выполнена на оборудовании ЦКП Конфокальная микроскопия Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp method). Этот метод применялся в конфигурации “регистрация активности целой клетки” (“whole-cell”) [15]. После образования плотного контакта происходил разрыв мембраны нейрона под отверстием микропипетки, что позволяло проводить перфузию клетки, вводя в нее внутриклеточный раствор. Эксперименты проводились на культивируемых изолированных сенсорных нейронах, выделенных из областей L5–S1 ганглиев спинного

мозга новорожденных крысят линии *Wistar*. Культивирование изолированных нейронов в течение двух часов в стандартных питательных средах с использованием CO_2-инкубатора позволяло получить интактные клетки. Подробно этот модифицированный метод краткосрочного культивирования диссоциированных сенсорных нейронов описан в нашей предыдущей работе [7].

Для исследования характеристик натриевых каналов в работе использовались следующие стандартные растворы: внеклеточный, содержащий (ммоль/л) 65 NaCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 70 Choline Cl, 10 HEPES Na, 0.0003 тетродотоксина, pH 7.4; внутриклеточный, состоящий из (ммоль/л) 100 CsF, 10 NaCl, 40 CsCl, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES Na, pH 7.2. Исключение ионов калия из обоих растворов позволило избавиться от всех компонентов калиевого тока, а ионы фтора во внутриклеточном растворе обеспечивали блокирование кальциевых токов [16, 17]. Наличие во внеклеточном растворе тетродотоксина блокировало функционирование быстрых тетродотоксинчувствительных каналов, что делало возможным исследовать ответы только одной популяции каналов, $Na_V1.8$.

Для выяснения возможного участия Src-киназы, протеникиназы C и протеинкиназы A во внутриклеточный раствор, заполняющий микропипетку, добавляли соответствующие специфические блокаторы: (мкмоль/л) 10 PP2, 10 тамоксифена или 1 KT5720. Уабаин вводили во внеклеточный раствор, где он постоянно присутствовал в течение всего эксперимента в концентрации 10 нмоль/л. В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США).

В наших предыдущих работах [3, 4, 7] было уделено особое внимание способу измерения эффективного заряда (Z_{eff}) воротного устройства активационной воротной системы каналов $Na_V1.8$. Известно, что величина последовательного сопротивления (R_s) влияет не только на стационарную ошибку измерения токов, но также резко увеличивает погрешность измерения и кинетических характеристик поведения воротных устройств. Все это сказывается и на погрешности измерений амплитудных значений токов. Эти важнейшие требования к условиям измерения электрических характеристик перфузируемых клеток были разработаны ранее [18]. В соответствии с ними величина R_s постоянно контролировалась в наших экспериментах. Для того, чтобы она не превышала 3 мОм, размер кончика микропипетки всегда был более 2 мкм. При выполнении этих условий становится возможным применение метода Алмерса [19] для измерения величины Z_{eff} каналов $Na_V1.8$. Подчеркнем, что кинетика инактивации этих медленных натриевых каналов делает их идеальным объектом для измерения эффективного заряда их активационного воротного устройства [3, 4].

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, США). Этот пакет программ включает в себя условия применения для анализа результатов измерений критерий Колмогорова–Смирнова. Наши данные ему удовлетворяли, что позволило оценить достоверность различий контрольных и экспериментальных данных (интенсивности флуоресценции и величины эффективного заряда) с использованием *t*-критерия Стьюдента. Оценка различий между экспериментальной и контрольной группами АСМ-данных проводилась с помощью статистического *U*-критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Различия принимались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты АСМ-исследований. С помощью светового микроскопа выбирали интактные клетки для дальнейшего изучения методом АСМ. АСМ-сканированию

подвергали только надежно иммобилизованные на дне чашки Петри сенсорные нейроны нормальной, присущей клеткам данного типа, веретенообразной формы. Как правило, механическое воздействие зонда атомно-силового микроскопа не причиняло видимого ущерба клеткам. Подчеркнем, что механическая стимуляция заметно не влияла на жесткость поверхности сенсорных нейронов: в течение приблизительно 20 мин сканирования, необходимых для получения полного АСМ-кадра, значимых изменений величины модуля Юнга клеток не наблюдалось. В тех экспериментах, где острие зонда все же повреждало клеточную мембрану, сканирование сразу прекращалось, и этот поврежденный нейрон исключался из дальнейшего анализа.

Отметим, что сенсорные нейроны являются сложным объектом для АСМ-сканирования из-за своей формы, поскольку иммобилизованная на подложке клетка характеризуется резким перепадом своей высоты. В результате, механизм обратной связи не всегда успевает должным образом отследить ее изменения на крутых склонах клетки, что может приводить к ошибочным измерениям. Поэтому при анализе АСМ-изображений сенсорных нейронов избегали края клетки, концентрируясь на центральной части сомы с наиболее пологой поверхностью.

Измерения осуществляли в рамке со стороной 60 мкм, которая была достаточной для помещения в нее исследуемого нейрона. В результате сканирования получали массив тоновых АСМ-изображений. Тон каждой точки таких изображений отражает величину измеряемого параметра: чем светлее тон, тем выше значение параметра. Например, на АСМ-топографии сенсорного нейрона (рис. 1*A*), отражающей высотное распределение поверхности клетки, темным обозначена гладкая подложка, на которой располагается клетка, а наиболее светлые участки изображения соответствуют соме нейрона.

Для изучения действия ЭУ на механические характеристики сенсорных нейронов анализировались карты модуля Юнга (рис. 1*B*). Корректность получаемых данных контролировали путем сравнения этих карт. Надежными считались только те данные, которые не отличались при прямом и обратном направлениях АСМ-сканирования. Очевидно, что нервная клетка гетерогенна в отношении своих морфо-функциональных особенностей. Поэтому мы выбирали на соме каждого нейрона небольшую квадратную область со стороной 2 мкм. В результате удалось зарегистрировать такое распределение величин модуля Юнга в этой области, которое было близко к нормальному (рис. 1*B*, *C*). Каждая клетка далее характеризовалась средним значением модуля Юнга, полученным при измерениях в указанной области. Затем вычислялось среднее значение данного параметра для двух групп сенсорных нейронов: одна из них была культивирована в среде, содержащей ЭУ (0.1 нмоль/л), а другая была контрольной. Всего было исследовано 8 клеток, культивированных с ЭУ, и 15 контрольных клеток.

Сравнение средних значений модуля Юнга сенсорных нейронов до и после воздействия ЭУ показало, что действие исследуемого агента приводило к существенному увеличению жесткости клеток. Так, сенсорные нейроны, культивируемые в присутствии ЭУ, демонстрировали более чем в 2.8 раза большее среднее значение модуля Юнга по сравнению с контролем.

Результаты исследований методом лазерной сканирующей микроскопии. На рис. 2 представлено изменение интенсивности флуоресценции антител к каналам $Na_V1.8$ в мембране сенсорного нейрона в контроле и после воздействия ЭУ (0.1 нмоль/л). Распределение значений интенсивности флуоресценции антител к каналам $Na_V1.8$ в выбранной области над ядром нейрона в исследованных клетках соответствовало нормальному распределению (тест Колмогорова–Смирнова, $d = 0.07$, $p > 0.20$). Данные иммунофлуоресцентного анализа свидетельствовали о том, что ЭУ-активация трансдукторной функции Na,K-АТФазы может запускать внутриклеточный

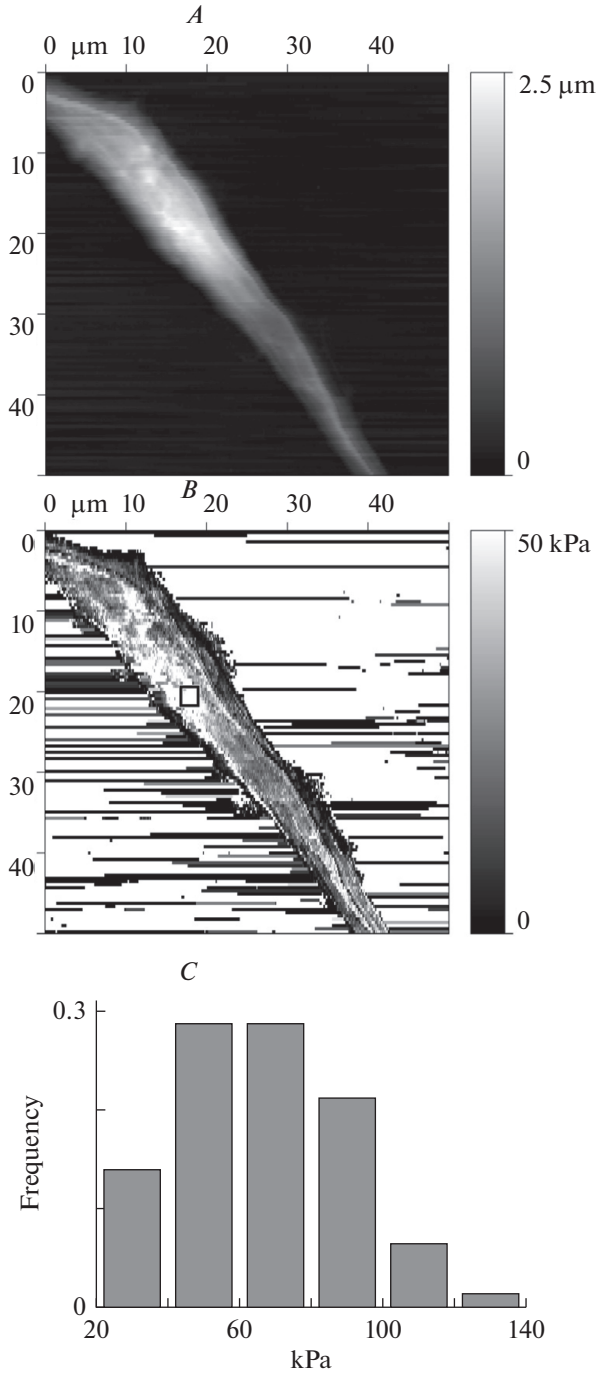
сигнальный каскад, направленный радиально на геном. В наших экспериментах это проявилось в снижении уровня флуоресценции антител к каналам $Na_V1.8$. Данный результат может трактоваться как уменьшение плотности распределения каналов в мембране сенсорного нейрона. Интенсивность флуоресценции антител к $Na_V1.8$ каналам, культивированных в присутствии уабаина, составила 3.05 ± 0.30 о.е. (n = 23), а в контроле 4.06 ± 0.50 о.е. (n = 25) (рис. 2*C*). Можно предположить, что ЭУ запускает внутриклеточный каскад, снижающий эффективность экспрессии генов *SCN10A*, продуцирующих каналы $Na_V1.8$. Этот радиально направленный сигнальный процесс происходит благодаря участию в нем комплекса Na,K-АТФаза/Src, который выполняет здесь свою трансдукторную функцию [5, 7]. Наши предварительные данные указывают на то, что дальнейшая передача сигнала должна здесь происходить благодаря активации p38 MAP-киназного каскада. Дальнейшие исследования позволят проверить это предположение. Другое предположение заключается в том, что ЭУ, активируя трансдукторный комплекс Na,K-АТФаза/Src, запускает еще один каскад, направленный тангенциально, который также модулирует функциональную активность каналов $Na_V1.8$.

Результаты исследований методом локальной фиксации потенциала. На рис. 3 представлены результаты исследования влияния ЭУ на потенциалочувствительность каналов $Na_V1.8$. Было показано, что в отсутствие блокаторов приложение 10 нмоль/л уабаина к наружной стороне мембраны приводило к снижению эффективного заряда (Z_{eff}) активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$ от контрольного значения 6.7 ± 0.4 (n = 15) до 4.8 ± 0.3 (n = 10). При предварительном добавлении во внутриклеточный раствор 10 мкмоль/л PP2 приложение ЭУ не приводило к изменению эффективного заряда (Z_{eff} = 6.3 ± 0.3 (n = 15)). Предварительное добавление во внутриклеточный раствор 10 мкмоль/л тамоксифена или 1 мкмоль/л KT5720 приводило к снижению эффективного заряда соответственно до 4.7 ± 0.3 (n = 17) и 4.6 ± 0.3 (n = 14). Таким образом, с помощью ингибиторного анализа установлено, что в передаче сигнала вдоль нейрональной мембраны первичного сенсорного нейрона участвует Src-киназа. Ни протеинкиназа A, ни протеинкиназа C не участвуют в этом каскадном процессе, приводящем к модуляции эффективного заряда активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$.

Можно заключить, что запускаемый ЭУ тангенциальный сигнальный каскад, в первую очередь, активирует комплекс Na,K-АТФаза/Src, который, видимо, является важнейшим трансдукторным звеном для тангенциального и радиального распространения сигнала. В обоих случаях происходит снижение функциональной активности каналов $Na_V1.8$. На это указывают наши данные, полученные методами

Рис. 1. Пример экспериментальных АСМ-данных сенсорного нейрона. *A* – АСМ-топография сомы контрольного нативного сенсорного нейрона; *B* – АСМ-карта значений модуля Юнга по поверхности сенсорного нейрона (обозначена квадратная область, в рамках которой производился анализ значений параметра для данной клетки); *C* – гистограмма значений модуля Юнга по области анализа, показанной на *B*. АСМ-изображения получены со следующими параметрами сканирования: величина пиковой силы – 1 нН, частота строчной развертки – 0.1 Гц, амплитуда и частота вертикального движения зонда – 1 мкм и 250 Гц соответственно, размер кадра – 512 × 128 точек, направление сканирования – справа налево.

Fig. 1. An example of experimental AFM data of a sensory neuron. *A* – AFM topography of the living sensory neuron soma (control data); *B* – AFM map of the Young's modulus values over the surface of the sensory neuron (the square region is indicated within which the parameter values for this cell were analyzed); *C* – histogram of the Young's modulus values over the analysis region shown in *B*. AFM images were obtained with the following imaging parameters: peak force setpoint – 1 nN, scan rate – 0.1 Hz, peak force amplitude and frequency – 1 μm, and 250 Hz, respectively, the frame size – 512 × 128 pixels, the scanning direction – from right to left.


A
0 μm 10 20 30 40
0
10
20
30
40
2.5 μm
0
B
0 μm 10 20 30 40
0
10
20
30
40
50 kPa
0
C
0.3
Frequency
0
20 60 100 140
kPa

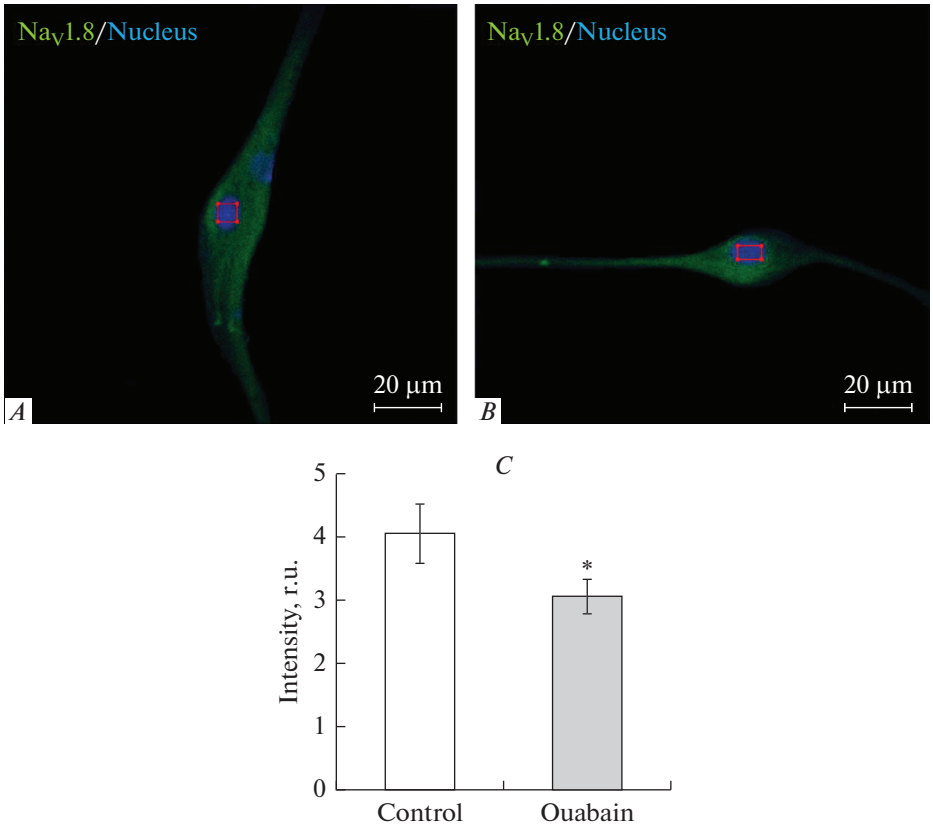


Рис. 2. Влияние ЭУ на плотность каналов $Na_V1.8$ в первичном сенсорном нейроне. Диссоциированная культура сенсорных нейронов (3-и сутки культивирования) в контроле (*A*) и после воздействия ЭУ (*B*). Окраска антителами к каналам $Na_V1.8$ (зеленый) и ядра DAPI (синий), ×63. Красным прямоугольником отмечена область, в которой была измерена интенсивность флуоресценции каналов $Na_V1.8$. *C* – уменьшение интенсивности флуоресценции антител к каналам $Na_V1.8$ в сенсорных нейронах после воздействия ЭУ. Ось *Y* – интенсивность флуоресценции в относительных единицах, о.е. ($n = 23$ контрольные данные и $n = 25$ после воздействия ЭУ). * – $p < 0.05$ (*t*-критерий Стьюдента).

Fig. 2. The effect of EO on the channel density of $Na_V1.8$ in the primary sensory neuron. Dissociated culture of sensory neurons (3 days of cultivation) in control (*A*) and EO-treated (*B*). Neurons were immunostained using the antibodies to Nav1.8 channels (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue), ×63. Red box marks the area, within which fluorescence intensity of $Na_V1.8$ channels was measured. *C* – A decrease in the fluorescence intensity of antibodies to $Na_V1.8$ channels in sensory neurons after exposure to EO. The Y-axis shows the fluorescence intensity in relative units, r.u. ($n = 23$ for control explants and $n = 25$ for EO-treated explants). * – $p < 0.05$ (Student's *t* test).

локальной фиксации потенциала и иммунофлуоресцентного анализа. Несколько более косвенное подтверждение этому получено с помощью АСМ-метода. Очевидно, что снижение плотности встроенных в цитоплазматическую мембрану сенсорного нейрона каналов $Na_V1.8$ должно приводить к большей однородности мембраны и, как следствие, к росту величины кажущегося модуля Юнга, т.е. к увеличению жесткости нервной клетки. Подчеркнем, что чувствительность используемых нами методов оказалась достаточной для выявления на молекулярном и клеточном уровнях эффектов наномолярных концентраций уабаина. Именно эти концентрации присутствуют в организме человека [6].

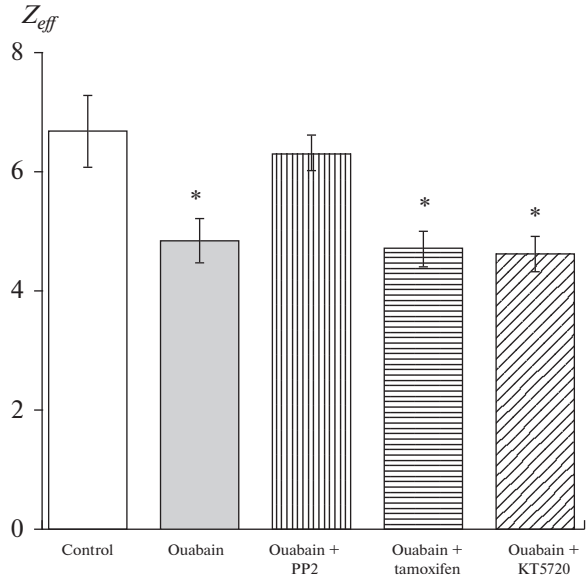


Рис. 3. Участие Src-киназы, PKC и PKA в процессах тангенциальной передачи сигнала, запускаемых ЭУ. Воздействие ЭУ приводит к снижению Z_{eff}. При предварительном добавлении во внутриклеточный раствор блокатора Src-киназы приложение ЭУ с внешней стороны мембраны не приводило к изменению эффективного заряда. Предварительное добавление во внутриклеточный раствор блокатора PKA или блокатора PKC приводило к снижению эффективного заряда. * – $p < 0.05$.

Fig. 3. The participation of Src kinase, PKC and PKA in the processes of tangential signal transmission triggered by endogenous concentrations of ouabain.

Exposure to EO reduces Z_{eff}. When preliminary added to the intracellular solution of the Src-kinase blocker, the application of EO from the outer side of the membrane did not lead to a change in the effective charge value. The preliminary application of the PKA blocker or the PKC blocker to the intracellular solution led to a decrease in the effective charge. * – $p < 0.05$.

В современной литературе широко обсуждается проблема физиологической роли “ненасосной” (non-pumping) функции Na,K-АТФазы, при этом результаты, полученные в различных лабораториях, приводят к противоположным выводам. Эти конфликтные данные подробно обсуждаются в обзоре [20]. На наш взгляд, суть проблемы заключается в том, что физиологическое действие эндогенного уабаина является не только ткане-, но и клеточноспецифическим. В отношении первичного сенсорного нейрона нам удалось за последние десятилетия выстроить непротиворечивую систему взглядов в отношении физиологической роли трансдукторной функции Na,K-АТФазы. При физиологически адекватных условиях молекула уабаина существует в виде кальциевого хелатного комплекса, который благодаря ион-ионному взаимодействию осуществляет лиганд-рецепторное связывание с соответствующим сайтом Na,K-АТФазы [4, 8]. Поскольку в примембранном пространстве свободный кальций существует в очень низких концентрациях, сопоставимых с концентрациями эндогенного уабаина, то, согласно нашему предположению, и “трансдукторный” сайт Na,K-АТФазы должен отличаться от другого сайта связывания “свободного” уабаина, который ингибирует насосную функцию этого белка при его действии в концентрациях на порядки больших. Применение метода локальной фиксации потенциала позволило нам зарегистрировать дозозависимость изменения величины Z_{eff} от концентрации уабаина. Полученная U-образная

зависимость хорошо аппроксимировалась суперпозицией двух уравнений Хилла, причем величины Kd составили 7 нмоль/л и 0.1 ммоль/л [4]. Исследование уабаин-зависимого тока в нейронах дорзальных ганглиев взрослых крыс также предсказало существование двух сайтов связывания уабаина, величины Kd которых были равны 0.2 и 140 мкмоль/л [21]. Наши эксперименты, проведенные методом органотипической культуры ткани, подтвердили особую роль хелатного комплекса уабаин-Ca^{2+}: совместное применение уабаина и ЭГТА, селективного хелатора ионов кальция, устраняло ингибирующее действие ЭУ на рост нейритов [8]. Мы предполагаем, что ЭУ и "свободный" уабаин, выполняют две принципиально различные функции: первый запускает трансдукторную функцию Na,K-АТФазы, связываясь со "своим" трансдукторным сайтом, а молекула свободного уабаина ингибирует насосную функцию этого белка. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что сайты связывания уабаина и хелатного комплекса уабаин-Ca^{2+} должны различаться. Связано ли это различие с особенностями лиганд-рецепторного связывания указанных молекул с единственным сайтом Na,K-АТФазы или с гетерогенностью ее изоформ, одни из которых служат насосами, а другие только трансдукторами, покажут дальнейшие исследования. Отметим, что в нейронах дорзальных ганглиев обнаружены две изоформы Na,K-АТФазы, $\alpha 1$ и $\alpha 3$ [22–26].

Данные современной литературы указывают на то, что ЭУ может считаться гормоном, запускающим внутриклеточные каскадные сигнальные процессы [2, 27, 28]. Наши результаты свидетельствуют о том, что указанный агент является еще и нейрогормоном, активирующим в первичном сенсорном нейроне два каскадных процесса, один из которых направлен в тангенциальном направлении вдоль мембраны клетки к каналам $Na_V1.8$, а другой - в радиальном направлении на геном [3, 4, 8].

В исследуемом нами первичном сенсорном нейроне выполнение трансдукторной функции Na,K-АТФазы не зависит от концентрации внутриклеточных ионов калия: наши эксперименты показали, что, как при нормальных физиологических условиях, так и при отсутствии этих ионов во внутриклеточном растворе, Na,K-АТФаза одинаково эффективно выполняла эту функцию, передавая сигналы на активационное воротное устройство каналов $Na_V1.8$ [3]. Конкуренция ионов калия с уабаином может, видимо, проявляться только при выполнении насосной функции Na,K-АТФазы. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что в молекуле исследуемого белка сайт связывания уабаина и сайт связывания двух ионов калия, переносимых внутрь клетки, структурно отличаются друг от друга [29]. Это позволяет заключить, что обнаруженная нами высокая чувствительность каналов $Na_V1.8$ к действию уабаина не связана с изменением внутриклеточной концентрации ионов калия.

На наш взгляд, представляется маловероятным, что в ЦНС существует опиоидергический механизм регуляции насосной функцией Na,K-АТФазы, хотя такие гипотезы обсуждаются в литературе [30]. Наши данные указывают на то, что опиаты способны модулировать именно трансдукторную функцию указанного белка [3, 4] и влиять на функциональную активность каналов $Na_V1.8$, что может объяснить сильную анальгетическую активность опиатов. Действительно, в арсенале клинической медицины отсутствуют безопасные и эффективные анальгетики, способные заменить опиаты, необходимость широкого применения которых для купирования хронической боли привела к возникновению опиоидного кризиса, происходящего в США и во многих других странах мира [31]. Настоящая работа показывает возможный альтернативный путь решения этой проблемы, основанный на результатах изучения каскадных процессов, запускаемых очень низкими концентрациями уабаина в живых клетках. Этот подход позволил нам ранее разработать неопиоидный анальгетик "Аноцептин®", который успешно прошел первую фазу клиниче-

ских исследований [32]. Его действующая субстанция, коменовая кислота, так же, как и ЭУ, снижает величину эффективного заряда активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$, причем, функцию трансдуктора сигнала в этом каскаде выполняет комплекс Na,K-АТФаза/Src [4, 5]. Благодаря своей эндогенной природе уабаин в наномолярных концентрациях может оказаться не только абсолютно безопасным анальгетиком, но и настолько же эффективным, как и опиаты. Наши дальнейшие исследования позволят проверить это предположение.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00079), а также в рамках финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kometiani P., Li J., Gnudi L., Kahn B.B., Askari A., Xie Z.* Multiple signal transduction pathways link Na^+/K^+-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 273(24): 15249–15256. 1998.
2. *Xie Z., Askari A.* Na^+,K^+-ATPase as a signal transducer. Eur. J. Biochem. 269: 2434–2439. 2002.
3. *Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людыно М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л.* Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов. Рос. физиол. журнал. им. И.М. Сеченова. 85(2): 225–236. 1999. [*Krylov B.V., Derbenev A.V., Podzorova S.A., Liudyno M., Kuz'min A.V., Izvarina N.L.* Morphine decreases the voltage sensitivity of slow sodium channels. Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 85(2): 225–236. 1999. (In Russ)].
4. *Krylov B.V., Rogachevskii I.V., Shelykh T.N., Plakhova V.B.* Frontiers in pain science. V. 1. New nonopioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantumchemical studies. Sharjah, U.A.E. Bentham Science Publishers Ltd. 2017.
5. *Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Rogachevsky I.V., Terekhin S.G., Podzorova S.A., Krylov B.V.* Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. Pathophysiology. 26 (3–4): 245–252. 2019.
6. *Kawamura A., Guo J., Itagaki Y., Bell C., Wang Y., Haupert G.T. Jr., Magil S., Gallagher R.T., Berova N., Nakanishi K.* On the structure of endogenous ouabain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 6654–6659. 1999.
7. *Plakhova V.B., Penniyaynen V.A., Yachnev I.L., Rogachevskii I.V., Podzorova S.A., Krylov B.V.* Src kinase controls signaling pathways in sensory neuron triggered by low-power infrared radiation. Can. J. Physiol. Pharmacol. 97(5): 400–406. 2019.
8. *Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V.* Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na^+,K^+-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. Med. Chem. 8(1): 33–39. 2012.
9. *Chambers J.C., Zhao J., Terracciano C.M., Bezzina C.R., Zhang W., Kaba R., Navaratnarajah M., Lotlikar A., Sehmi J.S., Kooner M.K., Deng G., Siedlecka U., Parasramka S., El-Hamamsy I., Wass M.N., Dekker L.R., de Jong J.S., Sternberg M.J., McKenna W., Severs N.J., de Silva, Wilde A.A., Anand P., Yacoub M., Scott J., Elliott P., Wood J.N., Kooner J.S.* Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. Nat. Genet. 42: 149–152. 2010.
10. *Khalisov M.M., Ankudinov A.V., Penniyaynen V.A., Dobrota D., Krylov B.V.* Application of atomic force microscopy for investigation of Na^+,K^+-ATPase signal-transducing function. Acta Physiol. Hung. 102 (2): 125–130. 2015.
11. *Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I.* Atomic force microscopy probing of cell elasticity. Micron. 38(8): 824–833. 2007.
12. *Gavara N.* A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. Microsc. Res. Tech. 80(1): 75–84. 2017.
13. *Sneddon I.N.* The relation between load and penetration in axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. Int. J. Engr. Sci. 3: 47–57. 1965.
14. *Nečas D., Klapetek P.* Gwyddion. An open-source software for SPM data analysis. Cent. Eur. J. Phys. 10(1): 181–188. 2012.
15. *Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch. 391(1): 85–100. 1981.

16. *Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I.* Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. Nature. 257(5528): 691–693. 1975.
17. *Elliott A.A., Elliott J.R.* Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. J. Physiol. (London). 463(4): 39–56. 1993.
18. *Osipchuk Y., Timin E.* Electrical measurements on perfused cells. In: *Kostyuk P.G., Krishtal O.A.* Eds. Intracellular perfusion of excited cells. New York. Wiley. 1984.
19. *Almers W.* Gating currents and charge movements in excitable membranes. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 82: 97–190. 1978.
20. *Askari A.* The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. Pharmacol. Res. Perspect. 7(4): e00505. 2019.
21. *Hamada K., Matsuura H., Sanada M., Toyoda F., Omatsu-Kanbe M., Kashiwagi A., Yasuda H.* Properties of the Na^+/K^+ pump current in small neurons from adult rat dorsal root ganglia. Br. J. Pharmacol. 138(8): 1517–1527. 2003.
22. *Mata M., Siegel G.J., Hieber V., Beaty M.W., Fink D.J.* Differential distribution of Na,K-ATPase isoform mRNAs in the peripheral nervous system. Brain Res. 546: 47–54. 1991.
23. *Dobretsov M., Hastings S.L., Sims T.J., Stimers J.R., Romanovsky D.* Stretch receptor-associated expression of alpha 3 isoform of the Na^+,K^+-ATPase in rat peripheral nervous system. Neuroscience. 116(4): 1069–1080. 2003.
24. *Dobretsov M., Stimers J.R.* Neuronal function and α3 isoform of the Na/K-ATPase. Front. Biosci. 10: 2373–2396. 2005.
25. *Romanovsky D., Moseley A.E., Mrak R.E., Taylor M.D., Dobretsov M.* Phylogenetic preservation of alpha3 Na^+,K^+-ATPase distribution in vertebrate peripheral nervous systems. J. Comp. Neurol. 500(6): 1106–1116. 2007.
26. *Paul D., Soignier R.D., Minor L., Tau H., Songu-Mize E., Gould H.J. 3rd.* Regulation and pharmacological blockade of sodium-potassium ATPase: a novel pathway to neuropathy. J. Neurol. Sci. 340(1–2): 139–143. 2014.
27. *Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R., Ludens J.H.* Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(14): 6259–6263. 1991.
28. *Hamlyn J.M., Blaustein M.P.* Endogenous ouabain: recent advances and controversies hypertension. 68(3): 526–532. 2016.
29. *Ogawa H., Cornelius F., Hirata A., Toyoshima C.* Sequential substitution of K^+ bound to Na^+,K^+-ATPase visualized by X-ray crystallography. Nat. Commun. 6: 8004. 2015.
30. *Deng H., Yang Z., Li Y., Bao G., Friedrich T., Gu Q., Shen X., Schwarz W.* Interactions of Na^+,K^+-ATPase and co-expressed delta-opioid receptor. Neurosci. Res. 65(3): 222–227. 2009.
31. *Chang A.K., Bijur P.E., Esses D., Barnaby D.P., Baer J.* Effect of a single dose of oral opioid and nonopioid analgesics on acute extremity pain in the emergency department. A randomized clinical trial. JAMA. 318(17): 1661–1667. 2017.
32. *Лопатина Е.В., Поляков Ю.И.* Синтетический аналгетик аноцептин: результаты доклинических и клинических исследований. Эфферентная терапия. 17(3): 79–81. 2011. [*Lopatina E.V., Polyakov Yu.I.* Synthetic analgesic anoceptin: results of preclinical and clinical studies. Efferent Therapy. 17(3): 79–81. 2011. (In Russ)].

Possible Antinociceptive Mechanisms Triggered by Nanomolar Concentrations of Ouabain in Primary Sensory Neurons

V. A. Penniyaynen[a], M. M. Khalisov[a], S. A. Podzorova[a], A. V. Ankudinov[b], V. B. Plakhova[a], and B. V. Krylov[a, *]

[a] *Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[b] *The Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: krylov@infran.ru*

The responses of the primary sensory neuron to the effect of subnanomolar and nanomolar concentrations of ouabain, which correspond to its endogenous concentrations (EO), were investigated. By the method of atomic force microscopy (AFM) it was found that the effect of EO led to an increase in the stiffness of the neuron. It was found using the patch-clamp method that due to the ligand-receptor binding of EO to the Na,K-ATPase/Src complex, the effective charge of the activation gating system of $Na_V1.8$ channels decreases. It was also found that EO-activated triggering of the intra-

cellular cascade, in which the Na,K-ATPase/Src complex acts as a signal transducer, leads to a decrease in the fluorescence intensity of antibodies to $Na_V1.8$ channels, which was revealed using confocal laser scanning microscopy. The results obtained allowed us to suggest that EO, triggering the transducer function of the Na,K-ATPase/Src complex and the corresponding intracellular signaling cascade, is able to modulate the expression of the *SCN10A* gene, which produces the $Na_V1.8$ channels responsible for encoding nociceptive signals.

Keywords: sensory neuron, Na,K-ATPase, ouabain, confocal laser scanning microscopy, atomic force microscopy, patch-clamp method, $Na_V1.8$ channel

ЦИТИРОВАТЬ:

Пеннияйнен В.А., Халисов М.М., Подзорова С.А., Анкудинов А.В., Плахова В.Б., Крылов Б.В. Возможные антиноцицептивные механизмы, запускаемые наномолярными концентрациями уабаина в первичных сенсорных нейронах. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1289–1301.

DOI: 10.31857/S0869813920100088

TO CITE THIS ARTICLE:

Penniyaynen V.A., Khalisov M.M., Podzorova S.A., Ankudinov A.V., Plakhova V.B., Krylov B.V. Possible Antinociceptive Mechanisms Triggered by Nanomolar Concentrations of Ouabain in Primary Sensory Neurons. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1289–1301.

DOI: 10.31857/S0869813920100088

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1302–1311

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ “АКЦЕНТИРОВАННОЙ ЭКСЦЕНТРИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ” НА ГИПЕРТРОФИЮ И АРХИТЕКТУРУ МЫШЦ

© 2020 г. К. В. Сергеева[1, *], Р. В. Тамбовцева[1]

[1]*Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 13.06.2020 г.
После доработки 31.07.2020 г.
Принята к публикации 18.08.2020 г.

Исследование посвящено сравнительному анализу результатов влияния “акцентированной эксцентрической тренировки” и традиционной силовой тренировки на гипертрофию и архитектуру латеральной широкой мышцы бедра (VL). Отличие выбранного протокола силового воздействия от протокола классической силовой тренировки, главным образом, заключалось в использовании супрамаксимальной величины отягощения в эксцентрической фазе движения, то есть величины, превышающий концентрический повторный максимум. При этом объемы тренировочных нагрузок между экспериментальными группами были уравнены. Испытуемые, представители силовых видов спорта, тренировались 2 раза в неделю на протяжении 13 нед. Морфологические и архитектурные параметры мышцы оценивались с помощью магнитно-резонансной томографии и ультросонографии. Результаты эксперимента показали, что наибольший прирост анатомической площади поперечного сечения (Anatomical Cross Sectional Area ACSA), объема мышцы, угла перистости и физиологической площади поперечного сечения (Physiological Cross Sectional Area, PCSA) VL были получены в группе, применявшей акцентированную эксцентрическую нагрузку. Данный эффект может быть связан с использованием более высокой интенсивности сокращения и, как следствие, большей механической нагрузки, которую испытывали мышцы, что привело к более выраженному адаптивному отклику. Кроме того, показано, что угол перистости и PCSA увеличились в большей степени, чем ACSA и объем мышцы. Наши данные убедительно указывают на тесную связь между углом перистости и мышечной гипертрофией. Увеличение данного параметра, обусловленное пространственными ограничениями в увеличивающейся мышце, может являться надежным показателем оценки степени гипертрофии мышц.

Ключевые слова: гипертрофия, архитектура мышц, угол перистости, эксцентрический режим

DOI: 10.31857/S086981392010009X

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что высокая интенсивность мышечных сокращений является основной детерминантой гипертрофии мышечной ткани в ответ на выполнение упражнений с отягощениями [1]. В данной связи особого внимания заслуживает эксцентрический режим мышечного сокращения, во время которого мышца может развивать силу в 1.2–1.8 раз превышающую максимальную изометрическую силу [2], растягиваясь под воздействием внешнего отягощения. Данное явление связано с тем, что при активном удлине-

нии основную долю от развиваемых мышцей сил составляют пассивные силы, генерируемые такими упругими элементами, как сеть коллагеновых фибрилл соединительной ткани, окружающей отдельные мышечные волокна, пучки и целую мышцу, а также титиновые нити в саркомерах [3]. Учитывая бóльшие силовые возможности мышц в эксцентрическом режиме сокращения, неудивительно, что уступающая фаза требует активации меньшего совокупного количества волокон или/и работы двигательных единиц (ДЕ) с меньшей частотой разрядов потенциалов действия (ПД), если одинаковая внешняя нагрузка перемещается как во время подъема, так и во время опускания [4]. Поэтому, для того, чтобы уравнять нейромышечную активность – интенсивность сокращения в эксцентрическом режиме должна использоваться бóльшая. На материале спортивных упражнений, в частности, было показано, что разница в максимальной силе между двумя режимами может достигать 160% в некоторых упражнениях [5]. По меньшей мере на 30–60% эксцентрический крутящий момент должен превышать концентрический для достижения сопоставимых значений амплитуды электромиограммы (ЭМГ) [6] или уровня произвольной активации мышц [2].

В предыдущих работах, где сравнивались упражнения, включавшие только максимальные эксцентрические сокращения с упражнениями, включавшими только максимальные концентрические сокращения или же в сравнении с традиционной силовой тренировкой, включающей обе фазы движения [6–10] было показано превосходство первых с точки зрения увеличения мышечной ткани, а также более выраженной гипертрофии быстрых волокон IIa и IIx типа [7, 11–15]. Следует отметить, что не во всех подобных исследованиях удалось воспроизвести вышеприведенные результаты и некоторые авторы сообщили об одинаковом изменении анатомической площади поперечного сечения (Anatomical Cross Sectional Area, ACSA) [16] или объема мышц [17, 18]. Причинами противоположного результата данных исследовательских работ может оказаться, во-первых, отсутствие тренировочного стажа у испытуемых; во-вторых, использование недостаточной величины отягощения для эксцентрического режима (разница в величине отягощения между режимами составляла около 20%) [17, 18]; в-третьих, выполнение эксцентрического сокращения с относительно медленной скоростью (2–3 с) [16, 17]. Известно, что для эксцентрического режима зависимость силы тяги мышц от скорости растяжения носит иной характер, чем в концентрическом режиме. Если при концентрическом сокращении, развиваемая сила уменьшается экспоненциально с увеличением скорости сокращения, то при эксцентрическом сокращении, напротив, сила увеличивается с увеличением скорости сокращения [14] по меньшей мере до ~200° $с^{-1}$ [19]. Действительно, эксцентрическая тренировка, выполняемая с высокой скоростью (180° $с^{-1}$) увеличивала силу мышц [10, 20] и площадь поперечного сечения [10] в значительной степени больше, чем сопоставимая концентрическая тренировка с высокой или медленной скоростью. Кроме того, использование изокинетического динамометра в вышеуказанных исследованиях [16–18] могло снизить тренировочный эффект. Отмечено, что в отличие от изокинетического эксцентрического сокращения (при постоянной скорости в суставе, которую “контролирует” тренажер) во время изотонического (на практике термин изотонический используется при выполнении концентрического или эксцентрического сокращения, выполняемого с постоянной внешней нагрузкой) эксцентрического сокращения механическая перегрузка, вызванная гравитацией, приводит к большему начальному ускорению движения конечности. Вследствие этого более высокая угловая скорость в начале движения в сочетании с более высоким значением крутящего момента стимулирует гипертрофию мышц в большей степени [21, 22].

Общий вывод, который вырисовывается при анализе фактического материала по данной тематики, сводится к следующему: эксцентрическая тренировка может

оказаться более эффективной, чем концентрическая, в случае обеспечения равнозначного уровня нервномышечной активации для двух режимов, согласно зависимости сила/скорость. С другой стороны, вряд ли правомерно ставить вопрос об абсолютной эффективности того или иного режима. Очевидно, что наиболее рациональный путь повышения эффективности тренировочного воздействия – оптимальное сочетание обоих режимов работы мышц. Одним из способов оптимизации сочетанного применения двух режимов является метод "акцентированной эксцентричной нагрузки", который предполагает присутствие обеих фаз движения, но в эксцентрической фазе используется супрамаксимальная величина отягощения. Другими словами, используется вес, превышающий концентрический 1ПМ. По нашим сведениям, на данный момент есть только два исследования, изучавших предлагаемый метод с участием лиц, адаптированных к силовым нагрузкам [23, 24]. В обеих работах показано достоверно большее увеличение концентрической [23] и изометрической силы [24] в группе, применявшей акцентированную эксцентрическую нагрузку, по сравнению со стандартной силовой тренировкой, но при этом оба протокола имели аналогичное влияние на ACSA. Тут важно учитывать то обстоятельство, что изменение ACSA, вызванное тренировкой и измеряемой в плоскости перпендикулярной длиннику целой мышцы, не может считаться репрезентативным для оценки изменения физиологической площади поперечного сечения (Physiological Cross Sectional Area, PCSA), которое определяется, как величина площади сечения волокна, перпендикулярная продольной оси отдельных мышечных волокон, умноженная на косинус угла перистости (θ) [25]. В частности, не было обнаружено никакой связи между изменениями площади поперечного сечения одиночного мышечного волокна и ACSA. Поскольку именно PCSA представляет собой общее число саркомеров в мышце, расположенных параллельно и, соответственно, напрямую связана с величиной напряжения, которое может генерировать мышца, то наряду с изучением вызванных тренировкой морфологических изменений мышечного аппарата крайне важно учитывать архитектуру мышцы [25].

Цель настоящего исследования заключалась в сопоставлении влияния высокоинтенсивной силовой тренировки с акцентированной эксцентрической нагрузкой (КОН/ЭКС$^+$) с традиционной высокоинтенсивной силовой тренировкой (КОН/ЭКС) на гипертрофию мышц у спортсменов, адаптированных к регулярным тренировкам с отягощениями. Мы предположили, что гипертрофия мышц будет более выражена в КОН/ЭКС$^+$ группе, чем в КОН/ЭКС, даже если они будут эквивалентны по объему. Кроме того, ожидалось, что величина вызванного тренировкой увеличения PCSA и угла перистости (архитектурные параметры) будут превышать увеличение ACSA и объема (морфологические параметры). Данное предположение основано на том факте, что при увеличении угла перистости (угла наклона пучков волокон к апоневрозу) возрастает количество сократительной ткани, прикрепленной к данному участку апоневроза, что сопровождается увеличением физиологического поперечника. При этом значение анатомического поперечника может возрасти незначительно.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 30 испытуемый – представители силовых видов спорта (пауэрлифтинг). Средний возраст спортсменов составил 29.0 ± 3.8 лет. Все участники исследования дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно этическим стандартам Хельсинской декларации. Участники случайным образом были распределены на три группы: с акцентированной эксцентрической нагрузкой (КОН/ЭКС$^+$) (n = 11), с традиционной высокоинтенсивной тренировкой (КОН/ЭКС) (n = 10) и контрольную группу (КОНТР)

($n = 9$), равные по силовым показателям. В качестве экспериментального упражнения использовался жим ногами (Hammer strength). Испытуемые из экспериментальной (КОН/ЭКС) группы выполняли упражнение с одинаковым внешним отягощением для эксцентрической и концентрической фаз движения стандартным способом, каждой ногой по очереди. Испытуемые из экспериментальной группы (КОН/ЭКС$^+$) выполняли концентрическую часть движения двумя ногами, затем одна нога снималась с платформы тренажера и эксцентрическая часть движения выполнялась второй ногой, обеспечивая, таким образом, величину отягощения 140% от концентрического 1ПМ для данной ноги. Затем то же выполнялось для второй ноги. Для обеспечения эквивалентности объема работы для обеих экспериментальных групп, тренировочный объем рассчитывался следующим образом: группа КОН/ЭКС выполняла (7 сетов) × × ([~6 концентрических сокращений × 80% от концентрического 1ПМ] + [~6 эксцентрических сокращений × 80% от концентрического 1ПМ]); группа КОН/ЭКС$^+$ выполняла (5 сетов) × ([10 концентрических сокращений × 70% от концентрического 1 ПМ] + [5 эксцентрические сокращения × 140% от концентрического 1ПМ]). Для обеих групп длительность концентрической части движения составляла 3 с, а эксцентрической – 1 с. Время отдыха между сетами составляло 4 мин. Участники проводили 2 занятия в неделю в течение 13 нед. Оценка 1ПМ проводилась каждые 2 недели и тренировочная нагрузка корректировалась соответствующим образом. Испытуемые из контрольной группы (КОНТР) тренировались по своему традиционному силовому протоколу без наблюдения. У всех участников были проведены тестовые измерения размера мышц и мышечной архитектуры до начала эксперимента и на 13-й неделе экспериментального исследования на 4-й день после заключительной тренировки.

Для исследования архитектуры мышц использовали ультразвуковую (УЗ) визуализацию, посредством которой измеряли угол перистости (θ) и длину пучка (FL) на аппарате Vivid 7 Dimension (Vivid 7 PRO, General Electric, Норвегия) с линейным датчиком 4.9–13.0 МГц. Проводили эхографию латеральной широкой мышцы бедра (VL). Зона расположения датчика для эхолокации – на уровне 50%-ного расстояния между центральной пальпируемой точкой большого вертела и латеральным мыщелком бедренной кости правой ноги. Для получения изображений испытуемые лежали на спине с прямыми ногами и расслабленными мышцами. Длина пучка (FL) определялась как расстояние между местом прикрепления волокна у поверхностного апоневроза до места его вхождения в глубокие слои апоневроза. Угол (θ) перистости волокна определялся как угол между пучком волокон и глубоким апоневрозом.

ACSA и объем мышцы определяли по аксиальным МРТ-изображениям (МР-томограф Vantage Atlas, Toshiba, Германия) с использованием Т2-импульсной последовательности (TR – 4400.0 мс; TE – 48.0 мс; толщина среза 7 мм). Измерение ACSA латеральной широкой мышцы бедра (VL) проводили путем ручного трассирования окружности мышцы на каждом третьем изображении (т.е. каждые 21 мм) от самого проксимального к самому дистальному изображению, на котором мышца была видима. Значения ACSA для пропущенных изображений оценивали на основе линейной зависимости. Для сравнительного анализа изменений ACSA между группами использовался срез, полученный на уровне 50% длины бедренной кости. Объем мышцы определяли путем суммирования всех значений ACSA, умноженных на толщину среза (7 мм). PCSA вычислялась с помощью уравнения:

$$\mathrm{PCSA} = \frac{\mathrm{Vol}}{\mathrm{FL} \times \cos\theta}$$

где, Vol – объем латеральной головки, FL – длина ее пучка и θ – угол перистости [26].

Статистическая обработка результатов исследования выполнялась при помощи пакета программ Statistica 13.3 Для проверки нормальности распределения выборки использовались тесты Колмогорова–Смирнова (>0.20) и Шапиро–Уилкока (>0.05). Для проверки значимости изменений результатов был проведен двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями. Факторы: время (до/после), группа (КОН/ЭКС$^+$, КОН/ЭКС, КОНТР). Для выявления значимых различий в результатах между группами были проведены апостериорные тесты с поправкой Бонферрони по факторам время и группа. Для определения межгрупповых различий в относительных изменениях (%Δ) изучаемых параметров был использован парный *t*-критерий Стьюдента. Для всех тестов был установлен уровень значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сводные данные выполненных измерений приведены в табл 1. 13-недельная тренировочная программа привела к достоверному приросту ACSA в центральной части мышцы. Для изменения ACSA был обнаружен значимый эффект “времени” ($F = 56$; $p < 0,05$; $k = 1$) и взаимодействия “группа × время” ($F = 20$; $p < 0.05$; $k = 2$). Post-hock тест выявил статистически значимое увеличение в КОН/ЭКС$^+$ группе (12.2 ± 8.2%; $p < 0.05$) и КОН/ЭКС группе (5.0 ± 1.6%; $p < 0.05$), но не в группе КОНТР (0.1 ± 1.5%; $p = 0.65$). Т-тест показал, что относительные изменения в течение исследуемого периода были достоверно больше для КОН/ЭКС$^+$ группы ($p = 0.01$), чем для КОН/ЭКС группы.

Изменение объема мышцы имело значимый эффект “времени” ($F = 53$; $p < 0.05$; $k = 1$) и взаимодействия “группа × время” ($F = 19$; $p < 0.05$; $k = 2$). Post-hock тест обнаружил значительное увеличение в КОН/ЭКС$^+$ группе (12.4 ± 8.2%; $p < 0.05$) и КОН/ЭКС группе (5.4 ± 1.8%; $p < 0.05$), но не в группе КОНТР (0.1 ± 1.5%; $p = 0.81$). Относительные изменения были достоверно больше для КОН/ЭКС$^+$ группы ($p < 0.05$), чем для КОН/ЭКС группы.

Для более тщательного изучения динамики мышечной гипертрофии были также получены измерения угла перистости (θ) и PCSA мышцы. Для изменения угла перистости наблюдался значимый эффект “времени” ($F = 224$; $p < 0.05$; $k = 1$). Post-hock тест выявил увеличение, которое было статистически значимо в КОН/ЭКС$^+$ группе (25.5 ± 9.6%; $p < 0.05$) и в КОН/ЭКС группе (7.8 ± 0.9%; $p < 0.05$). В группе КОНТР достоверного изменения угла перистости не наблюдалось (−1.0 ± 1.8%; $p = 0.83$). Т-тест показал, что относительные изменения были достоверно больше для КОН/ЭКС$^+$ группы ($p < 0.05$), чем для КОН/ЭКС группы.

Для изменения PCSA обнаружен значимый эффект “времени” ($F = 44$; $p < 0.05$; $k = 1$) и взаимодействия “группа × время” ($F = 18$; $p < 0.05$; $k = 2$). Только в КОН/ЭКС$^+$ группе наблюдалось достоверное увеличение (15.2 ± 7.9%; $p < 0.05$). При этом в КОН/ЭКС группе (6.1 ± 6.2%; $p = 0.052$) и в группе КОНТР (0.1 ± 1.8%; $p = 1.00$) значимых различий не обнаружено. Т-тест показал, что относительные изменения были достоверно больше для КОН/ЭКС$^+$ группы ($p < 0.05$), чем для КОН/ЭКС группы.

Для длины пучка (FL) не обнаружено значимого влияния времени ($F = 0.66$; $p = 0.42$; $k = 1$), группы ($F = 0.49$; $p = 0.61$; $k = 2$) или их взаимодействия ($F = 0.42$; $p = 0.66$; $k = 2$), что указывает на отсутствие значимых изменений данного показателя во всех трех группах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования было получено несколько важных результатов: 1) даже при равном тренировочном объеме протокол с акцентированной эксцентрической нагрузкой, применяемый в группе КОН/ЭКС$^+$ оказался более эффективен в стимуляции гипертрофии исследуемых мышц, чем традиционный высокоинтенсивный протокол, применяемый в группе КОН/ЭКС; 2) показано, что угол перистости волокон (θ) и PCSA увеличились в ходе тренировочного периода в большей степени, чем ACSA и объем мышцы.

Проведенные ранее исследования показали связь между механическим напряжением, развиваемым сократительным аппаратом, и мышечной гипертрофией, определяя механический фактор одним из наиболее важных стимулов роста мышц [27]. Механическое напряжение, передающееся на цитоскелет волокна, может влиять на внутриклеточную сигнализацию и регулировать скорость синтеза белка в мышечной клетке. Основываясь на этих соображениях, в настоящей работе были предприняты попытки потенцирования эффектов силовой тренировки с помощью метода акцентированных супрамаксимальных эксцентрических нагрузок, задача которых – достижение более высокого крутящего момента. Такая организация нагрузки позволяет обеспечить достаточно высокий механический стимул для активации ростовых процессов в мышечных клетках. В настоящем исследовании испытуемые в группе КОН/ЭКС$^+$ выполняли эксцентрическую фазу упражнения с интенсивностью 140% от концентрического повторного максимума, т.е., на 60% больше, чем участники из группы КОН/ЭКС. При этом для обеспечения равнозначности тренировочного объема участники из группы КОН/ЭКС выполняли на ~40% больше подходов упражнения. Результаты эксперимента, которые представлены в табл. 1, показали, что прирост ACSA и объема мышц за 13 нед. экспериментального периода составил 12.2% в группе КОН/ЭКС$^+$ ($p < 0.05$) и 5% в группе КОН/ЭКС ($p < 0.05$). Полученный прирост в обеих группах согласуется с данными, приведенными другими авторами, где применялись максимальные эксцентрические сокращения [6, 9, 10, 22, 28]. Авторы сообщили о средней гипертрофии мышечной ткани на 3–13% у нетренированных лиц. Учитывая тот факт, что выборку в данном исследовании составили тренированные люди, это дает нам достаточные основания рассматривать полученный прирост как значительный. Положительные результаты настоящей работы мы склонны объяснять такой организацией тренировочного процесса, при которой старались соблюсти все факторы, интенсифицирующие нагрузку, неучтенные в прошлых исследованиях. В отличие от большинства предыдущих работ, посвященных сравнению морфологической адаптации мышц в ответ на эксцентрические или концентрические силовые тренировочные программы, мы ставили своей задачей поиск наиболее оптимального сочетания двух рассматриваемых режимов, применяемых комплексно при силовой подготовке спортсмена. Также, в отличие от предыдущих исследований, использовавших изокинетические динамометры, мы использовали традиционный изотонический тип силовой тренировки. Как уже говорилось выше, изотонические эксцентрические сокращения требуют большей нервно-мышечной активации в начальной фазе движения вследствие более высокой угловой скорости и крутящего момента [21]. Кроме того, рост мышечной массы в настоящем исследовании мог быть интенсифицирован также и относительно высокой скоростью выполнения эксцентрической части движения. Действительно, ранее было показано, что высокоскоростные эксцентрические сокращения способствуют большей гипертрофии мышц по сравнению с медленными эксцентрическими сокращениями [10, 28]. Это говорит о том, что высокая угловая скорость может быть фактором, благоприятствующим

Таблица 1. Среднегрупповые показатели площади поперечного сечения (ACSA), объема, угла перистости (θ), физиологической площади поперечного сечения (PCSA) и длины пучка (FL) латеральной головки четырехглавой мышцы (VL)
Table 1. Average outcome measures of anatomical cross-sectional area (ACSA), volume, pennation angle (θ), physiological cross-sectional area (PCSA) and fascicle length (FL) of the *Vastus lateralis* muscle (VL)

	Группа Group	До Pre-training	После Post-training	Δ%
ACSA, см^2 ACSA, cm^2	КОН/ЭКС$^+$ CON/ECC$^+$	34.5 ± 7.7	38.4 ± 7.6*	12.2 ± 8.2†
	КОН/ЭКС CON/ECC	32.3 ± 6.7	34 ± 7.1*	5.0 ± 1.6
	КОНТР CONTR	31.6 ± 6.4	31.7 ± 6.5	0.1 ± 1.5
Объем, см^3 Volume, cm^3	КОН/ЭКС$^+$ CON/ECC$^+$	747 ± 164	835 ± 168*	12.4 ± 8.2†
	КОН/ЭКС CON/ECC	704 ± 178	742 ± 185*	5.4 ± 1.8
	КОНТР CONTR	692 ± 109	693 ± 111	0.1 ± 1.5
θ, град θ, deg	КОН/ЭКС$^+$ CON/ECC$^+$	19.9 ± 3.4°	24.8 ± 3.6°*	25.5 ± 9.6°†
	ЭКС/КОН CON/ECC	20.1 ± 2.6°	21.7 ± 2.7°*	7.8 ± 0.9°
	КОНТР CONTR	17.9 ± 1.7°	17.7 ± 1.7°	−1.0 ± 1.8°
PCSA, см^2 PCSA, cm^2	КОН/ЭКС$^+$ CON/ECC$^+$	124 ± 20	143 ± 24*	15.2 ± 7.9†
	КОН/ЭКС CON/ECC	123 ± 33	130 ± 33	6.1 ± 6.2
	КОНТР CONTR	121 ± 28	121 ± 27	0.1 ± 1.8
FL, мм FL, mm	КОН/ЭКС$^+$ CON/ECC$^+$	60.3 ± 0.7	60.4 ± 0.6	1.1 ± 2.1
	КОН/ЭКС CON/ECC	60.1 ± 1.7	60.2 ± 0.7	0.7 ± 4.1
	КОНТР CONTR	65.1 ± 0.6	65.1 ± 0.6	−0.1 ± 2.4

Значения представлены как среднее ± σ. * – $p < 0.05$ – достоверность различий между величинами до и после. † – $p < 0.05$ – достоверно отличается от КОН/ЭКС и КОНТР групп.
Values are means ± σ. * – $p < 0.05$ – significantly different from pre values. † – $p < 0.05$ – significantly different from CON/ECC and CONTR.

синтезу белка. Все эти факторы в совокупности позволили участникам из КОН/ЭКС$^+$ группы добиваться более высоких темпов прироста мышечной ткани.

Наряду с морфологическими параметрами скелетной мышцы, не менее важным детерминантом функциональных характеристик мышцы является ее внутренняя архитектура, то есть, физическое расположение пучков и волокон. Мы наблюдали значительно бóльшее увеличение угла перистости в группе КОН/ЭКС$^+$ (25.5%, $p < 0.05$) по сравнению с участниками из группы КОН/ЭКС (7.8%; $p < 0.05$), что абсолютно закономерно привело к увеличению PCSA. Между размером мышц и углом перистости существует сильная положительная зависимость. Параллельное добавление саркомеров приводит к увеличению диаметра волокон, что, в свою очередь, приводит увеличению угла наклона мышечных пучков по отношению к оси мышцы для более плотной упаковки волокон. Следствием данных архитектурных адаптаций является увеличение физиологического поперечника. Предыдущие исследования, изучавшие четырехглавую мышцу бедра человека с помощью комбинированной биопсии мышц и макроскопических методов визуализации мышц (МРТ, КТ) показали, что увеличение площади поперечного сечения волокна превосходит ACSA в ответ на силовую тренировку [29, 30]. В целом наши данные убедительно свидетельствуют о том, что угол перистости непрерывно увеличивается, по крайней мере, в течение первых нескольких месяцев тренировок, причем, увеличение архитектурных показателей опережает рост морфологических.

Таким образом, полученные данные подтвердили гипотезу о том, что выполнение тренировочных упражнений с акцентированной эксцентрической нагрузкой приводит к более значительному увеличению показателей мышечной гипертрофии в сравнении с традиционными силовыми тренировками. Внедрение эксцентрических нагрузок с супрамаксимальными отягощениями в тренировочные программы может способствовать стабильному накоплению миофибриллярных белков, что закономерно приведет к повышению скоростно-силовых показателей и росту результатов в соревновательных упражнениях. Показано также, что использованные в настоящей работе показатели архитектурного анализа мышечного аппарата дополняют данные морфологического анализа и создают целостное представление о степени гипертрофии мышц. Необходимо отметить, что при планировании длительной тренировочной программы с использованием данной тренировочной модели следует соблюдать осторожность, поскольку риск травмы может быть выше, чем при традиционной силовой тренировке с отягощениями.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы сообщают, что не получали никакого финансирования и все затраты на исследование были личными вкладами авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fry A.C.* The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. Sports Med. 34(10): 663–679. 2004.
2. *Hahn D.* Stretching the limits of maximal voluntary eccentric force production *in vivo*. J. Sport Health Sci. 7(3): 275–281. 2018.
3. *Herzog W., Schappacher G., DuVall M., Leonard T.R., Herzog G.A.* Residual force enhancement following eccentric contractions: a new mechanism involving titin. Physiology. 31(4): 300–312. 2016.
4. *Hoppeler H.* Moderate Load Eccentric Exercise; A Distinct Novel Training Modality. Front. Physiol. 7(483): 1–12. 2016.
5. *Hollander D.B., Kraemer R.R., Kilpatric M.W., Ramadan Z.G., Reeves G.V., Francois M., Hebert E.P., Tryniecki J.L.* Maximal eccentric and concentric strength discrepancies between young men and women for dynamic resistance exercise. J. Strength Cond. Res. 21(1): 34–40. 2007.

6. *Maeo S., Shan X., Otsuka S., Kanehisa H., Kawakami Y.* Neuromuscular Adaptations to Work-matched Maximal Eccentric versus Concentric Training. Med. Sci. Sports Exerc. 50(8): 1629–1640. 2018.
7. *Vikne H., Refsnes P.E., Ekmark M., Medbo J.I., Gundersen V., Gundersen K.* Muscular performance after concentric and eccentric exercise in trained men. Med. Sci. Sports Exerc. 38(10): 1770–1781. 2006.
8. *Roig M., O'Brien K., Kirk G., Murray R., McKinnon P., Shadgan B., Reid W.D.* The effects of eccentric versus concentric reistance training on muscle strength and mass in healthy adult subjects: a systematic review with meta-anaysis. Br. J. Sports Med. 43(8): 556–568. 2009.
9. *Seger J.Y., Arvidsson B., Thorstensson A.* Specific effects of eccentric and concentric training on muscle strength and morphology in humans. Eur. J. Appl. Physiol. 79(1): 49–57. 1998.
10. *Farthing J.P., Chilibeck P.D.* The effects of eccentric and concentric training at different velocities on muscle hypertrophy. Eur. J. Appl. Physiol. 89(6): 578–586. 2003.
11. *Friedmann-Bette B., Bauer T., Kinscherf R., Vorwald S., Klute K., Bischoff D., Müller H., Weber M., Metz J., Kauczor H., Bärtsch P., Billeter R.* Effects of strength training with eccentric overload on muscle adaptation in male athletes. Eur. J. Appl. Physiol. 108(4): 821–836. 2010.
12. *Hortobágyi T., Hill J.P., Houmard J.A., Fraser D.D., Lambert N.J., Israel R.G.* Adaptive responses to muscle lengthening and shortening in humans. J. Appl. Physiol. 80(3): 765–772. 1996.
13. *Hortobágyi T., Dempsey L., Fraser D., Zheng D., Hamilton G., Lambert J., Dohm L.* Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. J. Physiol. 524(Pt1): 293–304. 2000.
14. *Paddon-Jones D., Leveritt M., Lonergan A., Abnernethy P.* Adaptation to chronic eccentric exercise in humans: the influence of contraction velocity. Eur. J. Appl. Physiol. 85(5): 466–471. 2001.
15. *Friedmann B., Kinscherf R., Vorwald S., Muller H., Kucera K., Borisch S., Richter G., Bartsch P., Billeter R.* Muscular adaptations to computerguided strength training with eccentric overload. Acta Physiol Scand. 182(1): 77–88. 2004.
16. *Moore D.R., Young M., Phillips S.M.* Similar increases in muscle size and strength in young men after training with maximal shortening or lengthening contractions when matched for total work. Eur. J. Appl. Physiol. 112(4): 1587–1592. 2012.
17. *Franchi M.V., Atherton P.J., Reeves N.D., Flück M., Williams J., Mitchell W.K., Selby A., Beltran-Valls R.M., Narici MV.* Architectural, functional and molecular responses to concentric and eccentric loading in human skeletal muscle. Acta. Physiol. (Oxf). 210(3): 642–654. 2014.
18. *Unlu G., Cevikol C., Melekoglu T.* Comparison of the effects of eccentric, concentric, and eccentric-concentric isotonic resistance training at two velocities on strength and muscle hypertrophy. J. Strength Cond. Res. 34(2): 337–344. 2019.
19. *Pain M.T., Young F., Kim J, Forrester S.E.* The torque-velocity relationship in large human muscles: maximum voluntary versus electrically stimulated behaviour. J. Biomech. 46(4): 645–650. 2013.
20. *Norrbrand L., Fluckey J.D., Pozzo M., Tesch P.A.* Resistance training using eccentric overload induces early adaptations in skeletal muscle size. Eur. J. Appl. Physiol. 102(3): 271–281. 2008.
21. *Guilhem G., Cornu C., Maffiuletti N.A., Guével A.* Neuromuscular adaptations to isoload versus isokinetic eccentric resistance training. Med. Sci. Sports Exerc. 45(2): 326–335. 2013.
22. *Guilhem G., Cornu C., Guével A.* Neuromuscular and muscle-tendon system adaptations to isotonic and isokinetic eccentric exercise. Ann. Phys. Rehabil. Med. 53(5): 319–341. 2010.
23. *Brandenburg J.P., Docherty D.J.* The effects of accentuated eccentric loading on strength, muscle hypertrophy, and neural adaptations in trained individuals. Strength Cond. Res. 16(1): 25–32. 2002.
24. *Walker S., Blazevich A.J., Haff G.G., Tufano J.J., Newton R.U., Häkkinen K.* Greater strength gains after training with accentuated eccentric than traditional isoinertial loads in already strength-trained men. Front. Physiol. 7:149-161. 2016.
25. *Aagaard P., Andersen J.L., Dyhre-Poulsen P., Leffers A.M, Wagner A., Magnusson S.P., Halkjær-Kristensen J., Simonsen E.B.* A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. J. Physiol. 534(Pt 2): 613–623. 2001.
26. *Massey G., Evangelidis P., Folland J.* Influence of contractile force on the architecture and morphology of the quadriceps femoris. Exp. Physiol. 100(11): 1342–1351. 2015.
27. *Hessel A.L., Lindstedt S.L., Nishikawa K.C.* Physiological mechanisms of eccentric contraction and its applications: a role for the giant titin protein. Front. Physiol. 8(8): 1–10. 2017.
28. *Shepstone T.N., Tang J.E., Dallaire S., Schuenke M.D., Staron R.S., Phillips S.M.* Short-term high- vs. low-velocity isokinetic lengthening training results in greater hypertrophy of the elbow flexors in young men. J. Appl. Physiol. 98(5): 1768–1776. 2005.
29. *Esmarck B., Andersen J.L., Olsen S., Richter E.A., Mizuno M, Kjaer M.* Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. J. Physiol. 535(Pt 1): 301–311. 2001.
30. *Häkkinen K., Newton R.U., Gordon S.E., McCormick M., Volek J.S., Nindl B.C., Gotschalk L.A., Campell W.W., Evans W.J., Häkkinen A., Humphries B.J., Kræmer W.J.* Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 53(6): 415–423. 1998.

Effect of Accentuated Eccentric Loading on Muscle Hypertrophy and Architecture

K. V. Sergeeva[a], * and R. V. Tambovtseva[a]

[a] *Russian State University of Physical Culture, Sports, Youth and Tourism (GTSOLIFK), Moscow, Russia*
**e-mail: sergeeva_xenia@mail.ru*

The purpose of this study was to determine the effects of accentuated eccentric loading vs. traditional strength training on hypertrophy and architecture of *vastus lateralis* muscle (VL). The main difference between the chosen strength protocol from the conventional strength training protocol that it applies a supramaximal external load during the eccentric phase of the lift, that is, the value exceeding the concentric repetition maximum. The training volume between the experimental groups was equalized. Volunteers that were engaged in strength sports trained two times a week for 13 weeks. Morphological and architectural parameters of the muscles were evaluated using magnetic resonance imaging and ultrasonography. The results of the experiment showed that the most significant increase in anatomical cross-sectional area (ACSA), muscle volume, pennation angle, and physiological cross-sectional area (PCSA) of VL were obtained in the group using an accentuated eccentric loading. This effect can be associated with the use of higher intensity and as a consequence of the greater mechanical strain applied to the muscle, which caused a more pronounced adaptive response. Besides, it was shown that the pennation angle and PCSA increased to a greater extent than ACSA and muscle volume. Our data strongly suggest a close relationship between the pennation angle and muscular hypertrophy. An increase in this parameter that might be driven by space constraints in the hypertrophying muscle can be a reliable indicator of the degree of muscle hypertrophy.

Keywords: hypertrophy, muscle architecture, pennation angle, eccentric contraction

ЦИТИРОВАТЬ:

Сергеева К.В., Тамбовцева Р.В. Влияние “акцентированной эксцентрической нагрузки” на гипертрофию и архитектуру мышц. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1302–1311.
DOI: 10.31857/S086981392010009X

TO CITE THIS ARTICLE:

Sergeeva K.V., Tambovtseva R.V. Effect of Accentuated Eccentric Loading on Muscle Hypertrophy and Architecture. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1302–1311.
DOI: 10.31857/S086981392010009X

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 10, с. 1312–1320

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС

© 2020 г. Б. Г. Юшков[1, 2, 3], С. А. Бриллиант[1, 3, *]

[1]*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия*

[2]*Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, Екатеринбург, Россия*

[3]*Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия*

**E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru*

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.
После доработки 05.07.2020 г.
Принята к публикации 18.08.2020 г.

С помощью фракционного центрифугирования эритроцитов периферической крови интактных крыс удается выделить шесть фракций клеток, отличающихся содержанием и соотношением разных изоформ гемоглобина. Распределение гемоглобина в эритроцитах характеризуется тем, что если в цельной крови определяется шесть изоформ белка, то в клетках каждой отдельной фракции только две. Эритроциты с изоформами меньшей молекулярной массы содержат меньший процент гемоглобинов с кислото- и щелочеустойчивыми свойствами.

Ключевые слова: фракционное центрифугирование, типы эритроцитов, изоформы гемоглобина, гетерогенность гемоглобина, фетальный гемоглобин

DOI: 10.31857/S0869813920090095

На данный момент описаны первичные структуры более 600 вариантов гемоглобинов различных животных [1–4]. Довольно часто в крови одного организма определяется несколько гемоглобинов, которые принято называть изоформами, иногда близких по свойствам, а иногда значительно различающихся. Так, в крови взрослого человека циркулирует три изоформы гемоглобина, у птиц – две [5, 6], у крысы – шесть [5, 7, 8], а по некоторым данным девять [9].

Вместе с тем, возникает вопрос о количестве видов гемоглобина в одном эритроците: содержит ли он одну или несколько изоформ, каких и сколько. В работе Betke и Kleihauer утверждается, что у взрослого человека фетальный гемоглобин содержится лишь в небольшом числе красных клеток [10]. Сходные данные получены Стародубом и Назаренко относительно гемоглобинов крыс: фракции, обозначенные авторами как пятая и шестая также обнаружены лишь в некоторых эритроцитах [11]. Ряд авторов допускает, что один эритроцит может содержать несколько типов гемоглобина, в частности, в клетках с фетальным гемоглобином имеется определенное количество гемоглобина А [12]. Однако вопрос о распределении разных изоформ гемоглобина в эритроцитах остается не решенным.

Цель исследования – оценить распределение изоформ гемоглобина с разной молекулярной массой в эритроцитах крыс.

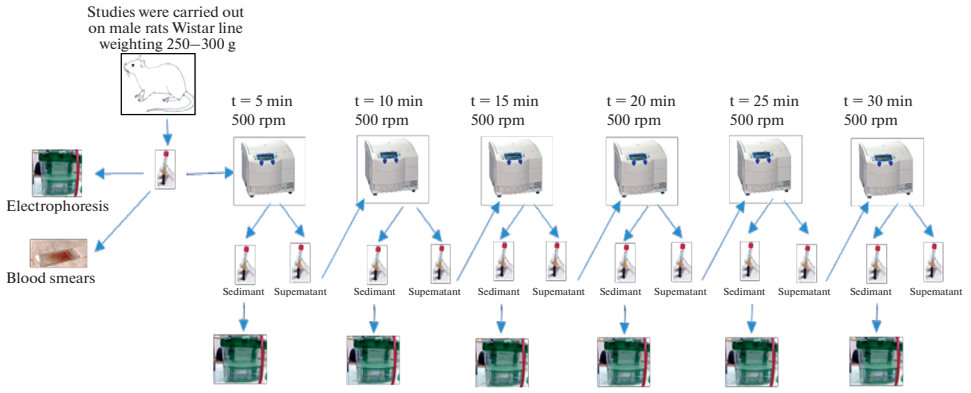


Рис. 1. Схема разделения эритроцитов на фракции.

Fig. 1. Scheme of separation the erythrocytes on fractions.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 18 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС2010/63/EU), а также Этического комитета ИИФ УрО РАН.

Кровь в объеме 6 мл забирали из хвостовой вены животных, наркотизированных с помощью диэтилового эфира. Животные после забора крови оставались живыми. 1 мл цельной крови использовали для проведения общего анализа и определения фракций гемоглобина. Оставшуюся кровь использовали для разделения эритроцитов на фракции. Для этого 5 мл цельной крови разводили физиологическим раствором для внутривенных инъекций (производство Solopharm ООО Гротекс, Россия) в соотношении 1 : 1 и центрифугировали на центрифуге Sigma 3R30 (Россия) в течение 5 мин (1-я проба) при 500 об/мин (RCF = 19.56 *g*). Полученный осадок разводили физиологическим раствором до объема 0.5 мл и прогоняли через геманализатор. Надосадочную жидкость доводили до 10 мл и повторно центрифугировали при 500 об/мин (RCF = 19.56 *g*), и так же, как и осадок, проводили измерения на геманализаторе Celly 70 фирмы Biocode-Hycel (Франция) в каждой пробе. Процедуру повторяли 6 раз, увеличивая время центрифугирования для каждой последующей пробы: 2-я проба – 10, 3-я проба – 15, 4-я – 20, 5-я – 25 и 6-я проба – 30 мин (рис. 1). После шестого центрифугирования эритроциты в надосадочной жидкости не выявлялись.

Таким образом, удавалось разделить эритроциты на 6 фракций. На гематологическом анализаторе Celly 70 фирмы Biocode-Hycel (Франция) оценивали качественные характеристики эритроцитов как в цельной крови, так и в каждой отдельной фракции, включая средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците и индекс анизоцитоза эритроцитов.

Для выявления эритроцитов, содержащих фетальные формы гемоглобина – ФК, мазки крови выдерживали в цитратно-фосфатном буфере (pH 4.5), затем в 1%-ном растворе эозина (метод Betke–Kleihauer) [10]. Подсчет ретикулоцитов осуществляли в мазках крови, окрашенных бриллиантовым крезиловым синим. Ретикулоциты и клетки с фетальным гемоглобином считали в мазках крови на 1000 эритроцитов, при увеличении 100× на световом микроскопе Leica DM 2500 (Германия).

Для определения изоформ гемоглобина приготовляли гемолизат из периферической крови по стандартной методике [13, 14]. Для приготовления образца к 0.5 мл цельной крови или взвеси эритроцитов (после центрифугирования) добавляли 0.5 мл физиологического раствора (соотношение 1 : 1) и центрифугировали при 3000 оборотах (RCF = 704.34 *g*) в течение 15 мин. Затем надосадочную жидкость сливали, осадок вновь разводили в 1 мл физиологического раствора и вновь центрифугировали при тех же условиях. Процедуру повторяли трижды. Гемолиз эритроцитов проводили осмотическим способом путем смешивания эритромассы с тремя объемами дистиллированной воды. Выбор осмотического гемолиза был обусловлен требованием сведения до минимума воздействия на структуру гемоглобина. После добавления дистиллированной воды смесь оставляли на 10 мин с целью выжидания полного разрушения эритроцитов. Затем добавляли 1 объем хлороформа. Встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали 5 мин при 3000 оборотах (RCF = 704.34 *g*). В результате центрифугирования смесь распределялась на три слоя: нижний слой – хлороформ, средний – клеточный детрит, верхний – раствор гемоглобина (гемолизат). К гемолизату добавляли равный объем 50%-ного раствора глицерина и содержали в холодильной камере при температуре 3–5°С. Данные образцы могли храниться в течение 2 недель.

Для определения соотношения между белковыми фракциями гемоглобина использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по Мауреру [14]. Электрофорез осуществлялся в ПААГ 10%-ной концентрации с помощью оборудования фирмы Bio-Rad (США). В лунки геля вносились образцы в количестве 200 мкл на 1 лунку. Для точного определения молекулярных масс в первую лунку вносился белковый стандарт Precision Plus Protein Standards Dual Color фирмы Bio-Rad (США). Диапазон молекулярных масс составлял от 10 до 250 кДа. С 2-й по 10-ю лунки геля вносили образцы гемолизата.

Электроды устанавливались таким образом, чтобы в верхнем электродном буфере располагался катод, а в нижнем – анод, поскольку гемоглобин по своей природе является полианионом. Это обеспечивало движение образца от катода к аноду. Электрофорез проводили в одной гелевой ячейке (конструкцией прибора предусмотрено использование двух ячеек). После полной подготовки системы к работе устанавливали силу тока 10 мА на время вхождения образца в концентрирующий гель, а затем 50 мА в течение 1 ч. После отключения источника питания электродные буферы сливали в сосуды, извлекали гелевую ячейку и отслаивали от геля переднюю стенку. Для лучшей диагностики проводили окрашивание полос бензидиновым раствором (смешивали 0.025 г основного бензидина и 0.1 г перекиси бария, перед исследованием добавляли 5 мл 50%-ного раствора уксусной кислоты и взбалтывали до полного растворения бензидина). Далее электрофореграмму подвергали моментальному сканированию и денситометрической обработке с помощью программы Image Lab 6.0.1. фирмы Bio-Rad (США), определяющей как соотношение отдельных изоформ гемоглобина, так и его молекулярную массу (рис. 2) [5, 13, 14].

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программном пакете Statistica 8.0. Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна–Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют, что в эритроцитах цельной крови определяются 6 изоформ гемоглобина, отличающиеся по электрофоретической подвижности (рис. 3), что соответствует данным других авторов [5, 7, 8]. В зависимости от молеку-

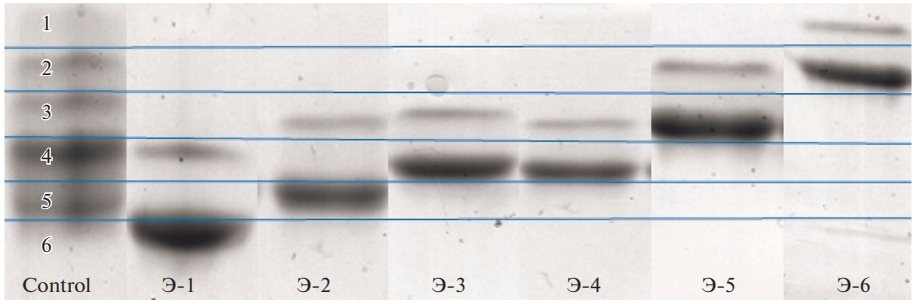


Рис. 2. Разгонка белковых фракций гемоглобина в норме и после фракционного центрифугирования.
Fig. 2. Acceleration of protein fractions of hemoglobin normal and after fractional centrifugation.

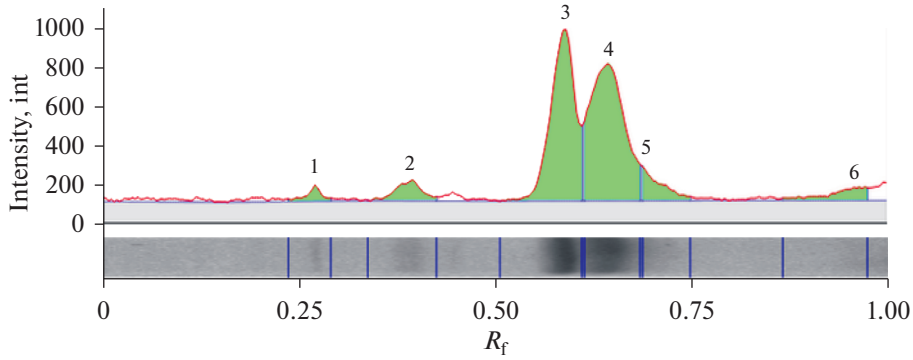


Рис. 3. Эритрофореграмма крыс без фракционного центрифугирования.
Fig. 3. Erythrophoregram of rats without fractional centrifugation.

лярной массы они были обозначены как: F1 – 52.27 ± 1.33 kDa, F2 – 56.9 ± 1.21 kDa, F3 – 63.0 ± 1.43 kDa, F4 – 70.71 ± 0.31 kDa, F5 – 81.67 ± 0.97 kDa и F6 – 86.86 ± 0.54 kDa.

Следует отметить, что только две фракции F3 и F4 соответствуют наиболее часто приводимой в литературе расчетной величине молекулярной массы гемоглобина 65–68 kDa, в то время, как F1 и F2 – меньше, а F5 и F6 – больше указанной величины.

Увеличение молекулярной массы может быть обусловлено полимеризацией. Феномен полимеризации гемоглобина показан, в частности, у рыб [15] и рептилий – черепах [16]. При удалении гемоглобина из цитозоля эритроцитов с помощью катионообменной хроматографии в последнем удается обнаружить более 600 разных белков [17], с которыми гемоглобин может образовывать комплексы. Отдельно следует выделить мембраносвязанную форму гемоглобина [2, 18]. Полимеризация гемоглобина происходит одинаково в растворах и клетках [19].

Феномен полимеризации используется при получении кислородоносителей на основе гемоглобина. В частности, при молекулярной массе тетрамера 64 кДа получают монодисперсные рекомбинантные полимеры человеческого гемоглобина 130 и 260 кДа, а также и пен-тетрамер с молекулярной массой 320 кДа [20, 21], отличающиеся по способности переносить кислород и вазоактивному действию.

Образование изоформ с меньшей молекулярной массой может быть связано с тем, что среди различных функций гемоглобина особое место занимает его роль в образовании биоактивных сигнальных молекул. Показано, что внутри эритроцитов человека происходит интенсивный протеолиз гемоглобина, приводящий к об-

Таблица 1. Морфологические характеристики различных фракций эритроцитов
Table 1. Morphological characteristics of various fractions of red blood cells

Фракции гемоглобина Fraction of hemoglobin	MCV, фл (средний объем эритроцитов) (red blood cell volume)	MCH, пг (среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците) (hemoglobin content in red blood cell)	MCHC, г/л (средняя концентрация гемоглобина в отдельном эритроците) (hemoglobin concentration in red blood cell)	RDW, % (показатель анизоцитоза) (anisocytosis rate)	Rt, % (ретикулоциты) (reticulocytes)	HbF, % (клетки с фетальным гемоглобином) (cells with fetal hemoglobin)
Контроль без разделения на фракции Control without dividing into fractions (n=18)	55.54 ± 0.32	17.7 ± 0.51	32.83 ± 1.08	14.12 ± 0.31	1.23 ± 0.06	1.32 ± 0.09
1 фракция 1 fraction (n =18)	54.95 ± 0.17	19.26 ± 0.11	35.05 ± 0.26	14.68 ± 0.15	4.4 ± 0.88*	2.27 ± 0.06*
2 фракция 2 fraction (n =18)	54.09 ± 0.08*	18.81 ± 0.14*	34.5 ± 0.44	14.51 ± 0.24	2.98 ± 0.22*	2.47 ± 0.1*
3 фракция 3 fraction (n =18)	53.6 ± 0.1*	18.32 ± 0.08	34.19 ± 0.22	14.85 ± 0.17*	1.32 ± 0.05	2.67 ± 0.11*
4 фракция 4 fraction (n =18)	53.31 ± 0.08*	18.52 ± 0.13	35.7 ± 0.16*	13.9 ± 0.21	1.14 ± 0.4	2.62 ± 0.09*
5 фракция 5 fraction (n =18)	49.61 ± 2.06	19.07 ± 0.16*	37.27 ± 0.47*	13.98 ± 0.2	0.67 ± 0.07*	0.7 ± 0.06*
6 фракция 6 fraction (n =18)	52.42 ± 0.19*	17.78 ± 0.11	34.13 ± 0.42	14.9 ± 0.21*	0.01 ± 0.008*	0.02 ± 0.001*

* – достоверные отличия от контроля ($p < 0.05$) .
* – significant differences from control ($p < 0.05$).

разованию и выделению пептидных соединений, обладающих регуляторными свойствами [22]. В супернатанте эритроцитов идентифицировано более 37 пептидов, которые стимулируют пролиферацию и гемопоэз, подавляют пролиферацию, обладают бактерицидным эффектом и др., что указывает на физиологическую значимость высвобождения пептидов эритроцитами [23].

С помощью использованного метода можно разделить эритроциты крысы на 6 фракций, отличающихся по своим морфологическим характеристикам (табл. 1)

Если в цельной крови выявляется 6 изоформ гемоглобина, то после фракционирования в клетках каждой из фракций только 2 (рис. 4).

Первую фракцию составляют эритроциты, содержащие наиболее тяжелые изоформы гемоглобина – F4 и F6 (в соотношении – 54.0% и 46.0%, в 1-й пробе соответственно), вторую – эритроциты с гемоглобинами F3 и F5 (в соотношении – 60% и 40% во 2-й пробе). Третья и четвертая содержат одинаковые изоформы F3 и F4, но отличаются по соотношению последних (третья – соотношение 33.3% и 66.7% в 3-й пробе, четвертая – соотношение 43.1% и 56.9% в 4-й пробе). Пятая фракция представлена эритроцитами с F2 и F3 изоформами (в соотношении – 37.1% и 62.9% в 5-й пробе), а шестая содержит самые легкие F1 и F2 гемоглобины (в соотношении 32.5% и 67.1% в 6-й пробе) (рис. 4).

Эритроциты фракций 1-4 содержат одинаковый процент фетальных клеток (ФК), превышающий показатель в цельной крови, в то время как во фракциях 5 и 6 содержание этих клеток минимальное. Количество ретикулоцитов во фракциях 1 и 2 выше, в 3-й и 4-й – соответствует, а в 5-й и 6-й меньше, чем в цельной крови.

Полученные данные о наличии в эритроците двух изоформ гемоглобина вполне согласуются с выявленным ранее фактом содержания двух форм гемоглобина в

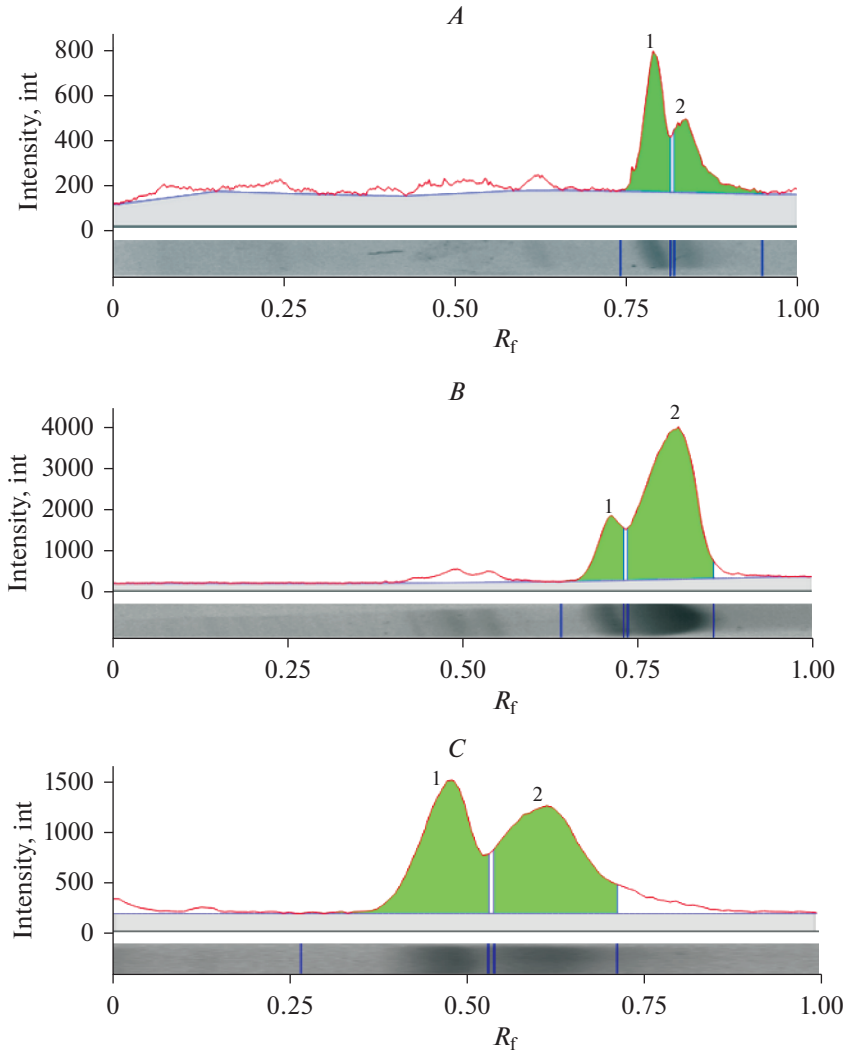


Рис. 4. Белковые фореграммы эритроцитов после фракционного центрифугирования при 500 об/мин: (*A*) 5 мин; (*B*) 10 мин; (*C*) 15 мин; (*D*) 20 мин; (*E*) 25 мин; (*F*) 30 мин.

Fig. 4. Erythrocyte protein foregramms after fractional centrifugation at 500 rpm: (*A*) 5 min; (*B*) 10 min; (*C*) 15 min; (*D*) 20 min; (*E*) 25 min; (*F*) 30 min.

ФК: HbF и HbA, при этом на долю первого приходится до 25% общего Hb в эритроците [12].

Изменения соотношения между эритроцитами с различными изоформами гемоглобина могут играть существенную роль в механизмах адаптации организма к действию экстремальных факторов и при патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью фракционного центрифугирования эритроцитов периферической крови крыс удается выделить шесть фракций клеток, различающихся по гемогло-

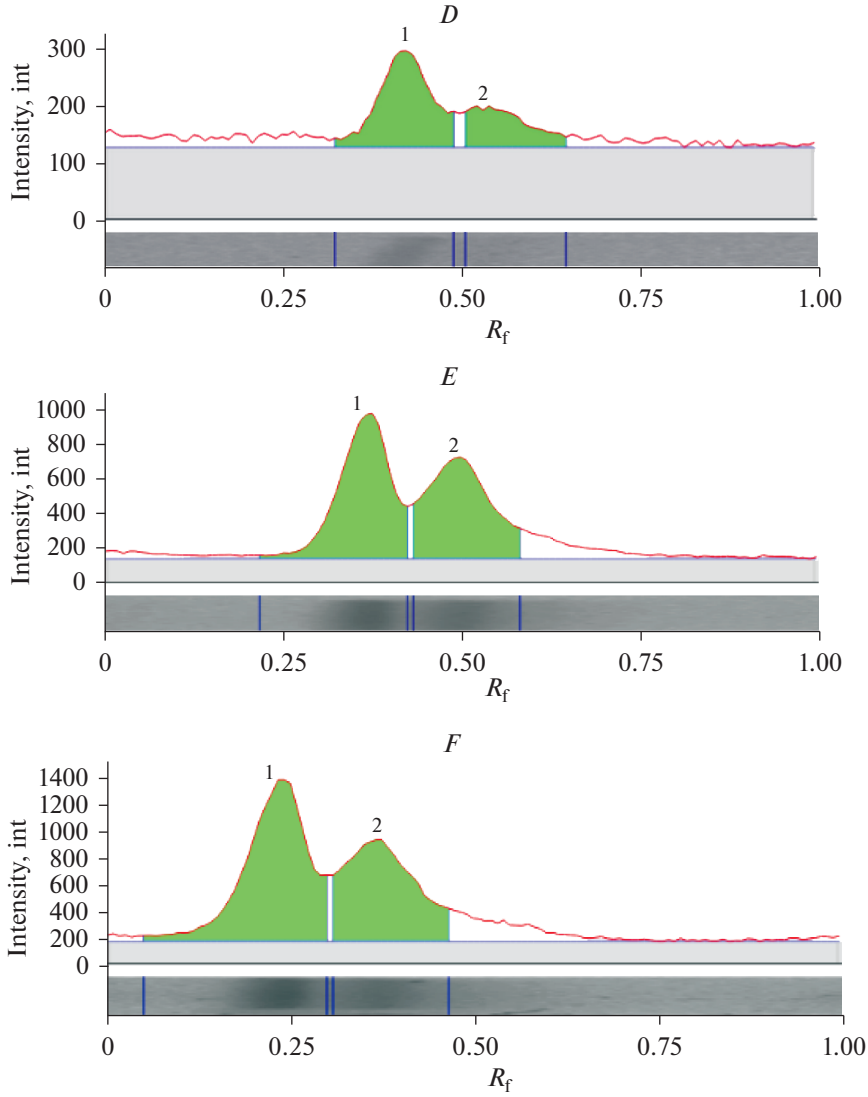


Рис. 4. Окончание

биновому профилю. Распределение гемоглобина в эритроцитах интактных крыс имеет ряд особенностей:

1. Определяемые в периферической крови крыс 6 изоформ гемоглобина распределяются между эритроцитами неравномерно.

2. Каждый эритроцит крысы содержит две изоформы гемоглобина.

3. Эритроциты отличаются как по видам изоформ гемоглобина, так и по соотношению между ними

4. Эритроциты, содержащие изоформы с меньшей молекулярной массой содержат меньший процент гемоглобинов с кислото- и щелочеустойчивыми свойствами.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gell D. A.* Structure and function of haemoglobins. Blood cells, molecules and diseases. 70: 13–42. 2018.
https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.10.006
2. *Топунов А.Ф., Космачевская О.В.* Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование. Биомика. 10(3): 251–267. 2018. [*Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V.* The multiplicity of hemoglobin functional forms in human organism: the modern view and practical applications. Biomics. 10(3):251–267. 2018. (In Russ)].
https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-34
3. *Ванин А.Ф.* Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. М. Институт комплексных исследований. 2015. [*Vanin A.F.* Dinitrosyl complexes of iron with thiol-containing ligands: physicochemistry, biology, medicine. M. Inst. Res. 2015. (In Russ)].
4. *Космачевская О.В., Топунов А.Ф.* Гемоглобины – разнообразие структур и функций. Приклад. биохим. и микробиол. 45(6): 627–653. 2009. [*Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F.* Hemoglobins - variety of structures and functions. Appl. Biochem. and Microbiol. 45(6): 627–653. 2009. (In Russ)].
5. *Сумин М.Н., Резайкин А.В., Юшков Б.Г.* Гетерогенность гемоглобина в условиях измененного эритропоэза. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 135 (6): 660–663. 2003. [*Sumin M.N., Rezaykin A.V., Yushkov B.G.* Heterogeneity of hemoglobin in conditions of altered erythropoiesis. Bull. Experim. Biol. and Med. 135 (6): 660–663. 2003. (In Russ)].
6. *Storz J.F.* Hemoglobin–oxygen affinity in high-altitude vertebrates: is there evidence for an adaptive trend? J. Experim. Biol. 219: 3190–3203. 2016.
https://doi.org/10.1242/jeb.127134
7. *Stein S., Cherian M.G., Mazur A.* Preparation and properties of six rat hemoglobin's. J. Biol. Chem. 246 (7): 5287–5293. 1971.
8. *Проскурина И.К., Титовский А.В.* Фракционный состав гемоглобина крысы при экспериментальной дегидратации. Ярославск. педагог. вестник. 3(21): 83–85. 1999. [*Proskurina I.K., Titovsky A.V.* The fractional composition of rat hemoglobin during experimental dehydration. Yaroslavl. Pedagog. Bull. 3(21): 83–85. 1999. (In Russ)].
9. *Datta M.C., Gilman J.G.* Rat hemoglobin heterogeneity: postnatal changes in proportions of multiple components and effects of erythropoietin on marrow cell cultures. Hemoglobin. 5(7–8): 701–14. 1981.
10. *Betke K., Kleihauer E.* Felaler and bleibender blutfarbstoff in erythrozyten und erythroblasten von menschlichen feten und neugeborene. Blut. 4: 241–250. 1958.
11. *Стародуб Н.Ф., Назаренко В.И.* Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль. Киев. Наукова Думка. 1987. [*Starodub N.F., Nazarenko V.I.* Heterogeneous hemoglobin system: structure, properties, synthesis, biological role. Kiev. Scien. Dumka. 1987. (In Russ)].
12. *Dover G.J.* Quantitation of hemoglobins within individual red cells: asynchronous biosynthesis of fetal and adult hemoglobin during erythroid maturation in normal subjects. Blood. 56(6): 1082–1091. 1980.
13. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М. Наука. 1981. [*Osterman L.A.* Research methods for proteins and nucleic acids. Electrophoresis and ultracentrifugation. M.: Science. 1981. (In Russ)].
14. *Maurer G.* Disc-electrophoresis. Theoria et praxis polyacrylamide gel electrophoresis. M. Mir. 1971.
15. *Hunt von Herbing I., Schroeder-Spain K.* Hemoglobin Polymerization in Red Blood Cells of Marine Fishes: A Case of Adaptive Phenotypic Plasticity? Biol. Bull. 236(1): 29–42. 2019.
https://doi.org/10.1086/700832
16. *Petersen A.G., Petersen S.V., Frische S., Drakulic S., Golas M.M., Sander B., Fago A.* Hemoglobin polymerization via disulfide bond formation in the hypoxia-tolerant turtle Trachemys scripta: implications for antioxidant defense and O_2 transport. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 314: 84–93. 2018.
17. *Bhattacharya D., Mukhopadhyay D., Chakrabarti A.* Hemoglobin depletion from red blood cell cytosol reveals new proteins in 2-D gel-based proteomics study. Proteomics. Clin. Appl. 1(6): 561–564. 2007.
https://doi.org/10.1002/prca.200700178

18. *Топунов А.Ф., Петрова Н. Э.* Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность. Успехи биол. хим. 1: 199–228. 2001. [*Topunov A.F., Petrova N.E.* Hemoglobins: evolution, distribution and heterogeneity. Advances in Biol. Chem. 1: 199–228. 2001. (In Russ)].
19. *Сергунова В.А., Манченко Е.А., Гудкова О.Е.* Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор). Общая реаниматол. 12(6): 49–63. 2016. [*Sergunova V.A., Manchenko E.A., Gudkova O.E.* Hemoglobin: modifications, crystallization, polymerization (review). Gen. Resuscit. 12(6): 49–63. 2016. (In Russ)]. D0I: https://doi.org/10.15360/1813-9779-2016-6-49-63
20. *Marquardt D.A., Doyle M.P., Davidson J.S., Epp J.K., Aitken J.F., Lemon D.D., Anthony-Cahil S.J.* Monodisperse 130 and 260 kDa Recombinant Human Hemoglobin Polymers as Scaffolds for Protein Engineering of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers. J. Funct. Biomater. 3(1): 61–78. 2012. https://doi.org/10.3390/jfb3010061
21. *Abassi Z., Kotob S., Pieruzzi F., Abouassali M., Keiser H.R., Fratantoni J.C., Alayash A.I.* Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. J. Lab. Clin. Med. 129(6): 603–610. 1997.
22. *Говорун В.М., Иванов В.Т.* Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. Биоорган. химия. 37(2): 199–215. 2011. [*Govorun V.M., Ivanov V.T.* Proteomics and peptidomics in fundamental and applied medical research. Bioorgan. Chem. 37(2): 199–215. 2011. (In Russ)].
23. *Филиппова М.М., Хачин Д.П., Сазонова О.В. Блищенко Е.Ю., Яцкин О.Н., Назимов И.В., Карелин А.А., Иванов В.Т., Расстригин Н.А., Пивник А.В.* Фрагменты функциональных белков в приживающей культуре эритроцитов человека. Биоорган. химия 34(2):160-170. 2008. [*Filippova M.M., Khachin D.P., Sazonova O.V., Blishchenko E.Yu., Yatskin O.N., Nazimov I.V., Karelin A.A., Ivanov V.T., Rasstrigin N.A., Pivnik A.V.* Fragments of functional proteins in the surviving culture of human red blood cells. Bioorgan. Chem. 34(2): 160–170. 2008 (In Russ)].

Distribution Various Isoforms of Hemoglobin in Rat Red Blood Cells

B. G. Yushkov[a, b, c] and S. A. Brilliant[a, c, *]

[a] *Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia*

[b] *Yeltsin Ural Federal University, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Yekaterinburg, Russia*

[c] *Institute of Medical Cellular Technologies, Yekaterinburg, Russia*

**e-mail: svetlana.brilliant@bk.ru*

The six fractions of cells that differ in the content and ratio of different isoforms of hemoglobin can be isolated using fractional centrifugation of peripheral blood erythrocytes in intact rats. The distribution of hemoglobin in red blood cells is characterized by the fact that if six protein isoforms are determined in whole blood, then only two in the cells of each individual fraction. Red blood cells with isoforms of lower molecular weight contain a lower percentage of hemoglobins with acid-and alkali-resistant properties.

Keywords: fractional centrifugation, red blood cell types, hemoglobin isoforms, hemoglobin heterogeneity, fetal hemoglobin

ЦИТИРОВАТЬ:

Юшков Б.Г., Бриллиант С.А. Особенности распределения различных изоформ гемоглобина в эритроцитах крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1312–1320.

DOI: 10.31857/S0869813920090095

TO CITE THIS ARTICLE:

Yushkov B.G., Brilliant S.A. Distribution Various Isoforms of Hemoglobin in Rat Red Blood Cells. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1312–1320.

DOI: 10.31857/S0869813920090095