РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА
Том 108, № 5, 2022

Все статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в “Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology” ISSN 0022-0930, ©Pleiades Publishing, Ltd.

С О Д Е Р Ж А Н И Е

От редактора специального выпуска

Эндотелий церебральных сосудов: современные представления о физиологии и перспективы исследования в нейронауках 525

Обзорные и проблемные статьи

Клетки церебрального эндотелия и периваскулярной астроглии в регуляции нейрогенеза

Е. А. Тепляшина, Я. В. Горина, Е. Д. Хилажева, Е. Б. Бойцова, А. И. Мосягина, Н. А. Малиновская, Ю. К. Комлева, А. В. Моргун, Ю. А. Успенская, А. Н. Шуваев, А. Б. Салмина 530

Роль эндотелиального транспортера лизофосфатидилхолина Mfsd2a в поддержании целостности гематоэнцефалического барьера и поступления в мозг омега-3 полиненасыщенных жирных кислот

Р. Г. Парнова 547

Морфологические и гистофизиологические особенности эндотелия капилляров головного мозга

А. В. Егорова, Т. И. Баранич, А. В. Брыдун, В. В. Глинкина, В. С. Сухоруков 562

Влияние гиперкапнии и гипоксии на физиологию и метаболизм церебрального эндотелия в условиях ишемии

П. П. Трегуб 579

Патофизиологические подходы к изучению дисфункции эндотелия и методологические аспекты определения ее критериев в контексте моделирования гистогематического барьера

А. Г. Кутихин, Д. К. Шишкова, Е. А. Великанова, М. Ю. Синицкий, А. В. Синицкая, В. Е. Маркова 594

Анализ механизмов токсичности свинца и их патогенетическая коррекция

С. Г. Дзугкоев, Ф. С. Дзугкоева, О. И. Маргиева 626

Экспериментальные статьи

Изменение вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса и дилатацию пиальных артериий у стареющих крыс после ишемии/реперфузии

О. П. Горшкова, И. Б. Соколова 636

Особенности регуляции ангиогенеза в атеросклеротических бляшках каротидного синуса на поздних стадия развития атеросклероза

А. Н. Евдокименко, К. Н. Куличенкова, Т. С. Гулевская, М. М. Танашян 649

Прогнозируемые и экспериментально подтвержденные характеристики лактата: новые возможности для управления метаболизмом клеток эндотелия

Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, О. А. Гусякова 667

Метил-бета-циклодекстрин изменяет уровень белков плотных контактов в эндотелии сосудов головного мозга
А. Г. Марков, А. Е. Бикмурзина, А. А. Федорова, И. И. Кривой 677

Влияние индуктора нейровоспаления на компоненты нейроваскулярной единицы головного мозга *in vitro*
Е. В. Стельмашук, М. Р. Капкаева, Н. А. Розанова, О. П. Александрова, Е. Е. Генрихс, В. В. Обмолов, С. В. Новикова, Н. К. Исаев 686

CONTENTS

From the Editor of the Special Issue

Endothelium of Cerebral Vessels: Modern Ideas about Physiology and Prospects for Research in Neuroscience 525

Reviews

Cells of the Cerebral Endothelium and Perivascular Astroglia in the Regulation of Neurogenesis
E. A. Teplyashina, Ya. V. Gorina, E. D. Khilazheva, E. B. Boytsova, A. I. Mosiagina, N. A. Malinovskaya, Y. K. Komleva, A. V. Morgun, Yu. A. Uspenskaya, A. N. Shuvaev, and A. B. Salmina 530

Critical Role of Endothelial Lysophosphatidylcholine Transporter Mfsd2a in Establishing the Integrity of the Blood–Brain Barrier and in the Delivery of Omega-3 PUFA to the Brain
R. G. Parnova 547

Morphological and Histophysiological Features of the Brain Capillaries Endothelium
A. V. Egorova, T. I. Baranich, A. V. Brydun, V. V. Glinkina, and V. S. Sukhorukov 562

The Effect of Hypercapnia and Hypoxia on the Physiology and Metabolism of the Cerebral Endothelium in Ischemic Conditions
P. P. Tregub 579

Perspectives Talking about Endothelial Dysfunction in the Context of Modeling a Blood–Brain Barrier
A. G. Kutikhin, D. K. Shishkova, E. A. Velikanova, M. Yu. Sinitsky, A. V. Sinitskaya, and V. E. Markova 594

Analysis of the Mechanisms of Lead Toxicity and Their Pathogenetic Correction
S. G. Dzugkoev, F. S. Dzugkoeva, and O. I. Margieva 626

Experimental Articles

Changes in the Contribution of IK_{Ca}-Channels to the Maintenanse of Tone and Dilation of the Pial Arteries in Aging Rats after Ischemia/Reperfusion
O. P. Gorshkova, and I. B. Sokolova 636

Defining Characteristics of Angiogenesis Regulation in Advanced Human Carotid Plaques
A. N. Evdokimenko, K. N. Kulichenkova, T. S. Gulevskaya, and M. M. Tanashyan 649

Predicted and Experimentally Confirmed Lactate Characteristics: New Possibilities for the Management of Endothelial Cell Metabolism
F. N. Gilmiyarova, N. A. Kolotyeva, and O. A. Gusyakova 667

Methyl-Beta-Cyclodextrin Changes the Level of Tight Junction Protein in the Endothelium of the Cerebral Vessels
A. G. Markov, A. E. Bikmurzina, A. A. Fedorova, and I. I. Krivoi 677

Effect of the Neuroinflammation Inducer on the Components of the Neurovascular Unit of the Brain *in vitro*
E. V. Stelmashook, M. R. Kapkaeva, N. A. Rozanova, O. P. Alexandrova, E. E. Genrikhs, V. V. Obmolov, S. V. Novikova, and N. K. Isaev 686

EDN: EEVGAL
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 525–529

ОТ РЕДАКТОРА СПЕЦИАЛЬНОГО ВЫПУСКА

ЭНДОТЕЛИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ СОСУДОВ: СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФИЗИОЛОГИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В НЕЙРОНАУКАХ

DOI: 10.31857/S0869813922050132

Специальный номер Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова посвящен вопросам физиологии и метаболизма клеток церебрального эндотелия в норме и при патологии головного мозга. Выбор этого направления для представления обзорных и оригинальных статей российских ученых обусловлен все возрастающим интересом к изучению клеточно-молекулярных механизмов функционирования эндотелия сосудов головного мозга, актуальных в контексте патогенеза хронической нейродегенерации, нарушений развития, ишемического, инфекционного и травматического повреждения головного мозга [1–5].

Церебральный эндотелий обладает рядом свойств, отличающих его от эндотелия сосудов других органов и тканей. Клетки эндотелия микрососудов головного мозга имеют высокую экспрессию белков плотных и адгезионных контактов, а потому – низкую парацеллюлярную проницаемость, проявляют селективную трансцеллюлярную проницаемость, содержат большое количество митохондрий, экспрессируют ферменты, метаболизирующие ксенобиотики и эндогенные гидрофобные молекулы. Эти клетки являются объектом регуляции для иных клеток-компонентов нейроваскулярной единицы головного мозга (перициты, периваскулярные астроциты, нейроны) [6, 7] и участвуют в реализации механизмов глиоваскулярного контроля микроциркуляции, метаболического сопряжения клеток, нейропластичности, поддержания реологических свойств крови, регуляции локального иммунного ответа [8]. Кроме того, велика роль церебрального эндотелия в обеспечении процессов ангиогенеза и нейрогенеза как в эмбриональном периоде развития, так и на протяжении всего онтогенеза [9].

Будучи компонентами гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), клетки эндотелия обеспечивают его структурно-функциональную целостность, что важно для поддержания химического гомеостаза в ткани головного мозга. Преодоление ГЭБ и управляемое обратимое открытие барьера – важная задача современной нейрофармакологии [10]. Вместе с тем, при ряде патологических состояний проницаемость барьера аномально повышена, что сопровождается развитием нейровоспаления, и это актуализирует поиск новых способов восстановления целостности ГЭБ [11]. Менее изученным является участие клеток эндотелия в формировании и функционировании гематоликворного барьера (ГЛБ), однако очевидно, что такие механизмы существенны для транспорта соединений между периферической кровью и спинномозговой жидкостью, обеспечения функциональной активности сосудистого сплетения и регуляции работы нейрогенных ниш [12].

Прогресс в изучении физиологии и метаболизма клеток эндотелия церебральных микрососудов в последние годы во многом связан с созданием и развитием моделей ГЭБ и ГЛБ *in vitro*. В настоящее время в исследовательской практике используется широкий спектр статических и динамических моделей, которые позволяют воспроизвести многие механизмы межклеточных взаимодействий, обеспечи-

вающих функционирование клеток церебрального эндотелия в тесной связи с активностью нейронов, астроцитов, перицитов, иммунокомпетентных клеток, а также с компонентами внеклеточного матрикса [1, 3, 13, 14].

Вместе с тем, по-прежнему актуальна задача разработки и внедрения новых клеточных моделей гистогематических барьеров головного мозга, максимально полно учитывающих функциональные и биохимические характеристики клеток церебрального эндотелия. Такие модели должны быть воспроизводимыми, стандартизованными и удобными как для изучения механизмов работы барьерных тканей в (пато)физиологических условиях, так и для тестирования лекарств-кандидатов с потенциальным нейротропным эффектом. Одновременно эти модели могут выступать в качестве универсальной платформы для моделирования сложных мультиклеточных ансамблей, например, нейроваскулярной единицы, нейрогенной ниши и, в перспективе – ткани головного мозга в формате “орган-на-чипе” либо в составе микрофизиологических систем [15, 16]. Очевидно, что продвижение исследований и разработок в этом направлении невозможно без понимания фундаментальных механизмов функционирования клеток эндотелия сосудов головного мозга.

Статьи, вошедшие в специальный номер Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова, посвящены различным аспектам физиологии и патофизиологии клеток эндотелия церебральных сосудов, регуляции их метаболизма и экспрессионного профиля, оценке влияния на них повреждающих факторов, их способности к пролиферации и восстановлению, а также вопросам мониторинга состояния эндотелия, поиска маркеров эндотелиальной дисфункции для решения задач фундаментальных, трансляционных и клинических нейронаук.

География и методический уровень работ свидетельствуют о все возрастающем интересе и новых направлениях в изучении механизмов регуляции функциональной активности клеток церебрального эндотелия в норме и при патологии головного мозга, перспективах последующей трансляции этих результатов в клиническую практику. Так, несомненно, большой интерес читателей, все зависимости от степени их погруженности в вопросы физиологии и биохимии эндотелия сосудов головного мозга, вызовут результаты работы исследовательских групп из Санкт-Петербурга о механизмах поддержания структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера, определяемых эффектами полиненасыщенных жирных кислот [17], о механизмах нарушения мозгового кровотока при дизрегуляции активности калиевых каналов [18], об особенностях экспрессии белков плотных контактов при модуляции состава липидных рафт в мембранах [19], из Москвы – об особенностях строения эндотелия микрососудов головного мозга [20], о механизмах повреждения эндотелия микрососудов головного мозга при сочетанном действии гиперкапнии и гипоксии [21], об особенностях формирования атеросклеротических бляшек в каротидном синусе в контексте аберрантного ангиогенеза [22], о механизмах повреждения клеток-компонентов нейроваскулярной единицы головного мозга в модели нейровоспаления [23], из Красноярска – о роли церебрального эндотелия в регуляции нейрогенеза и эффективности оптогенетических протоколов для управления активностью клеток в составе нейрогенных ниш [24], из Владикавказа – о токсическом действии тяжелых металлов на клетки эндотелия [25], из Самары – о биологических эффектах лактата как метаболита с сигнальными функциями, в том числе применительно к клеткам эндотелия [26], из Кемерово – о новых подходах к оценке функции эндотелия, в том числе при моделировании гематоэнцефалического барьера [27]. Кроме того, в развитие этой проблематики в портфеле редакции находятся интересные работы о новых возможностях модуляции пролиферативной активности клеток эндотелия микрососудов головного мозга и о механизмах метаболического контроля церебрального

ангиогенеза (Красноярск), а также о новых взглядах на работу лимфатической системы головного мозга (Саратов), с которыми можно будет познакомиться в ближайших номерах Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова.

В целом, редакция журнала полагает, что результаты работ, выполненных различными научными группами, простимулируют читателей к новым идеям и междисциплинарным проектам, ориентированным на изучение вклада клеток эндотелия церебральных сосудов в механизмы пластичности головного мозга в норме и при патологии.

А.Б. Салмина
доктор медицинских наук, профессор
Научный центр неврологии (Москва),
Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)

Алла Борисова Салмина – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга Научного центра неврологии (Москва), главный научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск). Лауреат Золотой медали и Премии РАН для молодых ученых в номинации “физиология” (1999), лауреат Премии Правительства РФ в области науки и техники для молодых ученых за 2010 г., руководитель ведущей научной школы РФ в области медицины, поддержанной грантами Президента РФ (2014–2021), лауреат премии Scopus Award Russia (2016). Специалист в области нейробиологии и нейрохимии, клеточной и тканевой инженерии, патофизиологии, молекулярной медицины, биофизики. Сфера научных интересов: механизмы нейропластичности и развития головного мозга, молекулярные механизмы хронической нейродегенерации, (пато)физиология гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров, моделирование ткани головного мозга *in vitro*. Автор более 800 научных работ, опубликованных в ведущих россий-

ских и международных журналах, оригинальных учебных курсов на русском и английском языках по патофизиологии, биохимии, нейробиологии, молекулярной и трансляционной медицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Osipova ED, Komleva YK, Morgun AV, Lopatina OL, Panina YA, Olovyannikova RY, Vais EF, Salmin VV, Salmina AB* (2018) Designing in vitro blood-brain barrier models reproducing alterations in brain aging. Front Aging Neurosci 2018 10: 234.
https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00234
2. *Chen MB, Yang AC, Yousef H, Lee D, Chen W, Schaum N, Lehallier B, Quake SR, Wyss-Coray T* (2020) Brain endothelial cells are exquisite sensors of age-related circulatory cues. Cell Reports 30 (13): 4418–4432.e4.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.012
3. *Malinovskaya NA, Komleva YK, Salmin VV, Morgun AV, Shuvaev AN, Panina YA, Boitsova EB, Salmina AB* (2016) Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling. Front Physiol 7: 599.
https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00599
4. *McDonald CJ, Blankenheim ZJ, Drewes LR* (2021) Brain endothelial cells: metabolic flux and energy metabolism. Handb Exp Pharmacol.
https://doi.org/10.1007/164_2021_494
5. *Kuznetsova PI, Raskurazhev AA, Konovalov RN, Krotenkova MV, Chechetkin AO, Lagoda OV, Melikhyan AL, Tanashyan MM* (2021) Covert brain infarcts in patients with philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders. J Clin Med 11(1): 13.
https://doi.org/10.3390/jcm11010013
6. *Salmina AB, Kuvacheva NV, Morgun AV, Komleva YK, Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Gorina YV, Taranushenko TE, Petrova LL* (2015) Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. The Int J Biochem & Cell Biol 64: 174–184.
https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.005
7. *Osipova ED, Semyachkina-Glushkovskaya OV, Morgun AV, Pisareva NV, Malinovskaya NA, Boitsova EB, Pozhilenkova EA, Belova OA, Salmin VV, Taranushenko TE, Noda M, Salmina AB* (2018) Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability. Rev Neurosci 29(5): 567–591.
https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0092
8. *Erickson MA, Banks WA* (2018) Neuroimmune axes of the blood–brain barriers and blood–brain interfaces: bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions. Pharmacol Rev 70 (2) 278–314.
https://doi.org/10.1124/pr.117.014647
9. *Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Komleva YuK, Salmin VV, Salmina AB* (2017) Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. Rev Neurosci 28(4): 397–415.
https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0071
10. *Semyachkina-Glushkovskaya O, Kurths J, Borisova E, Sokolovski S, Mantareva V, Angelov I, Shirokov A, Navolokin N, Shushunova N, Khorovodov A, Ulanova M, Sagatova M, Agranivich I, Sindeeva O, Gekalyuk A, Bodrova A, and Rafailov E* (2017) Photodynamic opening of blood-brain barrier. Biomed Opt Express 8: 5040–5048.
https://doi.org/10.1364/BOE.8.005040
11. *Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, Dohgu S* (2021) Blood-brain barrier dysfunction amplifies the development of neuroinflammation: understanding of cellular events in brain microvascular endothelial cells for prevention and treatment of BBB dysfunction. Front Cell Neurosci 15: 661838.
https://doi.org/10.3389/fncel.2021.661838
12. *Johanson C* (2018) Choroid plexus blood-CSF barrier: major player in brain disease modeling and neuromedicine. J Neurol & Neuromed 3: 39–58.
https://doi.org/10.29245/2572.942X/2018/4.1194
13. *Mosiagina AI, Morgun AV, Salmina AB* (2021) Overview of existing in vitro BBB models: advantages and disadvantages, current state and future prospects. Complex Issues Cardiovasc Diseases 10(3): 109–120.
https://doi.org/10.17802/2306-1278-2021-10-3-109-120
14. *Salmina AB, Kharitonova EV, Gorina YV, Teplyashina EA, Malinovskaya NA, Khilazheva ED, Mosyagina AI, Morgun AV, Shuvaev AN, Salmin VV, Lopatina OL, Komleva YK* (2021) Blood–brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration. Int J Mol Sci 22: 4661.
https://doi.org/10.3390/ijms22094661
15. *Salman MM, Marsh G, Kusters I, Delincé M, Di Caprio G, Upadhyayula S, de Nola G, Hunt R, Ohashi KG, Gray T, Shimizu F, Sano Y, Kanda T, Obermeier B and Kirchhausen T* (2020) Design

and validation of a human brain endothelial microvessel-on-a-chip open microfluidic model enabling advanced optical imaging. Front Bioeng Biotechnol 8: 573775. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.573775

16. *Ahn SI, Sei YJ, Park HJ, et al.* (2020) Microengineered human blood–brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms. Nat Commun11: 175. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13896-7
17. *Парнова РГ* (2022) Роль эндотелиального транспортера лизофосфатидилхолина Mfsd2a в поддержании целостности гематоэнцефалического барьера и поступления в мозг омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 547–561.
18. *Горшкова ОП, Соколова ИБ* (2022) Изменение вклада IKCa-каналов в поддержание тонуса и дилатацию пиальных артерий у стареющих крыс после ишемии/реперфузии. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 636–648.
19. *Марков АГ, Бикмурзина АЕ, Федорова АА, Кривой ИИ* (2022) Метил-бета-циклодекстрин изменяет уровень белков плотных контактов в эндотелии сосудов головного мозга. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 677–685.
20. *Егорова АВ, Баранич ТИ, Брыдун АВ, Глинкина ВВ, Сухоруков ВС* (2022) Морфологические и гистофизиологические особенности эндотелия капилляров головного мозга. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 562–578.
21. *Трегуб ПП* (2022) Влияние гиперкапнии и гипоксии на физиологию и метаболизм церебрального эндотелия в условиях ишемии. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 579–593.
22. *Евдокименко АН, Куличенкова КН, Гулевская ТС, Танашян ММ* (2022) Особенности регуляции ангиогенеза в атеросклеротических бляшках каротидного синуса на поздних стадия развития атеросклероза. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 649–666.
23. *Стельмашук ЕВ, Капкаева МР, Розанова НА, Александрова ОП, Генрихс ЕЕ, Обмолов ВВ, Новикова СВ, Исаев НК* (2022) Влияние индуктора нейровоспаления на компоненты нейроваскулярной единицы головного мозга *in vitro*. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 686–696.
24. *Тепляшина ЕА, Горина ЯВ, Хилажева ЕД, Бойцова ЕБ, Мосягина АИ, Малиновская НА, Комлева ЮК, Моргун АВ, Успенская ЮА, Шуваев АН, Салмина АБ* (2022) Клетки церебрального эндотелия и периваскулярной астроглии в регуляции нейрогенеза. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 530–546.
25. *Дзугкоев СГ, Дзугкоева ФС, Маргиева ОИ* (2022) Анализ механизмов токсичности свинца и их патогенетическая коррекция. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 626–635.
26. *Гильмиярова ФН, Колотьева НА, Гусякова ОА* (2022) Прогнозируемые и экспериментально подтвержденные характеристики лактата: новые возможности для управления метаболизмом клеток эндотелия. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (5): 667–676.
27. *Кутихин АГ, Шишкова ДК, Великанова ЕА, Синицкий МЮ, Синицкая АВ, Маркова ВЕ* (2022) Патофизиологические подходы к изучению дисфункции эндотелия и методологические аспекты определения ее критериев в контексте моделирования гематоэнцефалического барьера. Рос физиол журнал им ИМ Сеченова 108 (5): 594–625.

EDN: JZMBXV
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 530–546

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

КЛЕТКИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНДОТЕЛИЯ И ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ АСТРОГЛИИ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА

© 2022 г. Е. А. Тепляшина[1, *], Я. В. Горина[1], Е. Д. Хилажева[1], Е. Б. Бойцова[1], А. И. Мосягина[1], Н. А. Малиновская[1], Ю. К. Комлева[1], А. В. Моргун[1], Ю. А. Успенская[1, 2], А. Н. Шуваев[1], А. Б. Салмина[1, 3]

[1]*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия*

[2]*Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия*

[3]*Научный центр неврологии, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.
После доработки 08.04.2022 г.
Принята к публикации 10.04.2022 г.

Гематоэнцефалический барьер представляет собой совокупность клеток в составе нейроваскулярной единицы головного мозга, выполняющих собственно барьерную функцию, а также участвующих в механизмах пластичности. Проницаемость гематоэнцефалического барьера определяется эффективностью формирования контактов между клетками церебрального эндотелия, механизмами трансцеллюлярной проницаемости, характером взаимодействия клеток эндотелия с периваскулярными клетками, в частности перицитами и астроцитами. Кроме того, проницаемость барьера является производной от активности всей нейроваскулярной единицы и влияет на процессы нейропластичности, в частности нейрогенез, который во взрослом головном мозге осуществляется в специализированных нейрогенных нишах, где поддержание пула стволовых и прогениторных клеток, их обновление, пролиферация, дифференцировка контролируются локальным микроокружением. Формирование этого микроокружения во многом определяется проницаемостью гематоэнцефалического барьера в микрососудах, составляющих сосудистую основу нейрогенных ниш. Поэтому функциональное сопряжение процессов нейрогенеза и неоангиогенеза является важным компонентом механизмов пластичности головного мозга. Процессы неоангиогенеза и нейрогенеза связаны между собой посредством эффектов широкого спектра регуляторных молекул: факторов роста, цитокинов, нейро- и глиотрансмиттеров и метаболитов. Современные технологии дают возможность разрабатывать новые протоколы управления активностью клеток, формирующих пронейрогенное и/или проангиогенное микроокружение. В обзоре обобщены современные представления о механизмах пластичности с участием клеток церебрального эндотелия и о возможностях управления или за счет адресного (оптогенетического) воздействия на периваскулярную астроглию.

Ключевые слова: нейрогенная ниша, нейрогенез, ангиогенез, церебральный эндотелий, локальное микроокружение

DOI: 10.31857/S0869813922050119

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Aβ	Амилоид бета
Angiopoetin (Ang)	Ангиопоэтин
AVV	Аденовирусный вектор
BDNF	Мозговой нейротрофический фактор
CA	Регион гиппокампа
CD	Кластер дифференцировки (трансмембранный гликопротеин)
ChR2	Фоточувствительный белок каналородопсин 2
CXCL	Хемокин
Cx43	Белок щелевых контактов
Delta-like ligand-4 (DLL4)	Лиганд Notch
EGF	Эпидермальный фактор роста
FOX	Фактор транскрипции
FGF2	Основный фактор роста фибробластов
GFAP	Глиальный кислый фибриллярный белок
GPR81	Рецептор лактата
GSK-3	Киназа гликогенсинтазы 3
HIF-1	Гипоксия-индуцибельный фактор транскрипции
HMGB1 (амфотерин)	Белок из группы ядерных негистоновых белков HMG
IGF	Инсулиноподобный фактор роста
JAM	Белок адгезионных контактов
LIF	Лейкемия-ингибирующий фактор
MCT1	Монокарбоксилатный транспортер
Nestin	Маркер стволовых клеток
NeuroD1	Фактор нейрогенной дифференцировки 1
NT3	Нейротрофин
Notch	Трансмембранный рецептор
NO	Монооксид азота
PCNA	Маркер пролиферирующих клеток
PEDF	Пигментный эпителиальный фактор
PIGF-2	Плацентарный фактор роста 2
SGZ	Субгранулярная зона
SCF	Фактор роста стволовых клеток
SVZ	Субвентрикулярная зона
Shh	Sonic hedgehog
Stalk-cells	Пролиферирующие клетки эндотелия
Tip-cells	Мигрирующие клетки эндотелия
TGF	Трансформирующий фактор роста-β
VEGF	Сосудисто-эндотелиальный фактор роста
Wnt	Сигнальный белок
ГАМК	Гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ	Гематоэнцефалический барьер
ИЛ1бета (IL1β)	Интерлейкин 1 бета
НВЕ	Нейроваскулярная единица
НПК	Нейрональные прогениторные клетки
НСК	Нейральные стволовые клетки

Развитие и функционирование головного мозга включает в себя значительное разнообразие клеточных и молекулярных событий, отражающих явление нейропластичности (формирование новых клеток, их миграция и интеграция в межклеточные ансамбли, межклеточная сигнализация, метаболические преобразования, элиминация отдельных клеточных структур, гибель клеток) [1]. В процессе жизнедеятельности в организме наблюдаются сложные регулируемые изменения стволовых клеток и появление новых клеточных структур головного мозга – нейронов, астроцитов, олигодендроцитов. Нейрогенез рассматривается как один из наиболее важных процессов взрослого мозга, реализующий адаптивный и репаративный потенциал, а также включающий несколько этапов развития: трансформацию нейральных стволовых клеток (НСК), пролиферацию нейрональных прогениторных клеток (НПК), селекцию, миграцию, дифференцировку, вовлечение сформированного зрелого нейрона в нейрональную сеть [2]. Ключевая роль в пластичности клеточных структур мозга отводится стволовым и прогениторным клеткам, дающим начало разным видам клеток – нейрональной, астроглиальной и олигодендроглиальной природы – в зависимости от состояния локального микроокружения нейрогенных ниш, активности отдельных регионов мозга, “запроса” на увеличение генерации того или иного вида клеток. При этом стволовым клеткам свойственны самообновление (сохранение когорты стволовых клеток) и мультипотентность (формирование различных типов клеток из прогениторных клеток) [3].

Открытие феномена нейрогенеза взрослого мозга обладает фундаментальной и универсальной значимостью. Нейрогенез является процессом, объединяющим клеточную пролиферацию, миграцию и дифференцировку нейронов и астроглии. В настоящее время в качестве ключевого молекулярного механизма контроля нейрогенеза выступает локальное микроокружение [3].

В центральной нервной системе процессы нейрогенеза максимально выражены в периоде эмбриогенеза, однако и после рождения, в раннем постнатальном периоде развития и на протяжении всей жизни нейрогенез присутствует в специализированных зонах – нейрогенных нишах, в которых благодаря соответствующему микроокружению формируются условия для сохранения пула стволовых клеток, их рекрутинга, пролиферации, дифференцировки и миграции [4, 5]. Данные области обеспечивают регуляцию нейрогенеза и его стабилизацию за счет сложных механизмов, опосредованных продукцией широкого спектра гуморальных регуляторов, взаимодействием клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом [6–8]. Известно, что нейрогенные ниши формируются за счет интеграции нескольких типов клеточных структур нейрональной и глиальной природы, и обязательным их компонентом является т.н. каффолд, представленный микрососудами [9, 10]. Общепризнанными стимулами к образованию клеток нейрональной природы во взрослом мозге выступают физическая активность, гипоксия, стрессовые ситуации, когнитивные нагрузки и обучение [11], а также патологические состояния – ишемия мозга, травма, нейродегенеративные изменения [12]. При действии этих стимулов в нейрогенных нишах меняется локальное гуморальное микроокружение, в том числе за счет изменения проницаемости сосудистой стенки, что имеет своим результатом активацию программы пролиферации и дифференцировки НСК и НПК.

В 2016 г. Dennis с соавт. детально изучили возрастные особенности процесса нейрогенеза в двух нейрогенных нишах головного мозга – субвентрикулярной (SVZ) и субгранулярной (SGZ) зонах. Было отмечено, что в первые годы жизни в этих областях наблюдается снижение клеток, обладающих пролиферативной активностью [13], но во взрослом мозге именно эти регионы вносят основной вклад в нейрогенез. Примечательно, что SGZ гиппокампа насыщена нервными окончаниями и интенсивность нейрогенеза здесь зависит от активности гиппокампальных

нейронов и изменения локальной концентрации ключевых нейромедиаторов. SVZ располагается рядом с пространством желудочка мозга и контактирует с компонентами ликвора, продуцируемого клетками сосудистого сплетения, которые формируют гематоликворный барьер [14]. Таким образом, SGZ отводится важная роль в образовании новых клеток, мигрирующих в гранулярный отдел зубчатой извилины гиппокампа для обеспечения механизмов запоминания и/или забывания [11]. Активность SVZ во взрослом мозге в большей степени актуальна в контексте образования новых нейронов, участвующих в восстановлении поврежденных структур, а также мигрирующих в состав обонятельных луковиц [12]. Важно отметить, что эти события, как в SGZ, так и в SVZ, сопровождаются интенсификацией процессов неоангиогенеза, что позволяет считать последний важным компонентом механизмов пластичности головного мозга. Очевидно, что существенную роль в сопряжении нейрогенеза и ангиогенеза в центральной нервной системе играют церебральные эндотелиоциты. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в расшифровке механизмов нейрогенеза и ангиогенеза в последние две декады, попрежнему малоизученными остаются вопросы вклада клеток-компонентов гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в процессы пластичности. Целью настоящего обзора является обобщение современных данных о таких механизмах и о возможностях управления ими для восстановления пластичности головного мозга при нейродегенерации.

РОЛЬ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНДОТЕЛИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ЛОКАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В НЕЙРОГЕННОЙ НИШЕ

Ключевую роль в формировании микроокружения в нейрогенных нишах играют следующие факторы: 1) нейротрансмиттеры, пептидные факторы роста и нейропептиды (например, глутамат, ГАМК, BDNF, окситоцин и пр.), продуцируемые нейронами и нейросекреторными клетками и оказывающими влияние на судьбу и развитие НСК и НПК, нейробластов (незрелые клетки, образующиеся из НСК/НПК SVZ, мигрирующие вдоль рострального миграционного пути в обонятельную луковицу или в зону повреждения, а также клетки, образующиеся из НСК/НПК SGZ, мигрирующие в зубчатую извилину гиппокампа); 2) глиотрансмиттеры (например, серин, АТФ и пр.), продуцируемые активированными глиальными клетками, в частности астроцитами нейрогенных ниш, и влияющими на функциональную активность НСК/НПК; 3) метаболиты, синтезируемые клетками различной природы (например, лактат, пируват, жирные кислоты и пр.), обладающие регуляторной активностью не только за счет их утилизации окружающими клетками, но и за счет влияния на них через соответствующие рецепторы по механизмам паракринной регуляции; 4) активные формы кислорода и азота, газообразные трансмиттеры, например, монооксид азота, сероводород, которые продуцируется клетками нейрогенных ниш и существенным образом влияют на судьбу НСК/НПК [14–16].

Эндотелиоциты являются важной структурой нейроваскулярной единицы (НВЕ) головного мозга и составляют основу ГЭБ. В микрососудах головного мозга клетки эндотелия находятся под контролем периваскулярной астроглии, обеспечивают избирательный транспорт веществ, секвестрируют протромбогенные факторы и контролируют реологические свойства крови, реализуют механизмы контроля микроциркуляции, участвуют в регуляции нейрогенеза, взаимодействуют с лейкоцитами и микроглией, тем самым участвуя в локальном иммунном ответе и воспалении, что дополняется их способностью продуцировать цитокины, метаболиты, факторы роста [17, 18]. Эндотелиоциты, входящие в состав ГЭБ, участвуют в барье-

рогенезе в раннем периоде развития и в восстановлении барьера после повреждения [16].

Проницаемость ГЭБ, в том числе в микрососудах нейрогенных ниш, определяется следующими факторами: 1) экспрессия белков межклеточных контактов; 2) экспрессия белков-транспортеров и каналов; 3) метаболизм церебральных эндотелиоцитов и других клеток НВЕ; 4) сигнальная трансдукция и межклеточная коммуникация; 5) состояние базальной мембраны; 6) степень зрелости ГЭБ [17–19].

Физиология, структура и метаболизм клеток эндотелия церебральных микрососудов имеют существенные отличия от клеток эндотелия, локализованных в других тканях, в частности, для церебрального эндотелия характерны: 1) низкий уровень фенестрации и сниженный пиноцитоз; 2) высокая экспрессия белков межклеточных контактов (tight junctions, adherence junctions); 3) относительно высокое содержание митохондрий в клетках; 4) тесное взаимодействие с перицитами и периваскулярной астроглией; 5) экспрессия рецепторов трансферрина, инсулина, большого спектра белков-транспортеров [17, 19]. Все эти свойства обеспечивают высокую селективность ГЭБ, что важно для химического гомеостаза в ткани центральной нервной системы: поддержания уровня глюкозы и иных энергетических субстратов, выведения продуктов метаболизма, регуляции концентрации цитокинов, факторов роста и пр. [20]. Синаптическая активность напрямую влияет на процессы, происходящие с участием клеток церебрального эндотелия: например, функциональная гиперемия, возникающая в активных регионах мозга, опосредуется влиянием активированной астроглии (в составе трехчастных синапсов) на клетки эндотелия за счет продукции лактата и метаболитов арахидоновой кислоты [21].

У грызунов развитие ГЭБ начинается к Е10–17, контролируемая проницаемость формируется к Е21, но и в постнатальном периоде продолжается развитие плотных контактов. У человека маркеры ГЭБ появляются на 8-й неделе эмбриогенеза, интенсивный ангиогенез в ткани головного мозга продолжается до 2–3 нед. постнатального развития [22]. Примечательно, что барьерогенез начинается только после формирования пула НСК/НПК и всегда соответствует синаптогенезу и индукции синаптической активности в ткани головного мозга [23, 24]. Барьерогенез происходит и во взрослом мозге, в том числе при реализации феномена изменения пластичности, индуцированного новым опытным исследованием (изменение синаптической трансмиссии, нейритогенеза, формирования и элиминации синапсов, нейрогенеза и гибели клеток при действии стимулов, инициирующих обучение и запоминание) [25]. Неотъемлемой составной частью этого процесса выступает образование новых микрососудов с активно пролиферирующими и дифференцирующимися эндотелиальными прогениторными клетками, реализация эффектов разнообразных регуляторных молекул и компонентов клеточных сигнальных путей (Notch, FOX, HIF-1, GSK-3) [26]. В целом ассоциация нейрогенеза и ангиогенеза достаточно полно охарактеризована, а ее нарушения признаются в качестве вероятной причины подавления нейрогенеза в стареющем головном мозге [27].

Менее изучен вклад контролируемой и селективной проницаемости ГЭБ в поддержание локального микроокружения в нейрогенных нишах, однако известно, что в SGZ гиппокампа астроциты достаточно плотно окружают эндотелиальный слой клеток, поэтому локальное микроокружение формируется преимущественно за счет локальной секреции нейро- и глиотрансмиттеров, факторов роста, тогда как в SVZ астроциты неплотно примыкают к слою эндотелия и перицитов, что обеспечивает поступление в нишу регуляторных молекул из крови [28, 29].

Таким образом, большинство факторов роста, регулирующих нейрогенез, продуцируются неспециализированными клетками и оказывают эндокринное, паракринное и аутокринное действие [30, 31]. Иными словами, именно локальное микроокружение определяет путь, который выберут клетки для развития и дифферен-

цировки – нейрональный и (или) глиальный – посредством ауто-, эндо- и паракринной регуляции, координации межклеточных связей и внутриклеточной сигнализации, а также за счет динамично изменяющейся структуры внеклеточного матрикса [32]. В настоящее время доказано действие паракринных эффекторных молекул, продуцируемых клетками ГЭБ, на НСК/НПК. К таким факторам относятся сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [33], эпидермальный фактор роста (EGF) [34], основной фактор роста фибробластов (FGF2) [35], мозговой нейротрофический фактор (BDNF) [36], пигментный эпителиальный фактор (PEDF) [37] (табл. 1).

Помимо клеток эндотелия, периваскулярные астроциты в составе ГЭБ/НВЕ могут регулировать нейрогенез [55]. Вероятно, образование астроглиальной сети, связанной посредством коннексиновых каналов, формирует локальное микроокружение, благоприятно для пролиферативных процессов в нейрогенных нишах [56]. Вместе с тем, астроциты влияют и на клетки микрососудов головного мозга, например, вызывая вазодилятацию и стимулируя ангиогенез за счет кальций-индуцируемого гликолиза и продукции лактата, либо генерации метаболитов арахидоновой кислоты [57–59], а экспрессируемый астроцитами тромбоспондин-1 понижает ангиогенный потенциал эндотелиальных прогениторных клеток.

Сопряжение механизмов нейрогенеза и ангиогенеза подтверждается и другими экспериментальными данными: эндотелиальные клетки индуцируют дифференцировку астроцитов за счет секреции LIF [38], астроциты секретируют сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF) в ответ на локальное изменение уровня кислорода [32], а дифференцировка астроцитов может, в свою очередь, запускать формирование ГЭБ и развитие перицитов [21]. В нейрогенных нишах радиальная глия (собственно НСК) является продуцентом ретиноевой кислоты как одного из наиболее эффективных регуляторов барьерогенеза [60, 61]. Особое значение в индукции ангиогенеза отводится сосудисто-эндотелиальному фактору роста VEGF [62]. Астроциты продуцируют VEGF в HIF-1-контролируемом режиме, поэтому очевидно, что это наиболее выражено в условиях гипоксии или нейровоспаления [62–64]. Результатом увеличения продукции VEGF является формирование микрососудов с повышенной проницаемостью сосудистой стенки вследствие несовершенного барьерогенеза [65]. Однако есть данные и о позитивном эффекте астроцитарного VEGF в отношении структурно-функциональной целостности ГЭБ [66] или об отсутствии вовлеченности HIF-1-контролируемых механизмов в астроглии в патогенез повреждения ГЭБ при гипоксии [67]. VEGF выступает ключевым регулятором нейрогенеза, а также пролиферации, миграции эндотелиальных клеток и взаимодействия этих клеток с НСК [32]. VEGF-опосредованное восстановление поврежденной ткани во многом определяется его способностью индуцировать процессы неоангиогенеза и стимулировать образование новых нейронов [62, 68, 69]. Например, Palmer с соавт. установили, что в SGZ взрослых крыс процесс нейрогенеза проходит в непосредственной близости от кровеносных сосудов, где отмечается высокая концентрация VEGF и регистрируется интенсивный ангиогенез [26].

АБЕРРАНТНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ И ЦЕРЕБРАЛЬНЫЙ АНГИОГЕНЕЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Доказательствами тесного сопряжения механизмов нейрогенеза и церебрального ангиогенеза являются следующие данные: 1) стимуляция нейрогенеза, как правило, сопровождается неоангиогенезом, что актуально как для репаративных событий (например, при повреждении головного мозга или при нейродегенерации), так и для феномена пластичности головного мозга [70]; 2) образование новых микрососудов при этом носит обратимый характер (в последующем они могут подвер-

Таблица 1. Основные регуляторные и сигнальные молекулы нейрогенеза, синтезируемые клетками церебрального эндотелия

Регуляторные и сигнальные молекулы нейрогенеза	Оказываемый эффект	Ссылка
BDNF (Мозговой нейротрофический фактор)	Нейротрофический фактор мозга отвечает за рост и выживание нервных клеток в процессе нейрогенеза, участвует в селекции и миграции нейробластов в процессе трансформации. Стимулирует нейрогенез в SGZ зоне как *in vivo*, так и *in vitro*.	[36]
VEGF (Сосудистый эндотелиальный фактор роста)	Сосудистый эндотелиальный фактор роста отвечает за рост аксонов в направлении клеток-мишеней, обусловливает пластичность нейрональной ткани, участвует в механизмах восстановления нарушенных неврологических функций. Стимулирует нейрогенез в SGZ зоне как *in vivo*, так и *in vitro*.	[32]
LIF (Лейкемия-ингибирующий фактор)	Цитокин, участвует в межклеточной сигнализации, выступает как регулятор нейрональной дифференцировки опосредованно через активацию ERK-зависимого пути.	[38]
PEDF (Пигментный эпителиальный фактор)	Фактор пигментного эпителия стимулирует самообновление нейрональных стволовых клеток. Избирательно увеличивает самообновление B-клеток в субвентрикулярной зоне и впоследствии усиливает нейрогенез посредством потенцирования Notch-зависимой транскрипции.	[37–39]
IGF (Инсулиноподобный фактор роста 1)	Плейотропный пептид, отвечает за реализацию механизмов сигнальных путей. Является ключевым регулятором клеточной пролиферации, ингибитором клеточного апоптоза и некроза.	[40]
NT3 (Нейротрофин)	Нейротрофин-3 регулирует нейрогенез в SVZ зоне, поддерживает популяцию покоящихся нейрональных клеток.	[41]
Бетацеллюлин	Проявляет свое действие как лиганд рецептора эпидермального фактора роста. Способствует пролиферации нейрональных клеток-предшественников и нейробластов.	[42]
CXCL12	Хемокин, способствует регуляции дифференцировки нейрональных клеток-предшественников.	[40]
PlGF-2 (Плацентарный фактор роста-2)	Плацентарный фактор роста 2 (PlGF-2) может способствовать пролиферации стволовых клеток в SVZ.	[43]
NO (Монооксид азота)	Его эффекты, по-видимому, зависят от задействованного сигнального пути. Потенциально посредством NO-индуцированного S-нитрозилирования EGF рецепторов NO ингибирует передачу сигналов PI3K/Akt для подавления пролиферации НСК как в культуре, так и *in vivo*. Однако обход EGF рецепторов индуцирует пролиферацию за счет активации p21Ras, что приводит к увеличению уровней активации c-Myc, p90RSK и Elk-1 и последующему снижению уровня p27Kip1. NO-синтаза (NOS) является основным ферментом, катализирующим образование NO в головном мозге. Три изоформы NOS участвуют в контроле пролиферации НСК и в нейрогенезе: eNOS (эндотелиальная синтаза оксида азота), nNOS (нейрональная синтаза оксида азота) и iNOS (индуцибельная синтаза оксида азота).	[44, 45]

Таблица 1. Продолжение

Регуляторные и сигнальные молекулы нейрогенеза	Оказываемый эффект	Ссылка
FGF2 (Основный фактор роста фибробластов)	FGF2 влияет на нейрогенез и пролиферацию корковых предшественников. FGF2 служит для поддержания самообновления клеток SVZ.	[46, 47]
EGF (Эпидермальный фактор роста)	Супрафизиологические концентрации могут способствовать нейрогенезу, вероятно, за счет прямого митогенного эффекта. Внутрижелудочковая инфузия EGF увеличивает количество НСК типа B, контактирующих с желудочком, и приводит к пролиферации транзитных амплифицирующих клеток при остановке продукции нейробластов. *In vitro* EGF стимулирует генерацию нейросфер из транзитных амплифицирующих клеток и вызывает реверсию к более “стволовому” фенотипу.	[45, 48]
Sonic hedgehog (Shh)	Способствует самообновлению и/или пролиферации НСК, а также прямому нейрогенезу или глиогенезу.	[49]
TGF-β (Трансформирующий фактор роста-β)	TGF-β способствует поддержанию состояния покоя стволовых клеток и может ингибировать нейрогенез. TGF-β1 служит важным нейрогенным фактором роста. Влияет на пролиферативный потенциал, о чем свидетельствует остановка в фазе G0/G1 клеточного цикла. В клеточной культуре НСК и клетки-предшественники экспрессируют TGFβRI, II и III, а TGF-β1 дозозависимо снижает размножение этих клеток.	[50, 51]
Angiopoietin (Ang) (Ангиопоэтин)	Ангиопоэтин-1 способствует пролиферации и выживанию нейробластов, а при экспрессии эндотелиальными клетками служит скаффолдом. Роль скаффолда заключается в развитии, ремоделировании и созревании кровеносных сосудов. Ангиопоэтин-4 усиливает ангиогенез и нейрогенез после инсульта путем усиления фосфорилирования AKT, снижает гибель нейронов и ингибирует воспалительную реакцию, что является результатом ингибирования экспрессии FasL/FasR пути.	[45, 53]
SCF (Фактор роста стволовых клеток)	SCF действует как хемоаттрактант и фактор выживания для НСК на ранних стадиях дифференцировки, не влияя на пролиферацию или дифференцировку.	[44]
Notch1	Трансмембранный рецептор, способствует увеличению популяции, миграции и дифференцировки нейрональных предшественников.	[53]
Wnt	Сигнальный белок способствует увеличению пролиферации нейрональных предшественников.	[54]

гаться регрессии), но, вероятно, важно для поддержания механизмов структурной и функциональной пластичности [71]; 3) как правило, вновь образованные микрососуды имеют избыточно высокую проницаемость, что может быть фактором, способствующим формированию новых участков нейрогенеза [72] (как это было ранее показано, например, в перивентрикулярных отделах головного мозга при ишемии [73]) за счет облегченного транспорта регуляторных молекул в нишу, но одновременно может стать причиной развития нейровоспаления (в частности, на фоне прогрессирующей нейродегенерации) [74]; 4) активация нейрогенеза и ангиогенеза сопровождается существенными метаболическими изменениями в клетках эндотелия, а также НСК/НПК, сопровождающимися перераспределением вклада в продукцию энергии механизмов гликолиза и окислительного фосфорилирования [20].

При гибели клеток головного мозга индуцируется репаративный нейрогенез, преимущественно в SVZ, для последующей миграции нейробластов в зону повреждения [75–77]. Эти же события сопровождаются активацией церебрального ангиогенеза, вероятно, в качестве компенсаторного механизма в ответ на повреждение ткани и сокращение перфузии, например, после перенесенного ишемического повреждения головного мозга или при медленно прогрессирующих дегенеративных заболеваниях нервной системы [78]. Проницаемость новых сосудов в таких ситуациях повышена и это, вероятно, связано не только с нейровоспалением [79], но и с необходимостью создания новых областей нейрогенеза в поврежденном мозге, как это было показано при формировании новых нейрогенных зон в перивентрикулярной области после ишемии [80]. Одним из механизмов является конверсия сигнального Notch-пути, при которой эндотелий и перициты церебральных микрососудов способны экспрессировать лиганд Notch-рецептора – Delta-like ligand-4 (DLL4) в ответ на высокую локальную продукцию VEGF. Данный механизм стимулирует пролиферацию НСК и инициирует формирование дополнительных нейрогенных ниш в стенках желудочков головного мозга [81].

Для хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа характерны неэффективный репаративный нейрогенез [82, 83] и усиленный неоангиогенез с формированием феномена гиперваскуляризации и повышением проницаемости ГЭБ [74]. Однако следует отметить, что клетки эндотелия, экспрессирующие рецепторы инсулина, реагируют на активацию и индукцию ангиогенеза изменением своего метаболизма: инсулин-стимулированный гликолиз необходим для миграции лидирующих при росте сосуда tip-cells, а сочетание интенсивного гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования – для пролиферации следующих далее stalk-cells [84, 85]. Аналогичным образом гликолитическая продукция лактата в астроцитах, по крайней мере в некоторых регионах головного мозга, контролируется инсулином [86]. Логично предположить, что состояния, сопровождающиеся формированием локальной (церебральной) инсулинорезистентности, в частности болезнь Альцгеймера [87–89], будут сопровождаться аберрантной ангиогенной активностью клеток церебрального эндотелия, в результате чего формирующиеся микрососуды будут фуционально некомпетентны. Действительно, как мы показали, при экспериментальной болезни Альцгеймера наблюдается формирование аберрантных межклеточных контактов в эндотелии церебральных микрососудов, в частности в CA1 субрегионе гиппокампа [90], ответственном за непространственную память [91]. Мы установили, что это проявляется стимуляцией ангиогенеза и присутствием эндотелиальных клеток с низкой экспрессией JAM белков плотных контактов на фоне увеличения общего количества CD31-иммунопозитивных клеток эндотелия, повышением проницаемости ГЭБ *in vivo* [92]. Дополнительными признаками несовершенного ангиогенеза при этом являются увеличение числа сосудов на фоне снижения ветвления сосудов. Другим регионом гиппокампа, непосредственно связанным с формированием аберрантной сосудистой сети, является

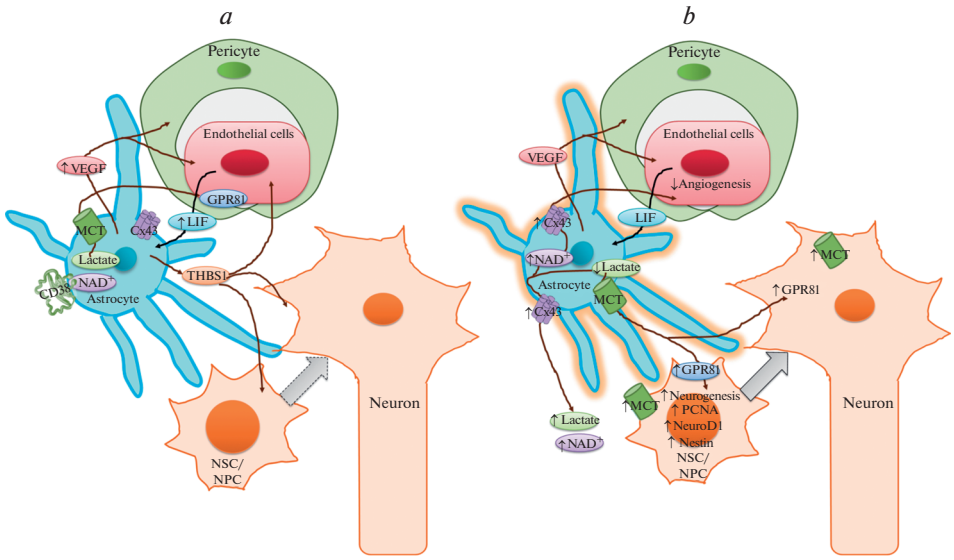

Рис. 1. Схема нейрон-глиального сопряжения и взаимодействия астроцитов с другими клетками гематоэнцефалического барьера в обычных условиях (*a*) и при активации астроцитов (*b*). Коричневые стрелки отображают влияние астроцитов на другие виды клеток, черная стрелка показывает влияние эндотелиоцитов на астроциты.

зубчатая извилина, в которой максимально выражены процессы неоангиогенеза и в наибольшей степени регистрируются признаки повреждения клеток и аккумуляции алармина HMGB1 во внеклеточном пространстве, что является причиной развития локального воспаления [90]. В целом, неоангиогенез характерен для CA1 зоны гиппокампа и зубчатой извилины, локальные нарушения микроциркуляции вследствие сокращения диаметра и разветвленности сосудов – для CA2 и CA3 субрегионов. Повышение проницаемости ГЭБ в гиппокампе животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера наиболее характерно для CA2 субрегиона, что сопровождает развитие нарушений непространственной гиппокамп-зависимой памяти. Интересно, что экспрессия белка CD147, являющегося регулятором активности транспортеров лактата, матриксных металлопротеиназ и протеолиза APP, его лиганда циклофилина A, а также высокая экспрессия алармина HMGB1 и RAGE в зубчатой извилине гиппокампа маркируют собой нейродегенеративные изменения, интенсивность воспаления [93]. Кроме того, экспрессия данного белка приводит к ремоделированию микрососудов, метаболизму амилоида и повреждению эндотелия, что отражает нарушение когнитивных функций у экспериментальных животных [90].

Исследования, выполненные с использованием созданной нами многокомпонентной модели нейрогенной ниши *in vitro*, включающая нейросферы, астроциты и церебральные эндотелиоциты, показала, что адресная активация астроцитов усиливает нейрогенез и изменяет направление развития НСК/НПК с глиального на нейрональный путь. При экспрессии в астроцитах фоточувствительного белка – каналородопсина (ChR2) нам удалось доказать возможность регуляции процессов нейрогенеза за счет фотоактивации астроцитов [94, 95]. Это сопровождается значимыми изменениями метаболизма клеток церебрального эндотелия и проницаемости ГЭБ (неопубликованные данные), например, вследствие реализации эффек-

тов высвобождаемого астроглией лактата на митохондриальный биогенез в клетках эндотелия. Действительно, высокая экспрессия MCT1 и GPR81 в клетках нейрогенной ниши после фотостимуляции ChR2+-астроцитов может быть расценена как маркер эффективности метаболического сопряжения клеток НВЕ при активации нейрогенеза [96]. Мы полагаем, что адресная активация астроцитов позволяет управлять биодоступностью лактата и, вероятно, иных глиотрансмиттеров и факторов роста в клетках ГЭБ/НВЕ (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что существенный вклад в пластичность головного мозга вносит сопряжение процессов нейрогенеза и церебрального ангиогенеза. Это сопряжение важно для формирования локального микроокружения, оптимального для контроля функциональной активности стволовых и прогениторных клеток нейрогенных ниш. Функциональное состояние клеток эндотелия микрососудов головного мозга, целостность и избирательная проницаемость гематоэнцефалического барьера находятся под контролем периваскулярных астроцитов, которые могут являться мишенью для управления процессами нейрогенеза и церебрального ангиогенеза. Разработка новых технологий адресной (оптогенетической) модуляции активности клеток эндотелия и периваскулярной астроглии перспективна для создания протоколов восстановления нейрогенеза при нейродегенерации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.Т. – анализ данных по проблематике исследования и написание рукописи; Я.В.Г., Е.Д.Х., Е.Б.Б, А.И.М., А.ВМ., А.Н.Ш. – написание и редактирование рукописи; Н.А.М., Ю.К.К., Ю.А.У. – редактирование рукописи и подготовка иллюстраций; А.Б.С. – разработка концепции работы, анализ литературных данных, текущая корректировка рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nikitin VP, Sherstnev VV* (2009) The Concept of the Integrative Activities of Neurons and Mechanisms of Neuroplasticity. Neurochem J 3: 29–34. https://doi.org/10.1134/S1819712409010048
2. *Riguelme PA, Drapeau E, Doetsch F* (2008) Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363: 123–137. https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2016
3. *Trentesaux C, Striediner K, Pomerants J, Klein OD* (2020) From gut to glutes: The critical role of niche signals in the maintenance and renewal of adult stem cells. Curr Opin Cell Biol 63: 88–101. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.004
4. *Abrous DN, Koehl M, Le Moal M* (2005) Adult neurogenesis: From precursors to network and physiology. Physiol Rev 85: 523–569. https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2003
5. *Altman J, Das GD* (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol 124: 319–335. https://doi.org/10.1002/cne.901240303

6. *Altman J, Das GD* (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J Comp Neurol 126: 337–389.
https://doi.org/10.1002/cne.901260302
7. *Butti E, Cusimano M, Bacigaluppi M, Martino G* (2014) Neurogenic and non-neurogenic functions of endogenous neural stem cells. Front Neurosci 8: 92.
https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00092
8. *Avarez-Buylla A, Lim DA* (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41: 683–686.
https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00111-4
9. *Mind GL, Song H* (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 28: 223–250.
https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459
10. *Mandairon N, Sacquet J, Garcia S, Ravel N, Jourdan F, Didier A* (2006) Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb. Eur J Neurosci 24: 3578–3588.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05235.x
11. *Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E* (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. Hippocampus 12: 578–584.
https://doi.org/10.1002/hipo.10103
12. *Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R* (2007) Repairing brain after stroke: A review on post-ischemic neurogenesis. Neurochem Int 50: 1028–1041.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17531349
13. *Dennis CV, Suh LS, Rodriguez ML, Kril JJ, Sutherland GT* (2016) Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. Neuropathol Appl Neurobiol 42: 621–638.
https://doi.org/10.1111/nan.12337
14. *Young SZ, Taylor MM, Bordey A* (2011) Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. Eur J Neurosci 33: 1123–1132.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07611.x
15. *Lee JC* (1971) Evolutyion in the concept of the blood-brain barrier phenomen. Prog Neuropathol 1: 84–145.
16. *Joó F* (1996) Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and difference. Progress Neurobiol 48: 255–273.
https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00046-1
17. *Bradbury MW* (1985) The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium. Circ Res 57: 213–222.
https://doi.org/10.1161/01.res.57.2.213
18. *Begley DJ, Brightman MW* (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. Prog Drug Res 61: 39–78.
https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8049-7_2
19. *Pardridge WM* (1999) Blood-brain barrier biology and methodology. J Neurovirol 5: 556–569.
https://doi.org/10.3109/13550289909021285
20. *Roh E, Song DK, Kim MS* (2016) Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. Exp Mol Med 48: e216.
https://doi.org/10.1038/emm.2016.4
21. *Hawkins BT, Davis TP* (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health disease. Pharmacol Rev 57: 173–185.
https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4
22. *Rubin LL, Staddon JM* (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. Annu Rev Neurosci 22: 11–28.
https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11
23. *Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ* (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis 37(1): 13–25.
https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030
24. *Ballabh P, Braun A, Nedergaard M* (2004) The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol Dis 16(1): 1–13.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15207256/
25. *Салмина АБ, Моргун АВ, Кувачева НВ, Комлева ЮК, Пожиленкова ЕА, Кутищева ИА, Труфанова ЛВ, Таранушенко ТЕ, Мартынова ГП* (2013) Межклеточные взаимодействия в развивающемся гематоэнцефалическом барьере. Педиатрия Журн им ГН Сперанского 92:155–159. [*Salmina AB, Morgun AV, Kuvacheva NV, Komleva YuK, Pojilenkova EA, Kutischeva IA, Trufanova LV, Taranushenko TE, Martyinova GP* (2013) Mezhkletochnyye vzaimodeystviya v razvivayushchemsya gematoentsefalicheskom bar'yere. Pediatriya Zhurn Im GN Speranskogo 92: 155–159. (In Russ)].
https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19394048

26. *Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH* (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J Comp Neurol 425: 479–494.
https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001002)425:4<479::aid-cne2>3.0.co;2-3
27. Apple DM, Kokovay E (2017) Vascular niche contribution to age-associate neural stem cell dysfunction. Am J Physiol August 11: 896–902.
https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpheart.00154.2017
28. *Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM* (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. J Neurosci 22: 629–634.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002
29. *Doetsch F* (2003) A niche for adult neural stem cell niche. Curr Opin Genetic Develop 13: 543–550.
https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.012
30. *Salmina AB, Morgun AV, Kuvacheva NV, Lopatina OL, Komleva YK, Malinovskaya NA, Pozhilenkova EA* (2014) Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story. Rev Neurosci 25: 97–111.
https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0044
31. *Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Komleva YK, Salmin VV, Salmina AB* (2017) Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. Rev Neurosci 28: 397–415.
https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0071
32. *Conover JC, Notti RQ* (2008) The neural stem cell niche. Cell Tissue Res 331: 211–224.
https://doi.org/10.1007/s00441-007-0503-6
33. *Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA* (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11946–11950.
https://doi.org/10.1073/pnas.182296499
34. *Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A* (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. Neuron 36: 1021–1034.
https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01133-9
35. *Kilpatrick TJ, Barlett PF* (1995) Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. J Neurosci 15: 3653–3661.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03653.1995
36. *Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP* (2003) Nitric oxide act in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. Dev Biol 258: 319–333.
https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00120-9
37. *Andreu-Agulló C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Fariñas I* (2009) Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. Nat Neurosci 12: 1514–1523.
https://doi.org/10.1038/nn.2437
38. *Ramírez-Castillejo C, Sánchez-Sánchez F, Andreu-Agulló C, Ferrón SR, Aroca-Aguilar JD, Sánchez P, Mira H, Escribano J, Fariñas I* (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. Nat Neurosci 9: 331–339.
https://doi.org/10.1038/nn1657
39. *Zhang J, Jiao J* (2015) Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. Biomed Res Int 2015: 727542.
https://doi.org/10.1155/2015/727542
40. *Bátiz LF, Castro MA, Burgos PV, Velásquez ZD, Muñoz RI, Lafourcade CA, Troncoso-Escudero P, Wyneken U* (2016) Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. Front Cell Neurosci 9: 501.
https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00501
41. *Delgado AC, Ferrón SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, D'Ocón P, Fariñas I* (2014) Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction. Neuron 83: 572–585.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.015
42. *Gómez-Gaviro MV, Scott CE, Sesay AK, Matheu A, Booth S, Galichet C, Lovell-Badge R* (2012) Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 1317–1322.
https://doi.org/10.1073/pnas.1016199109
43. *Crouch EE, Liu C, Silva-Vargas V, Doetsch F* (2015) Regional and stage-specific effects of prospectively purified vascular cells on the adult V-SVZ neural stem cell lineage. J Neurosci 35: 4528–4539.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1188-14.2015
44. *Chong CM, Ai N, Ke M, Tan Y, Huang Z, Li Y, Lu JH, Ge W, Su H* (2018) Roles of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Neurogenesis. Mol Neurobiol 55: 2645–2652.
https://doi.org/10.1007/s12035-017-0513-7
45. *Goldberg JS, Hirschi KK* (2012) A Vascular perspective on neurogenesis. In: Bonfanti L (ed.) Neural Stem Cells – New Perspectives. https://www.intechopen.com/chapters/44266

46. *Lamus F, Martín C, Carnicero E, Moro JA, Fernández JMF, Mano A, Gato Á, Alonso MI* (2020) FGF2/EGF contributes to brain neuroepithelial precursor proliferation and neurogenesis in rat embryos: the involvement of embryonic cerebrospinal fluid. Dev Dyn 249: 141–153. https://doi.org/10.1002/dvdy.135
47. *Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM* (2004) Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. Dev Neurosci 26: 181–196. https://doi.org/10.1159/000082136
48. *Killer K, Le O, Beauséjour C* (2021) The Intracerebroventricular Injection of Murine Mesenchymal Stromal Cells Engineered to Secrete Epidermal Growth Factor Does Not Prevent Loss of Neurogenesis in Irradiated Mice. Radiat Res 196: 315–322. https://doi.org/10.1667/RADE-21-00017.1
49. *Yang C, Qi Y, Sun Z* (2021) The Role of Sonic Hedgehog Pathway in the Development of the Central Nervous System and Aging-Related Neurodegenerative Diseases. Front Mol Biosci 8: 711710. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.711710
50. *Kandasamy M, Lehner B, Kraus S, Sander PR, Marschallinger J, Rivera FJ, Trümbach D, Ueberham U, Reitsamer HA, Strauss O, Bogdahn U, Couillard-Despres S, Aigner L* (2014) TGF-beta signalling in the adult neurogenic niche promotes stem cell quiescence as well as generation of new neurons. J Cell Mol Med 18: 1444–1459. https://doi.org/10.1111/jcmm.12298
51. *Dumont CM, Piselli JM, Kazi N, Bowman E, Li G, Linhardt RJ, Temple S, Dai G, Thompson DM* (2017) Factors Released from Endothelial Cells Exposed to Flow Impact Adhesion, Proliferation, and Fate Choice in the Adult Neural Stem Cell Lineage. Stem Cells Dev 26: 1199–1213. https://doi.org/10.1089/scd.2016.0350
52. *Qiu Z, Yang J, Deng G, Li D, Zhang S* (2021) Angiopoietin-like 4 promotes angiogenesis and neurogenesis in a mouse model of acute ischemic stroke. Brain Res Bull 168: 156–164. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.12.023
53. *Obernier K, Alvarez-Buylla A* (2019) Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. Development 146: dev156059. https://doi.org/10.1242/dev.156059
54. *Li F, Chong ZZ, Maiese K* (2006) Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. Histol Histopathol 21: 103–124. https://doi.org/10.14670/HH-21.103
55. *Young JK, Heinbockel T, Gondré-Lewis MC* (2013) Astrocyte fatty acid binding protein-7 is a marker for neurogenic niches in the rat hippocampus. Hippocampus 23: 1476–1483. https://doi.org/10.1002/hipo.22200
56. *Салмина АБ, Малиновская НА, Кувачева НВ, Моргун АВ, Хилажева ЕД, Горина ЯВ, Пожиленкова ЕА, Фролова ОВ* (2014) Коннексиновые и паннексиновые транспортные системы в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга. Нейрохимия 31:122–133. [*Salmina AB, Malinovskaya NA, Kuvacheva NV, Morgun AV, Khilazheva ED, Gorina YaV, Pozhilenkova EA, Frolova OV* (2014) Connexin and Pannexin Transport Systems in Cells of Neurovascular Unit of the Brain. Neurochem J 31: 122–133. (In Russ)]. https://doi.org/10.7868/s1027813314020095
57. *Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A* (2010) Neuroglia in neurodegeneration. Brain Res Rev 63: 189–211. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.004
58. *Caesar K, Hashemi P, Douhou A, Bonvento G, Boutelle M, Walls, Lauritzen M* (2008) Glutamate receptor-dependent increments in lactate, glucose and oxygen metabolism evoked in rat cerebellum in vivo. J Physiol 586(5): 1337–1349. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18187464/
59. *Horvat A, Muhic M, Smolic T, Begic E, Zorec R, Kreft M, Vardjan N* (2021) Ca^{2+} as the prime trigger of aerobic glycolysis in astrocytes. Cell Calcium 95: 102368. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416021000221
60. *Siegenthaler JA, Sohet F, Daneman R* (2013) 'Sealing off the CNS': cellular and molecular regulation of blood-brain barriergenesis. Curr Opin Neurobiol 23: 1057–1064. https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.06.006
61. *Mizee MR, Wooldrik D, Lakeman KA, van het Hof B, Drexhage JA, Geerts D, Bugiani M, Aronica E, Mebius RE, Prat A, de Vries HE, Reijerkerk A* (2013) Retinoic acid induces blood-brain barrier development. J Neurosci 33: 1660–1671. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1338-12.2013
62. *Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J* (2003) The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 9: 669–676. https://doi.org/10.1038/nm0603-669
63. *You T, Bi Y, J Li, Zhang M, Chen X, Zhang K, Li J* (2017) IL-17 induces reactive astrocytes and up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) through JAK/STAT signaling. Scient Rep7: 41779. https://www.nature.com/articles/srep41779
64. *Choi SH, Kim HJ, Cho HJ, Park SD, Lee NE, Hwang SH, Rhim H, Kim HC, Cho IH, Nah SY* (2019) Gintonin-mediated release of astrocytic vascular endothelial growth factor protect cor-

tical astrocytes from hypoxia-induced cell damages. J Ginseng Res 43(2): 305–311. https://khu.elsevierpure.com/en/publications/gintonin-mediated-release-of-astrocytic-vascular-endothelial-grow

65. *Shen Y, Gu J, Liu Z, Xu C, Qian S, Zhang X, Zhou B, Guan Q, Sun, Y, Wang Y, Jin X* (2018) Inhibition of HIF-1α Reduced Blood Brain Barrier Damage by Regulating MMP-2 and VEGF During Acute Cerebral Ischemia. Front Cell Neurosci 4. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00288/full
66. *Liu J, Li J* (2022) Astrocytes Protect Human Brain Microvascular Endothelial Cells from Hypoxia Injury by Regulating VEGF Expression. J Healthcare Engineer ID 1884959. https://www.hindawi.com/journals/jhe/2022/1884959/
67. *Baumann J, Tsao CC, Huang SF, Gassmann M, Ogunshola OO* (2021) Astrocyte-specific hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) does not disrupt the endothelial barrier during hypoxia in vitro. Fluids and Barriers of the CNS 18(13). https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12987-021-00247-2
68. *Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao, X., Xie, L., Greenberg DA* (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo.* Biol Sci 99(18): 11946–11950. https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.182296499
69. *Udo H, Yoshida Y, Kino T, Ohnuki K, Mizunoya W, Mukuda T, Sugiyama H* (2008) Enhanced Adult Neurogenesis and Angiogenesis and Altered Affective Behaviors in Mice Overexpressing Vascular Endothelial Growth Factor 120. J Neurosci 28(53): 14522–14536. https://sci-hub.wf/10.1523/JNEUROSCI.3673-08.2008
70. *Комлева ЮК, Салмина АБ, Прокопенко СВ, Шестакова ЛА, Петрова ММ, Малиновская ММ, Лопатина ОЛ* (2013) Изменения структурно-функциональной пластичности головного мозга, индуцированные обогащенной средой. Вестник акад мед наук 6:39–48. [*Komleva Yu, Salmina AB, Prokopenko CV, Shestakova LA, Petrova MM, Malinovskaya NA, Lopatina OL* (2013) Changes in structural and functional plasticity of the brain induced by environmental enrichment. Ann Rus Acad Med Sci 6: 39–48. (In Russ)]. https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19139669
71. *Hummel FC, Cohen LG* (2005) Drivers of brain plasticipy. Curr Opin Neurol 18: 667– 674. https://doi.org/10.1097/01.wco.0000189876.37475.42
72. *Lin R, Cai J, Nathan C, Wei X, Schleidt S, Rosenwasser R, Iacovitti L* (2015) Neurogenesis is enchanced by stroke in multiple new stem cell niches along the ventricular system at sites of high BBB permeability. Neurobiol Dis 74: 229–239. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.016
73. *Font MA, Arboix A, Krupinski J* (2010) Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. Curr Cardiol Rev 6: 238–244. https://doi.org/10.2174/157340310791658802
74. *Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA* (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. PLoS One 6: e23789. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023789
75. *Palma-Tortosa S, García-Culebras A, Moraga A, Hurtado O, Ruiz-Peres A, Duran-Laforet V, Parra J, Cuartero MI, Pradillo JM, Moro MA, Lizasoain I* (2017) Specific Features of SVZ Neurogenesis After Cortical Ischemia: a Longitudinal Study. Sci Rep 7: 16343. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16109-7
76. Deshapande SS, Malik S, Conforti P, Lin J-di, Chu Yu-H, Nath S, Greulich F, Dumbach M-A, Uhlenhaut NH, Shachtrup C (2021) P75 neurotrophin receptor controls subventricular zone neural stem cell after stroke. Cell and Tissue Res 926. https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-021-03539-z
77. *Liang H, Zhao H, Gleichman A, Carmichael ST* (2019) Region-specific and activity-dependent regulation of SVZ neurogenesis and recovery after stroke. Biol Sci 116(27): 13621–13630. https://doi.org/10.1073/pnas.1811825116
78. *Mahoney ER, Dumitrescu L, Moore AM, Cambronero FE, De Jager PL, Koran MEI, Petyuk VA, Robinson RAS, Goyal S, Schneider JA, Bennett DA, Jefferson AL, Hohman TJ* (2021) Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease. Mol Psychiatry 26: 888–896. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0458-5
79. *Zhu H, Zhang Y, Zhong Yi, Ye Y, Hu X, Gu L, Xiong X* (2021) Inflammation-Mediated Angiogenesis in Ischemic Stroke. Front Cell Neurosci. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.652647/full
80. *Lin R, Cai J, Nathan C, Wei X, Schleidt S, Rosenwasser R, Iacovitti L* (2015) Neurogenesis is enhanced by stroke in multiple new stem cell niches along the ventricular system at sites of high BBB permeability. Neurobiol Disease 74: 229–239. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.016
81. *Lin R, Cai J, Kenyon L, Iozzo R, Rosenwasser R, Iacovitti L* (2019) Systemic Factors Trigger Vasculature Cells to Drive Notch Signaling and Neurogenesis in Neural Stem Cells in the Adult

Brain. Stem Cells 37: 395–406.
https://doi.org/10.1002/stem.2947
82. *Rodrigues JJ, Jones VC, Verkhratsky A* (2009) Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model. Neuroreport 20(10): 907–912.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19494789/
83. *Demars M, Hu Y-S, Gadadhar A, Lazarov O* (2010) Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. J Neurosci Res 88(10): 2103–2117.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209626/
84. *Gerozissis K* (2008) Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. Eur J Pharmacol 585: 38–49.
https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.050
85. *Lin R, Cal J, Kenyon L, Iozzo R, Rosenwasser R, Iacovitti L* (2019) Systemic Factors Trigger Vasculature Cells to Drive Notch Signaling and Neurogenesis in Neural Stem Cells in the Adult Brain. Stem Cells 37: 395–406.
https://doi.org/10.1002/stem.2947
86. *Garcia-Caceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi C-X, Le Thuc O, Szigeti-Buck K, Cai W, Meyer CW, Pfluger PT, Fernandez A, Luquet S, Woods SC, Torres-Aleman I, Kahn CR, Gotz M, Horvanth TL, Tschop MH* (2016) Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. Cell 166(4): 867–880.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27518562/
87. *Салмина АБ, Яузина НА, Кувачева НВ, Петрова ММ, Таранушенко ТЕ, Малиновская НА, Лопатина ОЛ, Моргун АВ, Пожиленкова ЕА, Окунева ОС, Морозова ГА, Прокопенко СВ* (2013) Инсулин и инсулинорезистентность: новые молекулы-маркеры и молекулы-мишени для диагностики и терапии заболеваний центральной нервной системы. Бюл сибирск мед 12: 104–118. [*Salmina AB, Yauzina NA, Kuvacheva NV, Petrova MM, Taranushenko TY, Malinovskaya NA, Lopatina OL, Morgun AV, Pozhilenkova YA, Okuneva OS, Morozova GA, Prokopenko SV* (2013) Insulin and insulin resistance: new molecule markers and target molecule for the diagnosis and therapy of disease of central nervous system. Bull Siber Med 12: 104–118. (In Russ)].
https://doi.org/10.20538/1682-0363-2013-5-104-118
88. *Горина ЯВ, Салмина АБ, Кувачева НВ, Комлева ЮК, Федюкович ЛВ, Успенская ЮА, Морозова ГА, Демко ИВ, Петрова ММ* (2014) Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера. Сибирск мед обозр 4: 11–19. [*Gorina YaV, Salmina AB, Kuvacheva NV, Komleva YuK, Fedyukovich LV, Uspenskaya YuA, Morozova GA, Demko IV, Petrova MM* (2014) Neuroinflammation and insulin resistance in Alzheimer's disease. Siber Med Rev 4: 11–19. (In Russ)].
https://www.elibrary.ru/query_results.asp
89. *Горина ЯВ, Лопатина ОЛ, Комлева ЮК, Черных АИ, Салмина АБ* (2018) Роль нейровоспаления в реализации когнитивных функций и социального взаимодействия у мышей с возрастзависимой нейродегенерацией. Анналы клин экспер неврол 12: 27–32. [*Gorina YaV, Lopatina OL, Komleva YuK, Chernikh AI, Salmina AB* (2018) The role neuroinflammation in cognitive functions and social interaction in mice with age-dependent neurodegeneration. Ann Clin Exp Neurol 12: 27–32. (In Russ)].
https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42236418&
90. *Горина ЯВ, Осипова ЕД, Моргун АВ, Малиновская НА, Комлева ЮК, Салмина АБ* (2020) Абберантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Бюлл сибирск мед 19: 46–52. [*Gorina YaV, Osipova ED, Morgun AV, Malinovskaya NA, Komleva YuK, Lopatina OL, Salmina AB* (2020) Aberrant angiogenesis in brain tissue in experimental Alzheimer's disease. Bull Siber Med 19: 46–52. (In Russ)].
https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-46-52
91. *Hockeimer W* (2021) Non-spatial Information Encoding in Hippocampal CA1. Theses and Dissertation, Electronic (ETDs).
https://jscholarship.library.jhu.edu/handle/1774.2/63959
92. *Моргун АВ, Осипова ЕД, Бойцова ЕБ, Лопатина ОЛ, Горина ЯВ, Пожиленкова ЕА, Салмина АБ* (2020) Васкулярный компонент нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера у мышей. Цитология 62:16–23. [*Morgun AV, Osipova ED, Boytsova EB, Lopatina OL, Gorina YaV, Pozhilenkova EA, Salmina AB* (2020) Vascular component of neuroinflammation in experimental Alzheimer's disease in mice. Tsitologiya 62: 16–23. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/s0041377120010058
93. *Горина ЯВ, Осипова ЕД, Моргун АВ, Бойцова ЕБ, Лопатина ОЛ, Салмина АБ* (2021) Оценка уровня RAGE в клетках гематоэнцефалического барьера при экспериментальной болезни Альцгеймера. Цитология 63: 176–183. [*Gorina YaV, Osipova ED, Morgun AV, Boytsova EB, Lopatina OL, Salmina AB* (2021) Assessment of the RAGE in cells blood-brain barrier in experiment Alzheimer's disease. Tsitologiya 63:176–183. (In Russ)].
https://doi.org/10.1134/S1990519X21030032
94. *Моргун АВ, Осипова ЕД, Бойцова ЕБ, Шуваев АН, Комлева ЮК, Труфанова ЛВ, Вайс ЕФ, Салмина АБ* (2019) Астроцит-опосредованные механизмы регуляции нейрогенеза в мо-

дели нейрогенной ниши in vitro при действии Aβ1-42. Биомед химия 65: 366–373. [*Morgun AV, Osipova ED, Boytsova EB, Shuvaev YuN, Komleva YuK, Trufanova LV, Vais EF, Salmina AB* (2019) Astroglia-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche in vitro treated with Aβ1-42. Biomed khim 65: 366–373. (In Russ)]. https://doi.org/10.18097/pbmc20196505366

95. *Хилажева ЕД, Моргун АВ, Бойцова ЕБ, Мосягина АИ, Шуваев АН, Малиновская НА, Успенская ЮА, Пожиленкова ЕА, Салмина АБ* (2021) Особенности экспрессионного профиля клеток в модели нейрогенной ниши гиппокампа *in vitro* при оптогенетической стимуляции. Биомед химия 67: 34–41. [*Khilazheva ED, Morgun AV, Boytsova EB, Mosiagina AI, Shuvaev AN, Malinovskaya NA, Uspenskaya YuA, Pozhilenkova EA, Salmina AB* (2021) Features of the *in vitro* expression profile of hippocampal neurogenic niche cells during optogenetic stimulation. Biomed khim 67: 34–41. (In Russ)]. https://doi.org/10.18097/pbmc20216701034
96. *Хилажева ЕД, Писарева НВ, Моргун АВ, Бойцова ЕБ, Таранушенко ТЕ, Фролова ОВ, Салмина АБ* (2017) Активация лактатных рецепторов GPR81 стимулирует митохондриальный биогенез в клетках эндотелия церебральных микрососудов. Анналы клин экспер неврол 11: 34–39. [*Khilazheva ED, Pisareva NB, Morgun AV, Boytsova EB, Taranushenko TE, Frolova OV, Salmina AB* (2017) Activation of lactate receptors GPR81 stimulates mitochondrial biogenesis in celebral microvessel endothelial cell. Ann Clin Exp Neurol 11: 34–39. (In Russ)]. https://doi.org/10.18454/ACEN.2017.1.6155

Cells of the Cerebral Endothelium and Perivascular Astroglia in the Regulation of Neurogenesis

E. A. Teplyashina[a, *], Ya. V. Gorina[a], E. D. Khilazheva[a], E. B. Boytsova[a], A. I. Mosiagina[a], N. A. Malinovskaya[a], Y. K. Komleva[a], A. V. Morgun[a], Yu. A. Uspenskaya[a, b], A. N. Shuvaev[a], and A. B. Salmina[a, c]

[a] *Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia*

[b] *Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, ussiaR*

[c] *Division of Brain Sciences, Research Center of Neurology, Moscow, Russia*

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

The blood-brain barrier is a collection of cells in the neurovascular unit of the brain that perform the actual barrier function, as well as participating in the mechanisms of plasticity. The permeability of the blood-brain barrier is determined by the efficiency of the formation of contacts between cerebral endothelial cells, the mechanisms of transcellular permeability, the nature of the interaction of endothelial cells with perivascular cells, in particular, pericytes and astrocytes. In addition, the permeability of the barrier is a derivative of the activity of the entire neurovascular unit and affects the processes of neuroplasticity, in particular, neurogenesis, which in the adult brain occurs in specialized neurogenic niches in which the maintenance of a pool of stem and progenitor cells, their renewal, proliferation, and differentiation are controlled local microenvironment. The formation of this microenvironment is largely determined by the permeability of the blood-brain barrier in the microvessels that form the vascular basis of neurogenic niches. Therefore, the functional conjugation of the processes of neurogenesis and neoangiogenesis is an important component of the mechanisms of brain plasticity. The processes of neoangiogenesis and neurogenesis are interconnected through the effects of a wide range of regulatory molecules: growth factors, cytokines, neuro- and gliotransmitters, and metabolites. Modern technologies make it possible to develop new protocols for controlling the activity of cells that form a proneurogenic and/or proangiogenic microenvironment. The review summarizes current ideas about the mechanisms of plasticity involving cerebral endothelial cells and about the possibilities of controlling or targeting perivascular astroglia.

Keywords: neurogenic niche, neurogenesis, angiogenesis, cerebral endothelial cells, local microenvironment

EDN: NQNDFN
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 547–561

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТЕРА ЛИЗОФОСФАТИДИЛХОЛИНА Mfsd2a В ПОДДЕРЖАНИИ ЦЕЛОСТНОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И ПОСТУПЛЕНИЯ В МОЗГ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2022 г. Р. Г. Парнова*

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

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

Поступила в редакцию 13.01.2022 г.
После доработки 02.02.2022 г.
Принята к публикации 02.02.2022 г.

Белок Mfsd2a (Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2a) селективно экспрессируется в эндотелии капилляров мозга и является мембранным Na^+-зависимым специфическим транспортером лизофосфатидилхолина (лизоФХ), этерифицированного полиненасыщенными жирными кислотами омега-3 ряда. В настоящем обзоре обобщены современные представления о молекулярных механизмах функционирования Mfsd2a в клетках эндотелия и роли транспортируемых им липидов в торможении кавеолин-зависимого трансцитоза и поддержании низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера. Рассмотрена роль Mfsd2a-опосредованного переноса лизоФХ как важнейшего пути поступления в мозг и сетчатку глаза докозагексаеновой кислоты и других жирных кислот омега-3 ряда, необходимых для нормального развития и функционирования ЦНС и зрительной системы. Обсуждается защитная роль Mfsd2a в различных нейропатологиях ЦНС, а также анализируются перспективы разработки Mfsd2a-опосредованных терапевтических стратегий для увеличения биодоступности эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот и доставки в ткани мозга лекарственных препаратов, не проникающих через гематоэнцефалический барьер.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, Mfsd2a, лизофосфатидилхолин, трансцитоз, докозагексаеновая кислота, эйкозапентаеновая кислота, сетчатка

DOI: 10.31857/S0869813922050090

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), изолирующий паренхиму мозга от кровотока, является ключевым структурно-функциональным компонентом так называемой нейроваскулярной единицы, которая включает в себя функционально-связанные эндотелиальные клетки капилляров мозга, астроциты, нейроны, перициты и внеклеточный матрикс [1–3]. Нейроваскулярная единица обеспечивает сложнейшие процессы регуляции гомеостаза мозга, гемодинамику, нейропластичность, поступление кислорода и питательных веществ в паренхиму мозга, удаление продуктов метаболизма. Ключевую роль в организации прохождения веществ через ГЭБ играет эндотелий капилляров, который содержит в плазматической мембране огромное разнообразие транспортеров, обеспечивающих контролируемое поступление в мозг жизненно необходимых веществ. В отличие от капилляров периферических тканей, эндотелий капилляров мозга обладает низкой проницаемостью,

обеспечивая защиту нервной ткани от патогенов, токсинов, клеток крови и нежелательных потенциально опасных макромолекулярных соединений. Еще в конце 60-х годов прошлого века методами электронной микроскопии были установлены важные структурно-функциональные особенности эндотелия ЦНС, которые обеспечивают его барьерную функцию. Во-первых, наличие плотных межклеточных контактов (tight junction) с высоким электрическим сопротивлением, ограничивающих парацеллюлярный транспорт, во-вторых, крайне низкий, в отличие от клеток эндотелия периферических органов, уровень трансцеллюлярного транспорта – трансцитоза [3–6].

Среди огромного числа транспортеров, обеспечивающих поступление в мозг необходимых веществ и поддержание его химического постоянства, особая роль принадлежит натрий-зависимому транспортеру Mfsd2a (Major Facilitator Superfamily Domain containing 2a), селективно транспортирующего лизофосфатидилхолин (лизоФХ), содержащий докозагексаеновую (C22:6 ω 3, ДГК) жирную кислоту омега-3 ряда, необходимую для нормального развития и функционирования мозга. ЛизоФХ – 1(2)-ацил-sn-глицеро-3-фосфохолин – продукт метаболизма фосфатидилхолина (ФХ), содержащий в отличие от большинства других фосфолипидов не две, а одну жирную кислоту – в первом или во втором положении глицериновой молекулы. ЛизоФХ образуется при действии на ФХ фосфолипазы А2 или лецитин-холестерин-ацилтрансферазы, которая переносит ацильный остаток с ФХ на холестерин. В клетках концентрация лизоФХ крайне низка, поскольку он быстро метаболизируется обратно в ФХ.

Транспортер Mfsd2a относится к суперсемейству белков MFS (Major Facilitator Superfamily), насчитывающему в настоящее время около 70 подсемейств и включающего в себя огромное количество транспортеров, переносящих через клеточную мембрану многочисленные вещества и субстраты – от простых неорганических и органических ионов до пептидов, углеводов и сложных липидов [7, 8]. Как показали данные последних лет, транспортер Mfsd2a экспрессируется в клетках эндотелия сосудов мозга и играет чрезвычайно важную роль как в снабжении мозга полиненасыщенными жирными кислотами омега-3 ряда, так и в торможении кавеолин-зависимого трансцитоза и поддержании низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера. Настоящий обзор посвящен анализу этих данных.

СТРУКТУРА И ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА Mfsd2a

Белок Mfsd2a был впервые идентифицирован в 2008 г. как мембранно-связанный белок с неизвестной функцией [9]. По аминокислотной последовательности и доменной организации он был наиболее схож с бактериальным Na^+-зависимым транспортером дисахарида мелибиозы MelB, что позволило отнести его к транспортным белкам суперсемейства MFS. У мыши ген *Mfsd2a* имеет размер 14.3 кб, содержит 14 экзонов и 3 интрона и кодирует последовательность в 543 аминокислоты. Аминокислотная последовательность белка демонстрирует высокую степень гомологии у различных позвоночных от рыб до человека, причем у мыши и человека белки идентичны на 85% [9]. Как большинство белков семейства MFS, Mfsd2a имеет 12 трансмембранных доменов, собранных перпендикулярно плоскости бислоя в два пучка, которые связаны внутриклеточной петлей [10].

Максимальный уровень экспрессии мРНК *Mfsd2a* в тканях мышей был обнаружен в мозгу, кишечнике, почках, печени, легких [9]. В тканях бурого и белого жира уровень его экспрессии был невысок, однако он резко увеличивался при голодании и холодовой адаптации, а также демонстрировал зависимость от циркадианных ритмов, что позволило предположить участие Mfsd2a в регуляции энергетического обмена [9]. В более поздних работах было показано, что уровень его экспрес-

сии в печени регулируется голоданием, у нокаутных по данному гену мышей обнаруживались нарушения энергетического баланса, что позволило отнести его к нутриционально-регулируемым генам с широким набором функций [11]. Эти исследования продолжаются до сих пор, однако главный фокус интереса был смещен на роль Mfsd2a в структурах ЦНС.

Исследование экспрессии белка в различных структурах мозга показало, что он активно экспрессируется в эндотелиальных клетках ГЭБ, но отсутствует в перицитах, окружающих сосуд, а также в астроцитах и нейронах [12]. Его экспрессия в клетках эндотелия ГЭБ выявляется на 15-й день эмбрионального развития мыши [9, 13]. Функциональная роль этого транспортера в эндотелии ГЭБ была выяснена в 2014 г. [13]. Липидомный и радиоизотопный анализ у мышей, нокаутных по гену *Mfsd2a*, выявил двукратное снижение уровня ДГК в фосфолипидах мозга (при этом в печени и сердце ее уровень не изменялся) и торможение переноса меченого лизоФХ, эстерифицированного ДГК или другими жирными кислотами, из крови в мозг. На клетках HEK-293, экспрессирующих Mfsd2a, авторы показали, что данный белок транспортирует длинноцепочечные жирные кислоты, но не свободные или связанные с альбумином, а входящие в состав лизоФХ. Наиболее активно транспортировался лизоФХ, содержащий в своей структуре ДГК. Перенос не осуществлялся, если в составе лизоФХ присутствовали жирные кислоты с длиной цепи менее 14 атомов углерода. Критичной для осуществления переноса являлось наличие фосфохолиновой биполярной группы в молекуле лизоФХ. В последующих работах было установлено, что перенос лизофосфолипидов, амфипатических по своей структуре, осуществляется через полость, образуемую двумя пучками трансмембранных доменов, в которой присутствуют гидрофильные и гидрофобные остатки аминокислот, там же находится Na-связывающий сайт и гидрофобный карман, связывающий лизоФХ. Связывание натрия с аминокислотными остатками D88 и D92 приводит к изменению конформации канала, что смещает пространственное расположение R85, который, действуя кооперативно с E312, координирует перемещение полярной головки лизоФХ и делает возможным его перенос через бислой мембраны [10].

Обнаружено несколько летальных (p.Thr159Met, p.Ser166Leu) и нелетальных (p.Pro402His, p.Ser339Leu) мутаций в гене этого белка у человека, которые вызывают синдром микроцефалии. Мутированные участки белка располагаются в трансмембранных доменах. Вызываемая мутацией замена серина на лейцин в 339-ом положении приводит к снижению транспорта ДГК в мозг, значительному когнитивному дефициту, отсутствию речи и двигательным расстройствам [14]. Эта мутация не приводит к снижению экспрессии транспортера в эндотелии, однако нарушает его транспортные функции в отношении переноса ДГК. У больных в плазме крови значительно повышен уровень лизоФХ, содержащего моно- и полиненасыщенные жирные кислоты, что свидетельствует о снижении транспорта этих липидов в мозг [14]. Летальные мутации человека в гене *Mfsd2a* (p.Thr159Met, p.Ser166Leu) приводят к микроцефалии, судорогам и смерти в течение первых лет жизни [15]. Белки с данными аминокислотными заменами нормально экспрессируются в эндотелии ГЭБ, однако, как было показано в экспериментах на трансфицированных *Mfsd2a* клетках HEK293 с использованием меченых субстратов, они полностью теряют способность транспортировать лизоФХ через плазматическую мембрану. Помимо этого, в клетках, трансфицированных мутантными генами, заторможен обеспечиваемый действием лизоФХ-ацилтрансферазы процесс превращения лизоФХ в мембранный ФХ [15], что является необходимым условием для включения ДГК в мембранные липиды.

Mfsd2a-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ТРАНСПОРТ лизоФХ В ЭНДОТЕЛИИ ГЭБ – ВАЖНЕЙШИЙ ПУТЬ ПОСТУПЛЕНИЯ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МОЗГ

Хорошо известно, что мозг всех животных чрезвычайно богат липидами. У млекопитающих они составляют половину сухого веса ткани, уступая в этом отношении только жировой ткани. Огромное количество данных свидетельствует о важнейшей роли ДГК и других омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в функционировании мозга. В процессе пренатального развития млекопитающих происходит динамичное накопление ДГК в структурах мозга, где она активирует процессы нейрогенеза, разветвление и рост отростков нервных клеток, стимулирует образование дендритных шипиков, синаптических контактов, обеспечивая процессы нейрональной и синаптической пластичности [16, 17]. Дефицит омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в рационе животных приводит к снижению нейрогенеза, ухудшению пространственной памяти и способности к обучению, нарушению зрения, психомоторных функций и поведения, активации воспалительных и нейродегенеративных процессов [16, 18]. Поскольку мозг не синтезирует эти жирные кислоты de novo, они должные поступать извне – с пищей или из печени, где ДГК в ограниченном количестве синтезируется из альфа-линоленовой кислоты. В плазме крови ДГК в свободном виде или в составе фосфолипидов переносится в комплексе с альбуминами или липопротеинами, при этом, как оказалось, более половины всей ДГК плазмы крови этерифицировано в составе лизоФХ [19].

Связь поступления ДГК в развивающийся мозг с циркулирующим в плазме крови лизоФХ была установлена еще в начале 90-х годов. Было показано, что преимущественной формой поступления ДГК в мозг является лизоФХ, а в неэтерифицированном виде ее поступление было незначительным [20, 21]. Интересно, что этот феномен был обнаружен только в мозгу – в печени, сердце и почках оба пути поступления ДГК были равнозначны [21, 22], что еще в 90-е годы позволило предположить наличие специфического для сосудов мозга механизмов транспорта ДГК. На *in vitro* модели ГЭБ, сконструированной при сокультивировании эндотелиальных клеток сосудов мозга и астроцитов, было показано, что лизоФХ является основной формой переноса ДГК через ГЭБ. Интересно, что в отсутствие астроцитов способность к переносу лизоФХ утрачивалась [19]. В экспериментах на мышах с 30-дневным употреблением корма, содержащего лизоФХ-ДГК, было показано увеличение концентрации ДГК в мозгу в 2 раза и улучшение способности к обучению. Замена лизоФХ-ДГК на свободную ДГК не приводила к подобным эффектам [23].

Нокаутные по гену *Mfsd2a* мыши были не способны транспортировать в мозг меченую ДГК в составе лизоФХ, демонстрировали резкое снижение уровня ДГК в мозгу, микроцефалию, снижение числа клеток Пуркинье в мозжечке, снижение плотности нейронов в гиппокампе в областях CA1 и CA3, а также повышенную тревожность и когнитивный дефицит. Транспорт ДГК в составе лизоФХ в печень и сердце этих мышей был не изменен [13]. Таким образом было установлено, что (а) Mfsd2a в эндотелии ГЭБ является натрий-зависимым специфическим симпортером лизоФХ-ДГК, и (б) обеспечиваемый этим белком транспорт ДГК является одним из важнейших путей поступления этой жирной кислоты в мозг. В других работах было уточнено, что в количественном отношении Mfsd2a эндотелия мозга переносит меньше ДГК, чем совокупное действие FATP1 (fatty acid transport protein 1) и FABP5 (fatty acid-binding protein 5) – классических систем транспорта свободных жирных кислот в клетку, однако осуществляемый им транспорт более эффективен, а время полужизни лизоФХ-ДГК, как показали эксперименты с внутривенным введением липидов, дольше, чем свободной ДГК [24].

Интересно, что этим же механизмом, по всей вероятности, доставляется в мозг не только ДГК, но и другая полиненасыщенная жирная кислота омега-3 ряда – эй-

козапентаеновая (ЭПК) – C20:5 ω 3. Несмотря на крайне низкое содержание этой жирной кислоты в фосфолипидах мозга млекопитающих, она обладает собственным функциональным потенциалом. Клинические и преклинические испытания свидетельствуют о том, что ЭПК более эффективна в лечении депрессивных расстройств, чем ДГК [25]. В связи с этим увеличение ее содержания в мозгу – актуальная клиническая задача, поскольку повысить ее содержание при использовании ЭПК в свободном виде в качестве пищевой добавки не удается. Оказалось, что можно достичь 100-кратного увеличения включения ЭПК в ФЛ мозга, если с диетой давать не свободную ЭПК, а лизоФХ-ЭПК [26]. При этом в фосфолипидах мозга увеличивается и уровень ДГК. Только при условии введения в организм лизоФХ-ЭПК, но не свободной ЭПК, наблюдается изменение экспрессии генов-мишеней в мозгу, таких как нейротрофический фактор мозга BDNF, рецептор серотонина 1A и др. Интересно, что такой механизм работает только в отношении мозга и сетчатки, поскольку добавка свободной ЭПК увеличивает ее уровень в жировой ткани, печени и сердце. Хотя участие Mfsd2a в транспорте лизоФХ-ЭПК в мозг не доказано, известно, что данный транспортер переносит лизоФХ с различными жирными кислотами с длиной цепи 14 и более атомов углерода, но не транспортирует свободные жирные кислоты [13]. В связи с этим авторы работы считают, что увеличение содержания ЭПК в фосфолипидах мозга обеспечивается функционированием Mfsd2a, а использование в терапевтических целях лизоФХ-ЭПК в форме пищевой добавки может быть эффективной стратегией коррекции депрессии, профилактике ретинопатии и макулодистрофии [26].

РОЛЬ Mfsd2a ТРАНСПОРТЕРА В СНИЖЕНИИ КАВЕОЛИН-ЗАВИСИМОГО ТРАНСЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В ЭНДОТЕЛИИ КАПИЛЛЯРОВ МОЗГА

Важной структурной особенностью клеток эндотелия ГЭБ, необходимой для поддержания его целостности, является низкий кавеолин-зависимый везикулярный транспорт [3, 6], один из важнейших механизмов обеспечения транспортных процессов в любых клетках. Оказалось, что в сдерживании активности данных транспортных процессов в клетках эндотелия капилляров мозга ведущая роль принадлежит белку Mfsd2a [12, 27]. У мышей, нокаутных по гену *Mfsd2a*, сохраняется целостность плотных контактов, однако обнаруживается высокая проницаемость ГЭБ, а в цитоплазме клеток эндотелия мозговых сосудов фиксируется интенсивный везикулярный транспорт [12].

Как оказалось, обнаруженный эффект Mfsd2a не связан с прямым действием белковой молекулы на процесс образования кавеол, а опосредуется способностью белка транспортировать в клетки эндотелия фосфолипиды, обогащенные ДГК, регулируя таким образом жирнокислотный состав плазматической мембраны. Была создана линия мышей, у которых белок Mfsd2a нормально экспрессировался в ткани мозга, но был лишен способности транспортировать липиды за счет замены аспарагина в 96-ом положении на аланин [27]. Такие мыши демонстрировали сходство с нокаутными по данному гену: у них наблюдалась микроцефалия, повышение проницаемости ГЭБ, резкое увеличение числа внутриклеточных везикул в клетках эндотелия мозга. Полученные данные свидетельствовали о том, что решающую роль в торможении трансцеллюлярного транспорта в клетках эндотелия мозга играет Mfsd2a-опосредуемый транспорт лизоФХ.

Сравнение методами липидомики состава жирных кислот эндотелия капилляров с низким (мозг) и высоким (легкие) трансцеллюлярным транспортом показало, что содержание ДГК в мембранах эндотелия мозга в 2–5 раз выше (в зависимости от класса фосфолипидов), чем в легких [27]. Уровень экспрессии мРНК *Mfsd2a* в

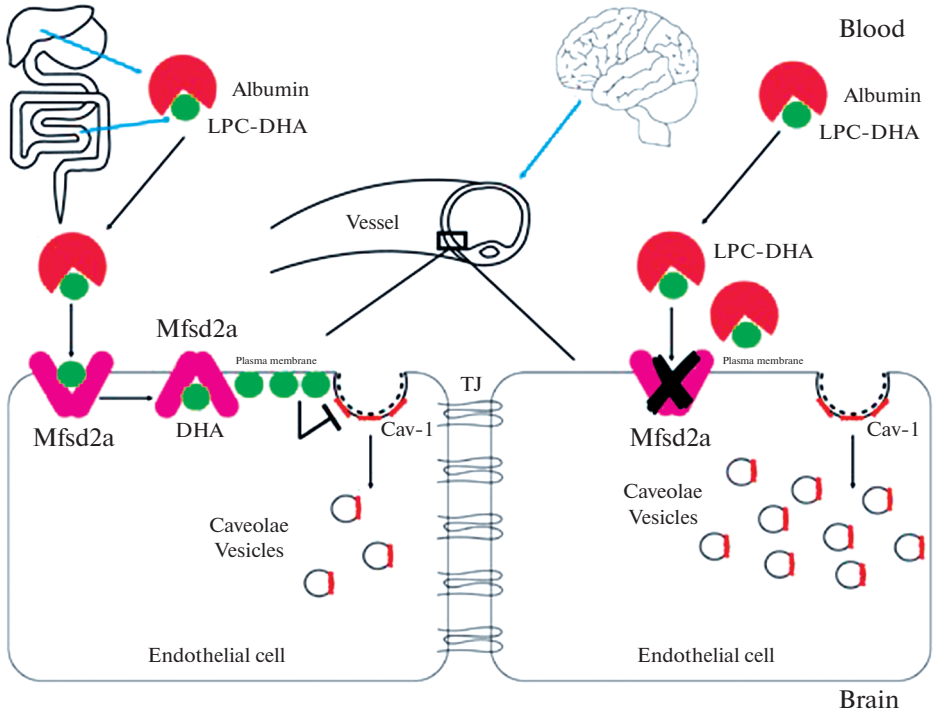

Рис. 1. Регуляция проницаемости ГЭБ Mfsd2a-опосредованным торможением кавеолин-зависимого трансцитоза в эндотелиальных клетках. ДГК, переносимая Mfsd2a, препятствует образованию кавеолин-позитивных везикул. В отсутствие или при ингибировании Mfsd2a повышается их образование и усиливается трансцитоз через эндотелиальные клетки. Cav-1: кавеолин-1, DHA: докозагексаеновая кислота, LPC: лизоФХ, TJ: плотные контакты. Из работы [35], воспроизведено с разрешения издателя.

эндотелии мозга почти в 80 раз выше, чем в эндотелии легких [12]. Каким же образом высокий уровень ДГК, обеспечиваемый Mfsd2a-опосредуемым транспортом лизоФХ, тормозит кавеолин-зависимый эндоцитоз?

С использованием генетических моделей, электронной микроскопии и методов липидомики было установлено, что липиды, транспортируемые переносчиком Mfsd2a, создают уникальную структуру микродоменов липидного бислоя мембран клеток эндотелия мозга [27]. Кавеолы, участки инвагинации плазматической мембраны, представляют из себя разновидность липидных рафтов с характерным для них составом липидов (высокое содержание холестерина, сфинголипидов и фосфолипидов с насыщенными жирными кислотами). В формировании кавеол ключевую роль играют белки кавеолины-1, которые, связываясь с холестерином липидных рафтов, вызывают инвагинацию плазматической мембраны [28]. Включение в состав фосфолипидов бислоя гибкого ацильного хвоста ДГК с 6 двойными связями вызывает значительную модификацию физических свойств мембраны и изменяет соотношение “неупорядоченных” доменов к “упорядоченным” (липидным рафтам) в пользу первых [29], что приводит к вытеснению кавеолина-1 из кавеол и торможению кластеризации ансамбля белков, необходимых для формирования кавеол (рис. 1). Нарушение структуры липидных рафтов при добавлении длинноцепочечных омега-3 жирных кислот, которое приводит к торможению рафт-зависимых сигнальных процессов, показано во многих типах клеток как в

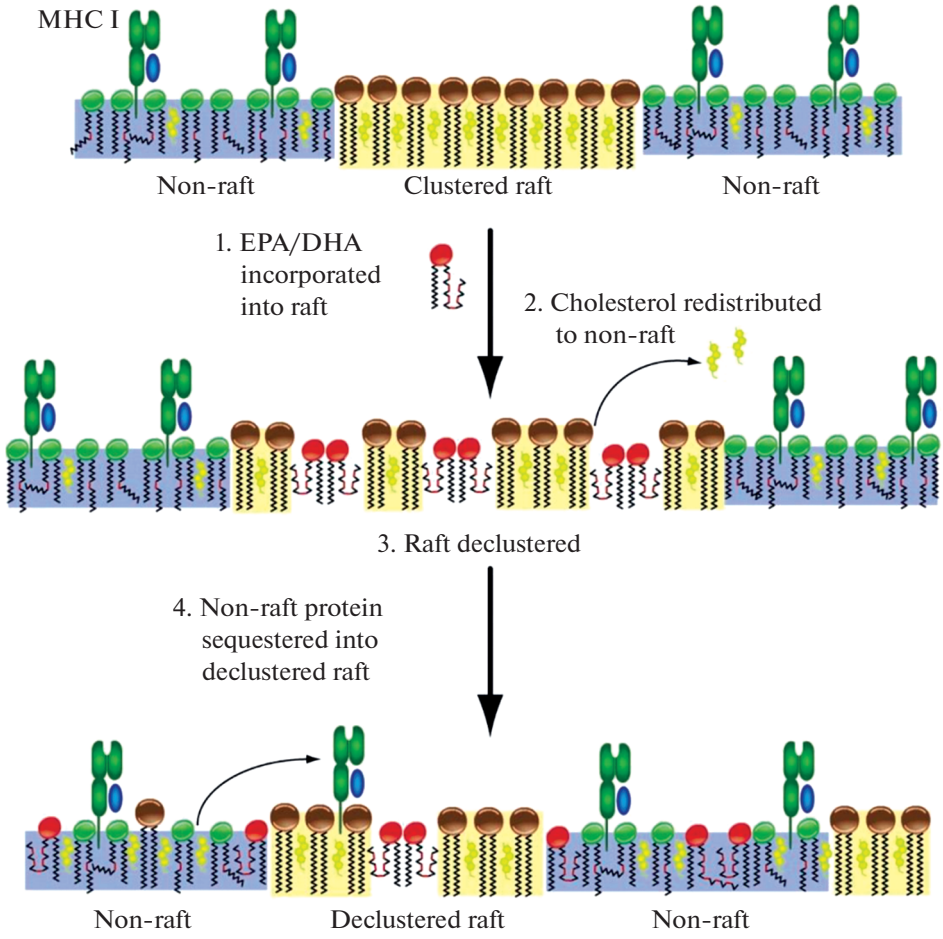

Рис. 2. Гипотетическая модель действия ДГК (DHA) и ЭПК (EPA) на нарушение молекулярной организации липидных рафтов. Включение жирных кислот в рафты вызывает вытеснение холестерина, что приводит к декластеризации рафтов, изменению локализации белков и нарушению рафт-зависимого сигналинга. Из работы [34], воспроизведено с разрешения издателя.

экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* [30–34]. Принцип действия этих жирных кислот на нарушение молекулярной организации липидных рафтов демонстрирует рис. 2.

С помощью молекулярно-генетических методов было выяснено, что одним из механизмов регуляции экспрессии Mfsd2a в эндотелии капилляров мозга и, соответственно, контроля проницаемости ГЭБ является сигнальный путь PTEN/AKT/NEDD4-2. Количество белка Mfsd2a в эндотелиальной клетке находится под прямым контролем E3 убиквитинлигазы NEDD4-2, которая инициирует его протеасомную деградацию. В свою очередь активность E3 убиквитинлигазы NEDD4-2 регулируется ее фосфорилированием AKT-киназой, уровень функциональной активности которой определяется фосфатазой Pten, тормозящей активацию AKT-киназы. Оверэкспрессия убиквитинлигазы или выключение гена *Pten* в эндотелии капилляров мозга приводит к снижению уровня Mfsd2a, увеличению трансцитоза и росту проницаемости ГЭБ [36].

РОЛЬ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА Mfsd2a–Spns В СФИНГОЗИН-1-ФОСФАТ-ЗАВИСИМОМ ПОДДЕРЖАНИИ ЦЕЛОСТНОСТИ ГЭБ

Сфингозин-1-фосфат (S1P) является важнейшим липидным медиатором, который играет ключевую роль в регуляции выживания клеток, пролиферации, миграции, адгезии и других клеточных процессах [37]. В основе его действия лежит связывание S1P со специфическими рецепторами на поверхности клетки. Оказалось, что S1P сигналинг, опосредованный $S1P_1$ рецепторами, является одним из регуляторов проницаемости ГЭБ за счет создания S1P-обогащенного микроокружения во внеклеточном матриксе эндотелия сосудов мозга [38, 39]. Точная роль S1P в этом механизме остается невыясненной, однако при введении мышам финголимода (FTY720), блокатора $S1P_1$ рецепторов, или при нокдауне гена этих рецепторов обнаруживалось увеличение проницаемости ГЭБ за счет частичного нарушения плотных контактов [39, 40], при этом инъекция в мозг S1P восстанавливала нарушение проницаемости ГЭБ у мышей, нокаутных по этому белку.

Оказалось, что транспортер Mfsd2a усиливает доставку S1P в паренхиму мозга – у мышей нокаутных по *Mfsd2a* было значительно снижено количество S1P во внеклеточном матриксе эндотелия, что приводило к увеличению проницаемости ГЭБ. Однако Mfsd2a не является транспортером S1P. Транспорт этого липида в мозг осуществляется другим белком – так называемым Spinster homolog 2 (Spns2), экспрессирующимся в эндотелиальных клетках [41]. Mfsd2a является своеобразной мембранной ловушкой для молекулы S1P, связывая отрицательно заряженную фосфатную группу, однако из-за отсутствия в молекуле S1P холина не может осуществить непосредственно перенос, передавая эту функцию белку Spns2. Таким образом, Mfsd2a и Spns2 действуют кооперативно, образуя особый белковый комплекс в эндотелиальных клетках мозга для осуществления транспорта S1P в мозг. Обеспечиваемое этим механизмом накопление S1P во внеклеточном матриксе эндотелия необходимо для градуального поддержания целостности ГЭБ: высокий уровень S1P поддерживает целостность ГЭБ, средний (при дефиците Mfsd2a) – увеличивает трансцеллюлярный транспорт, очень низкий (при дефиците Spns2) приводит к открытию плотных контактов в эндотелии [39].

РОЛЬ Mfsd2a ТРАНСПОРТЕРА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ГЕМАТОРЕТИНАЛЬНОГО БАРЬЕРА И ПОСТУПЛЕНИИ ДГК В СЕТЧАТКУ

Гематоретинальный барьер регулирует проникновение в ткани и клетки глаза необходимых веществ, в том числе жирных кислот, и удаление метаболитов. Основой организации внутреннего гематоретинального барьера являются плотные контакты эндотелиальных клеток сосудов, поддерживаемыми астроцитами, перицитами и клетками Мюллера. Внешний гематоретинальный барьер создается плотными контактами клеток пигментного эпителия сетчатки [42]. Хорошо известно, что сетчатка млекопитающих чрезвычайно богата ДГК – в наружных сегментах палочек она колокализована с родопсином в мембранах дисков и составляет свыше 60% всех жирных кислот [43, 44]. В сетчатке идентифицированы молекулярные типы фосфолипидов, содержащие 2 молекулы ДГК, эстерифицированной в 1-ом и 2-ом положениях глицеринового скелета фосфолипида, а также фосфолипиды, имеющие в своем составе помимо ДГК полиненасыщенные жирные кислоты омега-3 ряда с длиной цепи до 36 атомов углерода [45]. Дефицит ДГК приводит к различным проявлениям ретинопатии, связанной в том числе с увеличением проницаемости гематоретинального барьера. При многих заболеваниях зрительной системы, таких как пигментный ретинит, диабетическая ретинопатия, возрастная макулодистрофия, количество ДГК в сетчатке значительно снижено [46].

Как показали недавние исследования, важнейшую роль в поддержании высокого уровня ДГК в зрительной системе играет Mfsd2a-опосредованный транспорт лизоФХ через гематоретинальный барьер [47–49]. Mfsd2a экспрессируется в клетках пигментного эпителия и сосудах сетчатки [48]. У мышей, нокаутных по гену *Mfsd2a*, в постнатальном периоде значительно снижен транспорт лизоФХ-ДГК, уменьшена длина наружных сегментов палочек сетчатки, выявляются нарушения в организации дисков, уменьшено количество родопсина, наблюдается снижение числа фоторецепторных клеток [48, 49]. Содержание ДГК в ткани глаза нокаутов уменьшено на 40%, а падение ее уровня скомпенсировано ростом количества арахидоновой кислоты и моноеновых жирных кислот [47, 48]. Предполагается, что в отсутствие транспорта лизоФХ-ДГК у *Mfsd2a*$^{-/-}$ мышей фоторецепторы подвергаются прогрессирующей дегенерации. Интересно, что увеличение уровня ДГК в сетчатке, так же, как в мозге, достигается при использовании в качестве пищевой добавки лизоФХ-ДГК, но не триацилглицеринов, основных компонентов рыбьего жира, или ДГК в свободном виде, что подчеркивает важнейшую роль Mfsd2a в снабжении сетчатки омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами [46].

РОЛЬ Mfsd2a В НЕЙРОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Нарушение проницаемости ГЭБ и снижение экспрессии Mfsd2a в эндотелии капилляров мозга может являться как причиной, так и следствием острых и хронических патологических процессов, протекающих в ЦНС [2, 50]. Многочисленные примеры демонстрируют защитную функцию Mfsd2a, направленную на сохранение низкой проницаемости эндотелия ГЭБ. Показано, что при геморрагическом инсульте под действием клеток крови и содержащихся в ней биологически активных веществ, а также в результате активации микроглии, нарушается целостность ГЭБ, одной из причин которой является снижение экспрессии Mfsd2a в перигематомной области [51]. Рост проницаемости ГЭБ при этой патологии опосредован не только парацеллюлярным транспортом вследствие нарушения плотных контактов клеток эндотелия [52], но и увеличением трансцеллюлярного переноса [53], который регулируется белком Mfsd2a. Нокдаун и нокаут *Mfsd2a* у мышей с гемморрагическим инсультом значительно увеличивает проницаемость ГЭБ и содержание воды в мозгу. В эндотелиальных клетках значительно возрастает число пиноцитозных везикул и наблюдается рост экспрессии белков, обеспечивающих внутриклеточный трафик везикул (Srgap2, Stx7, and Sec22b). Эти симптомы устраняются при оверэкспрессии Mfsd2a. Полученные данные свидетельствуют о важной защитной роли Mfsd2a при повреждении проницаемости ГЭБ механизмом ингибирования везикулярного транспорта [51].

Субарахноидальное кровоизлияние вызывает повреждение ГЭБ, что приводит к увеличению его проницаемости, и, как следствие, к усилению развивающейся патологии мозга. Как было показано, в увеличении проницаемости, которая вызывается активацией кавеолин-зависимого трансцеллюлярного транспорта, решающая роль принадлежит снижению экспрессии Mfsd2a в эндотелии ГЭБ, что приводит к снижению содержания ДГК в липидном бислое и изменению его биофизических свойств [54]. Помимо этого, недостаток ДГК, вызываемый снижением экспрессии Mfsd2a, может приводить к снижению продукции противовоспалительных медиаторов, субстратом синтеза которых она является. Эти данные позволяют рассматривать Mfsd2a как терапевтическую мишень для защиты целостности ГЭБ и улучшения прогноза течения патологического процесса при субарахноидальном кровоизлиянии.

Нарушение ГЭБ и связанный с этим отек мозга является частым побочным эффектом при хирургических повреждениях мозга. В экспериментах на мышах, у ко-

торых молекулярно-генетическими методами были осуществлены нокаут гена *Mfsd2a* или его оверэкспрессия было показано, что оверэкспрессия транспортера приводит к ослаблению отека и снижению нейрологических повреждений, вызванных операцией, тогда как снижение его экспрессии еще более усиливает повреждение ГЭБ. Как показали полученные данные, положительный эффект оверэкспресии *Mfsd2a* на функции ГЭБ был связан со снижением экспрессии кавеолина-1, увеличением диссоциации транскрипционного фактора Nrf-2 со связывающим его белком Keap-1/Nrf-2 и увеличением в области хирургического вмешательства Nrf-2-зависимой экспрессии цитопротективных белков, таких как гем-оксигеназа-1, что приводило к росту экспрессии белков плотных контактов и поддержанию барьерных функций ГЭБ [55].

Хроническая ишемия головного мозга, как показали эксперименты на крысах, также приводит к снижению экспрессии *Mfsd2a*, увеличению проницаемости ГЭБ, росту трансцитоза в клетках эндотелия и когнитивным нарушениям [56]. Оверэкспрессия транспортера устраняет эти патологические проявления, не влияя при этом на ультраструктуру плотных контактов и экспрессию содержащихся в них белков. Эти данные позволяют заключить, что Mfsd2a необходим для поддержания низкой проницаемости ГЭБ при хронической ишемии мозга, и его защитный эффект связан с ингибированием трансцитоза [56].

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Полученные данные о специфических механизмах поступления ДГК в мозг, обеспечиваемыми эндотелиальным транспортером Mfsd2a, позволяют сделать переоценку существующих способов применения ДГК в качестве пищевой добавки для профилактики нейродегенеративных заболеваний. Оказалось, что введение ДГК в виде триацилглицеринов, основных компонентов рыбьего жира, или свободной (неэтерифицированной) ДГК приводит к повышению уровня этой жирной кислоты в жировой ткани и сердце, но не в мозгу. В противоположность этому добавление ДГК в виде лизоФХ или ФХ, содержащего ДГК в обоих положениях, не влияя на включение этой жирной кислоты в жировую ткань, приводит к 2-кратному повышению содержания ДГК в мозгу и значительной стимуляции продукции BDNF, что свидетельствует о ее функциональной активности [22]. Подобные результаты были получены и на сетчатке [46].

По всей вероятности, этими фактами объясняется низкая биодоступность для мозга применяемых омега-3 пищевых добавок, содержащих главным образом триацилглицерины, и недостаточная успешность их терапевтических эффектов в клинических испытаниях. Например, положительный эффект применения омега-3 пищевых добавок не был выявлен у пациентов с болезнью Альцгеймера [57], хотя при этой патологии снижено количество ДГК в мозгу больных, количество циркулирующего лизоФХ и уровень белка Mfsd2a в плазме крови, причем величина снижения коррелирует со степенью тяжести заболевания [58, 59]. В связи с этим эффективная доставка жизненно необходимых ДГК или ЭПК в мозг и сетчатку в виде лизоФХ может рассматриваться как многообещающий нутрицевтический потенциал в профилактике и лечении нейродегенеративных состояний, психических расстройств и ретинопатий. Недавно французскими учеными был запантенован препарат AceDoPC®, представляющий из себя лизоФХ-ДГК, в котором ДГК находится во втором положении, а в первом – ацетильная группа [60]. Такая структура лизоФХ препятствует его изомеризации при попадании в организм и позволяет сохранить ДГК во втором положении. В экспериментах на мышах *in vivo*, а также *in vitro* на моделях ГЭБ было доказано что применение AceDoPC® является наиболее эффективным способом доставки ДГК в мозг [61].

Другой важный практический аспект успехов в изучении Mfsd2a связан с потенциальной возможностью управления барьерными свойствами ГЭБ. Низкая проницаемость ГЭБ для многих лекарственных препаратов и вследствие этого невозможность достижения их необходимой терапевтической концентрации в паренхиме мозга является серьезной проблемой при лечении многих заболеваний ЦНС. Одна из активно разрабатываемых Mfsd2a-опосредованных стратегий предполагает транспорт лекарственных препаратов в мозг активацией трансцитоза. Китайскими исследователями была сконструирована пара вводимых поочередно наночастиц, первая из которых содержала так называемый transcytosis-targeting-peptide и тунимицин, тормозящий активность Mfsd2a, а вторая собственно противоопухолевые препараты, которые могли проникать в паренхиму мозга путем кавеолин-зависимого везикулярного транспорта, который повышается при ингибировании Mfsd2a [62]. Хотя применение данных наночастиц на моделях мышей с метастазами рака груди в мозг показало возможность эффективной доставки препарата в ткани мозга и высокую противоопухолевую активность, тщательные исследования необходимы для оценки потенциальных преимуществ данной терапевтической стратегии. Даже кратковременное “открытие” ГЭБ чревато серьезными последствиями для ЦНС и может быть использовано только в тяжелых патологиях, когда потенциальный риск оправдан.

В основе другой стратегии Mfsd2a-опосредованной доставки лекарственных препаратов в мозг лежит возможность синтеза соединений, в которых действующий агент химически связан с лизоФХ, что делает возможным его перенос транспортером [63]. Такая стратегия сопряжена с меньшим риском побочных эффектов, однако конъюгированный лекарственный препарат должен быть в определенной степени липофильным и иметь ограничения по размерам молекулы.

Тем не менее, несмотря на отсутствие на сегодняшний день убедительных успехов в применении Mfsd2a-опосредованных стратегий в лечении заболеваний ЦНС, эти подходы, учитывая огромную востребованность коррекций разнообразных нейропатологий, имеют несомненные перспективы как для потенциального усиления поступления в мозг жизненно необходимых жирных кислот, так и для доставки лекарственных препаратов, основанной на модуляции проницаемости ГЭБ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (№ 075-00776-19-02).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hawkins BT, Davis TP* (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol Rev 57(2): 173–185. https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4
2. *Salmina AB, Komleva YK, Malinovskaya NA, Morgun AV, Teplyashina EA, Lopatina OL, Gorina YV, Kharitonova EV, Khilazheva ED, Shuvaev AN* (2021) Blood-Brain Barrier Breakdown in Stress and Neurodegeneration: Biochemical Mechanisms and New Models for Translational Research. Biochemistry (Mosc) 86(6): 746–760. https://doi.org/10.1134/S0006297921060122
3. *Kaya M, Ahishali B* (2021) Basic physiology of the blood-brain barrier in health and disease: a brief overview. Tissue Barriers 9(1): 1840913. https://doi.org/10.1080/21688370.2020.1840913

4. *Brightman MW, Reese TS* (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J Cell Biol 40(3): 648–677.
https://doi.org/10.1083/jcb.40.3.648
5. *Reese TS, Karnovsky MJ* (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol 34(1): 207–217.
https://doi.org/10.1083/jcb.34.1.207
6. *Ayloo S, Gu C* (2019) Transcytosis at the blood-brain barrier. Curr Opin Neurobiol 57: 32-38.
https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.014
7. *Yan N* (2015) Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. Annu Rev Biophys 44: 257–283.
https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901
8. *Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH, Jr* (2012) The major facilitator superfamily (MFS) revisited. FEBS J 279(11): 2022–2035.
https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x
9. *Angers M, Uldry M, Kong D, Gimble JM, Jetten AM* (2008) Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. Biochem J 416(3): 347–355.
https://doi.org/10.1042/BJ20080165
10. *Cater RJ, Chua GL, Erramilli SK, Keener JE, Choy BC, Tokarz P, Chin CF, Quek DQY, Kloss B, Pepe JG, Parisi G, Wong BH, Clarke OB, Marty MT, Kossiakoff AA, Khelashvili G, Silver DL, Mancia F* (2021) Structural basis of omega-3 fatty acid transport across the blood-brain barrier. Nature 595(7866): 315–319.
https://doi.org/10.1038/s41586-021-03650-9
11. *Berger JH, Charron MJ, Silver DL* (2012) Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. PLoS One 7(11): e50629.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050629
12. *Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, Gu C* (2014) Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. Nature 509(7501): 507–511.
https://doi.org/10.1038/nature13324
13. *Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL* (2014) Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. Nature 509(7501): 503–506.
https://doi.org/10.1038/nature13241
14. *Alakbarzade V, Hameed A, Quek DQ, Chioza BA, Baple EL, Cazenave-Gassiot A, Nguyen LN, Wenk MR, Ahmad AQ, Sreekantan-Nair A, Weedon MN, Rich P, Patton MA, Warner TT, Silver DL, Crosby AH* (2015) A partially inactivating mutation in the sodium-dependent lysophosphatidylcholine transporter MFSD2A causes a non-lethal microcephaly syndrome. Nat Genet 47(7): 814–817.
https://doi.org/10.1038/ng.3313
15. *Guemez-Gamboa A, Nguyen LN, Yang H, Zaki MS, Kara M, Ben-Omran T, Akizu N, Rosti RO, Rosti B, Scott E, Schroth J, Copeland B, Vaux KK, Cazenave-Gassiot A, Quek DQ, Wong BH, Tan BC, Wenk MR, Gunel M, Gabriel S, Chi NC, Silver DL, Gleeson JG* (2015) Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome. Nat Genet 47(7): 809–813.
https://doi.org/10.1038/ng.3311
16. *Bazinet RP, Laye S* (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. Nat Rev Neurosci 15(12): 771–785.
https://doi.org/10.1038/nrn3820
17. *Parnova R* (2021) GPR40/FFA1 Free Fatty Acid Receptors and Their Functional Role. Neuroscien Behav Physiol 51(2): 256–264.
https://doi.org/10.1007/s11055-021-01064-8
18. *Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S* (2013) n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. Curr Med Chem 20(24): 2953–2963.
https://doi.org/10.2174/09298673113209990140
19. *Lagarde M, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thies F, Croset M, Lecerf J* (2001) Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. J Mol Neurosci 16(2-3): 201–204; discussion 215–221.
https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:201
20. *Thies F, Delachambre MC, Bentejac M, Lagarde M, Lecerf J* (1992) Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-l-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. J Neurochem 59(3): 1110–1116.
https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08353.x
21. *Thies F, Pillon C, Moliere P, Lagarde M, Lecerf J* (1994) Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain. Am J Physiol 267(5 Pt 2): R1273–

R1279.
https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.5.R1273

22. *Sugasini D, Yalagala PCR, Goggin A, Tai LM, Subbaiah PV* (2019) Enrichment of brain docosahexaenoic acid (DHA) is highly dependent upon the molecular carrier of dietary DHA: lysophosphatidylcholine is more efficient than either phosphatidylcholine or triacylglycerol. J Nutr Biochem 74: 108231.
https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108231
23. *Sugasini D, Thomas R, Yalagala PCR, Tai LM, Subbaiah PV* (2017) Dietary docosahexaenoic acid (DHA) as lysophosphatidylcholine, but not as free acid, enriches brain DHA and improves memory in adult mice. Sci Rep 7(1): 11263.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-11766-0
24. *Chouinard-Watkins R, Lacombe RJS, Bazinet RP* (2018) Mechanisms regulating brain docosahexaenoic acid uptake: what is the recent evidence? Curr Opin Clin Nutr Metab Care 21(2): 71–77.
https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000440
25. *Martins JG* (2009) EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. J Am Coll Nutr 28(5): 525–542.
https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719785
26. *Yalagala PCR, Sugasini D, Dasarathi S, Pahan K, Subbaiah PV* (2019) Dietary lysophosphatidylcholine-EPA enriches both EPA and DHA in the brain: potential treatment for depression. J Lipid Res 60(3): 566–578.
https://doi.org/10.1194/jlr.M090464
27. *Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, Deik AA, Ginty DD, Clish CB, Gu C* (2017) Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. Neuron 94(3): 581–594 e5.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.043
28. *Parton RG, Tillu VA, Collins BM* (2018) Caveolae. Curr Biol 28(8): R402–R405.
https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.075
29. *Wassall SR, Stillwell W* (2008) Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. Chem Phys Lipids 153(1): 57–63.
https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.010
30. *Li Q, Zhang Q, Wang M, Liu F, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J* (2007) Docosahexaenoic acid affects endothelial nitric oxide synthase in caveolae. Arch Biochem Biophys 466(2): 250–259.
https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.06.023
31. *Ma DW, Seo J, Davidson LA, Callaway ES, Fan YY, Lupton JR, Chapkin RS* (2004) n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. FASEB J 18(9): 1040–1052.
https://doi.org/10.1096/fj.03-1430fje
32. *Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J* (2007) Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase. Biochimie 89(1): 169–177.
https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.009
33. *Turk HF, Chapkin RS* (2013) Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 88(1): 43–47.
https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.03.008
34. *Shaikh SR* (2012) Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. J Nutr Biochem 23(2): 101–105.
https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.07.001
35. *Eser Ocak P, Ocak U, Sherchan P, Zhang JH, Tang J* (2020) Insights into major facilitator superfamily domain-containing protein-2a (Mfsd2a) in physiology and pathophysiology. What do we know so far? J Neurosci Res 98(1): 29–41.
https://doi.org/10.1002/jnr.24327
36. *Cui Y, Wang Y, Song X, Ning H, Zhang Y, Teng Y, Wang J, Yang X* (2021) Brain endothelial PTEN/AKT/NEDD4-2/MFSD2A axis regulates blood-brain barrier permeability. Cell Rep 36(1): 109327.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109327
37. *Cui M, Gobel V, Zhang H* (2022) Uncovering the 'sphinx' of sphingosine 1-phosphate signalling: from cellular events to organ morphogenesis. Biol Rev Camb Philos Soc 97(1): 251–272.
https://doi.org/10.1111/brv.12798
38. *Zhu D, Wang Y, Singh I, Bell RD, Deane R, Zhong Z, Sagare A, Winkler EA, Zlokovic BV* (2010) Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. Blood 115(23): 4963–4972.
https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-262386

39. *Wang Z, Zheng Y, Wang F, Zhong J, Zhao T, Xie Q, Zhu T, Ma F, Tang Q, Zhou B, Zhu J* (2020) Mfsd2a and Spns2 are essential for sphingosine-1-phosphate transport in the formation and maintenance of the blood-brain barrier. Sci Adv 6(22): eaay8627.
https://doi.org/10.1126/sciadv.aay8627
40. *Huwiler A, Zangemeister-Wittke U* (2018) The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives. Pharmacol Ther 185: 34–49.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.001
41. *Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N* (2012) The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. J Clin Invest 122(4): 1416–1426.
https://doi.org/10.1172/JCI60746
42. *Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N* (1966) Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. Br J Ophthalmol 50(8): 441–453.
https://doi.org/10.1136/bjo.50.8.441
43. *SanGiovanni JP, Chew EY* (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. Prog Retin Eye Res 24(1): 87–138.
https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002
44. *Fliesler SJ, Anderson RE* (1983) Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. Prog Lipid Res 22(2): 79–131.
https://doi.org/10.1016/0163-7827(83)90004-8
45. *Aveldano MI, Sprecher H* (1987) Very long chain (C24 to C36) polyenoic fatty acids of the n-3 and n-6 series in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from bovine retina. J Biol Chem 262(3): 1180–1186.
46. *Sugasini D, Yalagala PCR, Subbaiah PV* (2020) Efficient Enrichment of Retinal DHA with Dietary Lysophosphatidylcholine-DHA: Potential Application for Retinopathies. Nutrients 12(10).
https://doi.org/10.3390/nu12103114
47. *Lobanova ES, Schuhmann K, Finkelstein S, Lewis TR, Cady MA, Hao Y, Keuthan C, Ash JD, Burns ME, Shevchenko A, Arshavsky VY* (2019) Disrupted Blood-Retina Lysophosphatidylcholine Transport Impairs Photoreceptor Health But Not Visual Signal Transduction. J Neurosci 39(49): 9689–9701.
https://doi.org/10.1523/jneurosci.1142-19.2019
48. *Wong BH, Chan JP, Cazenave-Gassiot A, Poh RW, Foo JC, Galam DL, Ghosh S, Nguyen LN, Barathi VA, Yeo SW, Luu CD, Wenk MR, Silver DL* (2016) Mfsd2a Is a Transporter for the Essential omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid (DHA) in Eye and Is Important for Photoreceptor Cell Development. J Biol Chem 291(20): 10501–10514.
https://doi.org/10.1074/jbc.M116.721340
49. *Wong BH, Silver DL* (2020) Mfsd2a: A Physiologically Important Lysolipid Transporter in the Brain and Eye. Adv Exp Med Biol 1276: 223–234.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-6082-8_14
50. *Huang B, Li X* (2021) The Role of Mfsd2a in Nervous System Diseases. Front Neurosci 15: 730534.
https://doi.org/10.3389/fnins.2021.730534
51. *Yang YR, Xiong XY, Liu J, Wu LR, Zhong Q, Zhou K, Meng ZY, Liu L, Wang FX, Gong QW, Liao MF, Duan CM, Li J, Yang MH, Zhang Q, Gong CX, Yang QW* (2017) Mfsd2a (Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2a) Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Blood-Brain Barrier Disruption by Inhibiting Vesicular Transcytosis. J Am Heart Assoc 6(7).
https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005811
52. *Jiao X, He P, Li Y, Fan Z, Si M, Xie Q, Chang X, Huang D* (2015) The Role of Circulating Tight Junction Proteins in Evaluating Blood Brain Barrier Disruption following Intracranial Hemorrhage. Dis Markers 2015: 860120.
https://doi.org/10.1155/2015/860120
53. *De Bock M, Van Haver V, Vandenbroucke RE, Decrock E, Wang N, Leybaert L* (2016) Into rather unexplored terrain-transcellular transport across the blood-brain barrier. Glia 64(7): 1097–1123.
https://doi.org/10.1002/glia.22960
54. *Zhao C, Ma J, Wang Z, Li H, Shen H, Li X, Chen G* (2020) Mfsd2a Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption After Sub-arachnoid Hemorrhage by Inhibiting Caveolae-Mediated Transcellular Transport in Rats. Transl Stroke Res 11(5): 1012–1027.
https://doi.org/10.1007/s12975-019-00775-y
55. *Eser Ocak P, Ocak U, Sherchan P, Gamdzyk M, Tang J, Zhang JH* (2020) Overexpression of Mfsd2a attenuates blood brain barrier dysfunction via Cav-1/Keap-1/Nrf-2/HO-1 pathway in a rat model of surgical brain injury. Exp Neurol 326: 113203.
https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113203

56. *Qu C, Song H, Shen J, Xu L, Li Y, Qu C, Li T, Zhang J* (2020) Mfsd2a Reverses Spatial Learning and Memory Impairment Caused by Chronic Cerebral Hypoperfusion via Protection of the Blood-Brain Barrier. Front Neurosci 14: 461. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00461
57. *Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jonhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxen-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J* (2006) Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. Arch Neurol 63(10): 1402–1408. https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1402
58. *Sanchez-Campillo M, Ruiz-Pastor MJ, Gazquez A, Marin-Munoz J, Noguera-Perea F, Ruiz-Alcaraz AJ, Manzanares-Sanchez S, Antunez C, Larque E* (2019) Decreased Blood Level of MFSD2a as a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci 21(1). https://doi.org/10.3390/ijms21010070
59. *Semba RD* (2020) Perspective: The Potential Role of Circulating Lysophosphatidylcholine in Neuroprotection against Alzheimer Disease. Adv Nutr 11(4): 760–772. https://doi.org/10.1093/advances/nmaa024
60. *Hachem M, Nacir H, Picq M, Belkouch M, Bernoud-Hubac N, Windust A, Meiller L, Sauvinet V, Feugier N, Lambert-Porcheron S, Laville M, Lagarde M* (2020) Docosahexaenoic Acid (DHA) Bioavailability in Humans after Oral Intake of DHA-Containing Triacylglycerol or the Structured Phospholipid AceDoPC((R)). Nutrients 12(1). https://doi.org/10.3390/nu12010251
61. *Hachem M, Geloen A, Van AL, Foumaux B, Fenart L, Gosselet F, Da Silva P, Breton G, Lagarde M, Picq M, Bernoud-Hubac N* (2016) Efficient Docosahexaenoic Acid Uptake by the Brain from a Structured Phospholipid. Mol Neurobiol 53(5): 3205–3215. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9228-9
62. *Ju X, Miao T, Chen H, Ni J, Han L* (2021) Overcoming Mfsd2a-Mediated Low Transcytosis to Boost Nanoparticle Delivery to Brain for Chemotherapy of Brain Metastases. Adv Health Mater 10(9): e2001997. https://doi.org/10.1002/adhm.202001997
63. *Wang JZ, Xiao N, Zhang YZ, Zhao CX, Guo XH, Lu LM* (2016) Mfsd2a-based pharmacological strategies for drug delivery across the blood-brain barrier. Pharmacol Res 104: 124–131. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.024

Critical Role of Endothelial Lysophosphatidylcholine Transporter Mfsd2a in Establishing the Integrity of the Blood–Brain Barrier and in the Delivery of Omega-3 PUFA to the Brain

R. G. Parnova*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

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

Protein Mfsd2a (Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2a) is selectively expressed in the endothelium of brain capillaries and is a specific Na^+-dependent carrier of lysophosphatidylcholine (lysoPC) esterified with polyunsaturated fatty acids. This review summarizes current understanding of the molecular mechanisms of functioning of the transporter in endothelial cells and the role of transported lipids in inhibition of caveolin-dependent transcytosis and maintaining a low permeability of the blood-brain barrier. The role of Mfsd2a-mediated transfer of lysoPC is considered as the most important route of entry into the brain and retina of docosahexaenoic acid and other omega-3 fatty acids necessary for the normal development and functioning of the CNS and the visual system. The protective role of Mfsd2a in various CNS neuropathologies is discussed, as well as the prospects for developing Mfsd2a-mediated therapeutic strategies to increase the bioavailability of essential polyunsaturated fatty acids and to deliver drugs that do not penetrate the blood-brain barrier to brain tissue.

Keywords: blood-brain barrier, Mfsd2a, lysophosphatidylcholine, docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, retina

EDN: ZDKUYN
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 562–578

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ КАПИЛЛЯРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2022 г. А. В. Егорова[2, *], Т. И. Баранич[1, 2], А. В. Брыдун[1, 2], В. В. Глинкина[2], В. С. Сухоруков[1, 2]

[1]*Научный центр неврологии, Москва, Россия*

[2]*Российский национально-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 02.02.2022 г.
После доработки 03.03.2022 г.
Принята к публикации 25.03.2022 г.

В настоящем обзоре рассмотрены современные представления об особенностях морфологии и гистофизиологии эндотелиальных клеток капилляров головного мозга. Особое внимание уделено ультрамикроскопическому строению эндотелиоцитов, входящих в состав нейроваскулярной единицы. Обсуждена взаимосвязь их основных характеристик с реализацией барьерной функции. Проанализирована специфика межклеточных контактов в эндотелиоцитах капилляров в составе гематоэнцефалического барьера, структура их цитоскелета и гликокаликса. Рассмотрены особенности строения капилляров в составе нейрогенных ниш, а также в анатомических образованиях, где гематоэнцефалический барьер отсутствует или слабо выражен. Отдельный раздел обзора посвящен вопросам транспорта веществ в эндотелиоцитах головного мозга. Анализ современных источников информации позволил установить, что несмотря на значительное количество публикаций, посвященных описанию эндотелиальных клеток церебральных микрососудов, ряд вопросов так и остаются неизученными, и исследование особенностей строения и функционирования церебрального эндотелия не утрачивает своей актуальности.

Ключевые слова: церебральные эндотелиоциты, капилляры головного мозга, нейроваскулярная единица

DOI: 10.31857/S086981392205003X

Эндотелий кровеносных сосудов представляет собой активно функционирующую и сложную метаболическую систему. Схожесть строения эндотелиальных клеток в различных участках сосудистого русла сопровождается значительными различиями в их генной и биохимической специфичности, типах рецепторов, наборе ферментов и т.д. [1]. Гетерогенность популяции клеток эндотелия в организме человека определяется особенностями функционирования сосудов в разных тканях, гемодинамическими условиями и клеточным микроокружением.

В эмбриогенезе эндотелиальные клетки формируются из общего предшественника мезенхимного происхождения и приобретают тканеспецифичные свойства на различных этапах развития эндотелиальных прогениторных клеток в ходе их миграции и дифференцировки [2]. Эмбриональные стволовые клетки, коммитированные по эндотелиальному пути развития, заселяют области формирующегося

мозга, содержащие радиальную глию, нейробласты и нейроны [3] и рано начинают экспрессировать молекулы межклеточных контактов (молекулы клеточной адгезии, белки плотных и щелевых контактов) [4]. Уже на 8-й неделе эмбриогенеза иммунофенотипирование эндотелиальных прогениторных клеток демонстрирует экспрессию ими некоторых ключевых антигенов (например, CD34, CD31, CD133, CD45, VEGFR2, CD144 и др.) [5], идентификация которых на резидентных клетках сосудистой стенки или прогениторных клетках костномозгового происхождения позволяет судить о механизмах развития и направленной миграции клеток эндотелия в ткани.

Свойства, присущие эндотелиоцитам кровеносных сосудов головного мозга, позволяют эффективно регулировать взаимодействие кровотока и структур центральной нервной системы [6]. Ведущее место в поддержании церебрального гомеостаза принадлежит сосудам микроциркуляторного русла, прежде всего капиллярам, обеспечивающим адекватный обмен веществ.

Эндотелиальная выстилка большинства церебральных капилляров является частью нейроваскулярной единицы – интегрированной структуры, состоящей из эндотелиальных клеток микрососудов, функционально связанных с нейронами, астроцитами и перицитами. Нейроваскулярная единица составляет основу гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров, и эндотелий в ее составе характеризуется морфофункциональными признаками, которые позволяют реализовать как барьерную функцию, так и регулируемый транспорт [7].

В представленном обзоре на основании данных современной литературы систематизированы некоторые сведения, касающиеся особенностей морфологического строения и гистофизиологии эндотелия церебральных гемокапилляров.

1. СТРОЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ КАПИЛЛЯРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА В СОСТАВЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА (ГЭБ)

1.1. Ультраструктурное строение эндотелиоцитов

Ультраструктурные особенности строения стенки большинства капилляров головного мозга позволяют отнести их к группе капилляров непрерывного (соматического) типа. Их эндотелий не имеет фенестр и окружен непрерывной базальной мембраной (рис. 1).

Отсутствие фенестральных диафрагм и малая степень капиллярной проницаемости объясняется низкой экспрессией в плазмолемме эндотелиальных клеток гликопротеина PVLAP (plasmalemma vesicle-associated protein) [8]. Одним из основных регуляторов образования этого белка считается фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), продуцируемый самими эндотелиальными клетками и астроцитами [9]. Состояние гипоксии, индуцирующее синтез VEGF, усиливает экспрессию PVLAP на клетках эндотелия капилляров, что приводит к появлению фенестр и повышению уровня трансцитоза. Так, в экспериментах на мышах с очаговой церебральной ишемией через 48 ч после начала эксперимента в эндотелии выявлялось незначительное количество PLVAP, а через 5 дней было зафиксировано заметное повышение экспрессии данного белка. Кроме того, было показано, что все PLVAP-положительные клетки были локализованы вокруг области ишемического повреждения [10].

Эндотелиоциты капилляров головного мозга, как и другие субпопуляции эндотелиальных клеток, имеют вытянутую полигональную форму, уплощенное ядро и характеризуются немногочисленностью органелл. Исключение составляют митохондрии, которые в церебральных эндотелиоцитах представлены в гораздо большем количестве по сравнению с эндотелиальными клетками других локализаций. Митохондрии в эндотелии капилляров ГЭБ относительно крупные (0.2–0.6 мкм) с умеренно плотным гомогенным матриксом и короткими кристами. Присутствие в

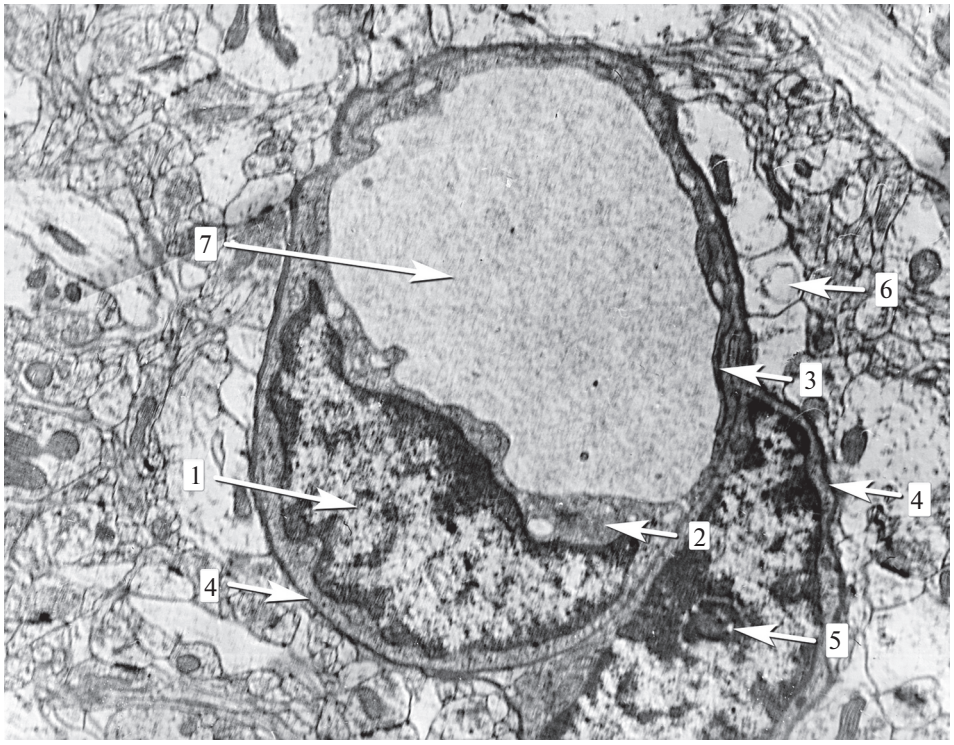

Рис. 1. Ультраструктура стенки капилляра головного мозга человека (препарат Л.Е. Фрумкиной).
1 – ядро эндотелиальной клетки; 2 – цитоплазма эндотелиоцита; 3 – межэндотелиальные соединения; 4 – базальная мембрана; 5 – ядро перицита; 6 – ножки астроцитов; 7 – просвет капилляра. Электронограмма. Ув. 6000.

клетках большого количества данных органелл объясняется не только высокими энергетическими потребностями транспортных систем, но и значительной интенсивностью процессов ангиогенеза, которые в головном мозге имеют место при восстановлении ткани после повреждения, а также в связи с явлением нейропластичности [11]. Особенностью энергетического метаболизма церебральных эндотелиоцитов является высокий базальный уровень гликолиза, а также интенсификация гликолиза и митохондриального дыхания при индукции васкуло- и ангиогенеза [12]. Ткани головного мозга характеризуются высоким содержанием лактата, основными продуцентами которого являются астроциты [13]. Значительное количество лактата может находиться и в системной циркуляции. В таких условиях клетки церебрального эндотелия реализуют так называемый обратный эффект Варбурга [14]: эндотелий утилизируют лактат, который обеспечивает стимуляцию цикла трикарбоновых кислот и митохондриальной продукции АТФ, что может быть необходимым для формирования локального микроокружения, оптимального для процессов ангиогенеза или высокой активности нейронов и нейропластичности.

Особая роль в осуществлении барьерной функции принадлежит цитоскелету церебральных эндотелиальных клеток, состоящему, как и у клеток других типов, из координированно функционирующих фибриллярных компонентов: актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов. Изменение структуры цитоскелета вызывает модификацию формы эндотелиоцитов: клетки сокращаются, а

между ними возникают промежутки – как следствие, сосудистая проницаемость повышается [15]. Установлено, что деформация эндотелиоцита затрагивает все три системы цитоскелета, но в различное время: сначала изменяется система актиновых филаментов, затем – система микротрубочек и, в заключение, виментиновая сеть [16].

Главными компонентами, обеспечивающими сокращение клетки, являются ее актиновые филаменты, и в целом ряде работ показано, что именно им принадлежит важнейшая роль в обеспечении барьерной функции эндотелия [17]. В эндотелиальных клетках процесс полимеризации актина очень динамичен, время обмена актиновых микрофиламентов составляет несколько секунд, они эффективно регулируют форму клетки. Динамичность обеспечивает быструю перестройку актиновых структур и переход от статического фенотипа, для которого типично наличие массивного кортикального актинового кольца и минимального количества стресс-фибрилл, к так называемому активированному фенотипу, характеризующемуся слабовыраженным слоем кортикальных актиновых филаментов (вплоть до их полного отсутствия) и наличием сжимающих клетку многочисленных стресс-фибрилл [18]. В настоящее время особую актуальность приобретают исследования, касающиеся взаимодействия актиновых филаментов церебральных эндотелиоцитов с адгезионными структурами клетки – фокальными и межклеточными контактами [16, 19]. Кроме того, проводится изучение вклада других фибриллярных структур (микротрубочек, промежуточных филаментов) в процесс регуляции сосудистой проницаемости и осуществление барьерной функции эндотелия, в том числе, в микрососудах головного мозга [20].

Особая роль в выполнении транспортной, барьерной, антитромботической и других функций церебрального эндотелия принадлежит гликокаликсу – многокомпонентной системе, расположенной на люминальной поверхности эндотелиальных клеток [21]. Его толщина в эндотелиоцитах капилляров головного мозга составляет около 0.07 мкм и меняется в зависимости от функционального состояния сосуда [22]. Толщина гликокаликса в эндотелии микрососудов других органов в физиологических условиях колеблется от 0.1 до 0.5 мкм [21].

Среди основных опорных молекул гликокаликса – мембранных протеогликанов (синдиканов и глипиканов) – в эндотелии церебральных капилляров не обнаруживается синдекан-1, экспрессия которого снижена, но все же представлена в гликокаликсе эндотелиальной выстилки других микрососудов [23, 24].

Как и в других клетках, в гликокаликсе эндотелиоцитов капилляров головного мозга выявляются шесть разновидностей глипиканов, среди которых особое место занимает глипикан-1. Он является регулятором активности эндотелиальной NO-синтазы и образования оксида азота (NO), участвующего в изменении сосудистого тонуса [24–27]. Этот глипикан играет защитную роль, и его потеря связана с дисфункцией кровеносных сосудов во время старения [28]. В ответ на повышение напряжения сдвига при изменении скорости кровотока плотность глипикана-1 в области межклеточных контактов увеличивается, что обеспечивается его миграцией в составе липидных рафтов, в то время как в области кавеол остается неизменной. При этом происходит реорганизация внутриклеточного цитоскелета с изменением морфологии эндотелиальных клеток и увеличением их продольного размера [27, 29].

Сульфатированные гликозоаминогликаны гликокаликса (хондроитин- и гепарансульфат), ковалентно неспецифично связанные с трансмембранными доменами протеогликанов, принимают участие во многих физиологических процессах, связывают, активируют или инактивируют биологически активные молекулы, влияют на иммунные реакции, воспаление, гемостаз, клеточный рост [21, 30, 31]. Кроме того, гликозаминогликаны модулируют пути сигналинга факторов роста, в том числе сосудистых эндотелиальных факторов роста VEGFs/VEGFRs, а также

влияют на транскрипцию генов в клетках эндотелия за счет стимуляции образования ядерного фактора NFkB [32].

Несульфатированный гликозаминогликан – гиалуроновая кислота – основной компонент гликокаликса, определяющий барьерные свойства эндотелия и регулирующий проницаемость кровеносных сосудов головного мозга – имеет спиралевидную структуру и обладает высокой вязкостью. Она контактирует с молекулами RHAMM (рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности) и CD44 на мембране клеток эндотелия. Последние в свою очередь соединяются с актиновыми филаментами и участвуют в кавеол-опосредованном эндоцитозе и трансцитозе [24, 33]. Возрастание активности гиалуронидазы при ряде патологических состояний приводит к фрагментации гиалуроновой кислоты и нарушению целостности эндотелиального гликокаликса с повышением его проницаемости [34]. Известен ряд ферментов, обеспечивающих отщепление протеогликанов и гликозаминогликанов от поверхности эндотелиальных клеток при действии различных стимулов. В частности, расщепление синдеканов и гликозаминогликанов опосредуется матриксными металлопротеазами и гепараназой [32]. В этой связи матриксные металлопротеазы эндотелия рассматриваются в качестве основных эффекторов деградации компонентов гликокаликса.

В состав гликопротеинового комплекса гликокаликса входят белки трех семейств – селектины (P- и E-селектины), интегрины (αV, α5, α2) и эндотелиальные иммуноглобулиноподобные белки (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1) [1]. Они обеспечивают взаимодействие иммунокомпетентных клеток с компонентами сосудистой стенки, регулируют процесс адгезии и последующей миграции лейкоцитов. В физиологических условиях толщина гликокаликса эндотелиоцита капилляра превышает размер адгезионных молекул и длину ворсинок лейкоцита при роллинге. Это ограничивает возможности контакта мембраны лейкоцита с молекулами адгезии на эндотелии, препятствуя их трансэндотелиальной миграции. Уменьшение толщины гликокаликса за счет слущивания его ключевых компонентов под воздействием провоспалительных агентов улучшает проникновение лейкоцитов к стенке сосуда, тем самым облегчая их трансэндотелиальную миграцию [35].

1.2. Межклеточные контакты церебральных эндотелиоцитов

Избирательная проницаемость, характерная в принципе для всех эндотелиальных клеток, регулируется, в первую очередь, плотными межклеточными контактами, представляющими собой комплекс структур, сформированных трансмембранными адгезивными молекулами, сочлененными с сетью внутриклеточных сигнальных молекул и связанных с цитоскелетом белков. В зависимости от фенотипа эндотелия, плотные контакты присутствуют в стенке сосудистого русла в разной степени комплексности. В образующих ГЭБ эндотелиоцитах мозговых капилляров, где особенно необходим контроль проницаемости, плотные контакты развиты значительно лучше, чем в других микрососудах [36]. Кроме того, комплекс межклеточных соединений церебральных эндотелиоцитов отличается динамичностью, что позволяет эффективно регулировать клеточную адгезию, межклеточный транспорт, запускать сигнальные каскады.

Ближе всего к базальной мембране располагаются адгезивные контакты (adherens junctions). В их составе представлены эндотелиальный кадгерин и катенины. Кадгерин эндотелия сосудов (Ve-кадгерин) является основным трансмембранным белком эндотелиальных адгезивных контактов. Внутри эндотелиоцита кадгерин связан с катенином, и через него – с актиновыми филаментами цитоскелета. Семейство катенинов в церебральных эндотелиоцитах представлено катенинами α, β (plakoglobin), γ и катенином p120. Считается, что β- и γ-катенины связывают кадге-

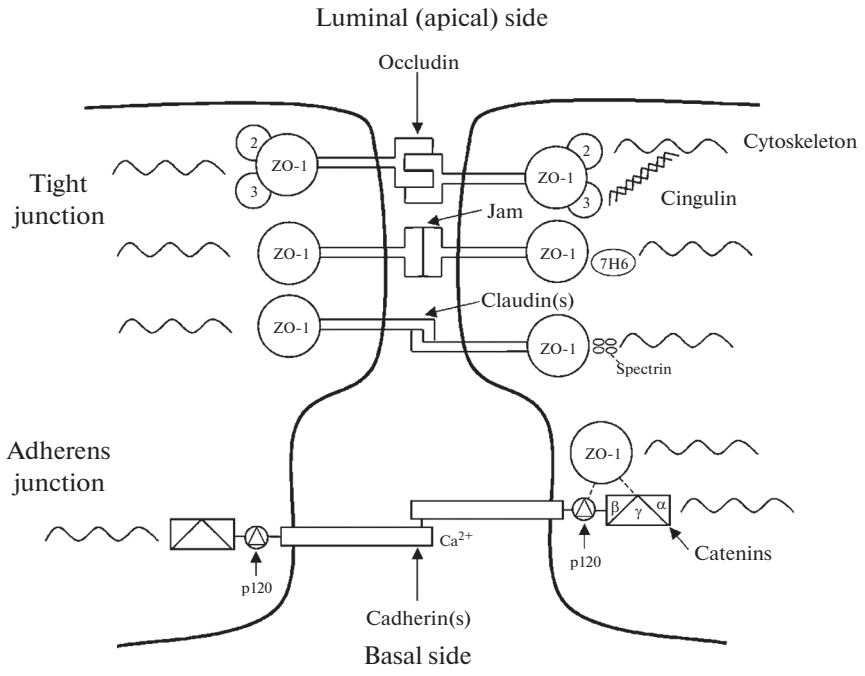

Рис. 2. Структурные особенности комплекса адгезивных и плотных контактов церебральных эндотелиоцитов.

рин с α-катенином. Роль катенина p120 остается спорной в отличие от вышеупомянутых классических катенинов, но высокое сродство связывания катенина p120 с Ve-кадгерином предполагает, что он может регулировать проницаемость сосудов [37–39] (рис. 2).

Тромбоцитарная молекула клеточной адгезии (PECAM-1) поддерживает целостность эндотелия кровеносных сосудов и вместе с катенинами участвует во взаимодействии лейкоцитов с эндотелием и обеспечивает их трансэндотелиальную миграцию при воспалении [40].

Выше адгезивных контактов располагаются нексусы, образующие каналы между эндотелиальными клетками посредством белков коннексинов CX30 и CX43, которые осуществляют в эндотелиальном слое в основном коммуникативную функцию.

Непосредственно у апикальной поверхности клеток располагаются плотные контакты, изолирующая способность которых в эндотелии капилляров головного мозга на два порядка выше, чем в капиллярах других органов. В их составе присутствуют трансмембранные и цитоплазматические белки. Трансмебранные белковые молекулы представлены окклюдином и клаудинами, которые ограничивают парацеллюлярный транспорт растворенных веществ и ионов, что создает высокое электрическое сопротивление барьера (более 1000 Ом/см) [41–45]. При исследовании ткани головного мозга методом Вестерн-блоттинга была показана экспрессия клаудинов-1, -3, -5 и -12, обеспечивающих повышение барьерных свойств эндотелия, а также клаудинов-2 и -17, образующих межклеточные поры для транспорта ионов и воды [43, 45–47].

К цитоплазматическим белкам плотных контактов относят ZO-протеины (1-, 2-, 3-), цингулин, Par-3, Par-6, Afidin/AF-6, 7H6, ZONAB, Rab3b, Rab13, PKC, G protein.

ZO-протеины – ассоциированные с мембраной гуанилкиназа-подобные белки (англ.: membrane-associated guanilate kinase-like proteins – MAGUK) состоят из доменов PDZ1, PDZ2 и PDZ3, SH3-домена и гуанилкиназа-подобного домена (GUK). Эти домены участвуют в упорядочении структуры белковых молекул и в поддержании целостности плазматических мембран [48]. ZO-протеины связаны с мембранными клаудинами и окклюдином с одной стороны и актиновыми и винкулиновыми филаментами с другой.

Цингулин обеспечивает связь между белками плотного контакта (ZO-2, ZO-3, AF-6, JAM) и актин-миозиновым цитоскелетом [49]. 7H6 в основном играет роль в поддержании структуры контакта, тогда как ZONAB (ассоциированный с ZO-1 белок, связывающий нуклеиновые кислоты) регулирует транскрипцию ErbB и параклеточную проницаемость. Rab белки (Rab13, Rab3b) играют роль в стыковке и слиянии транспортных пузырьков в комплексе плотных контактов [50]. PKC участвует в регуляции поляризации, а также в сборке плотного контакта, а G-белки (G-i0, G-i2, G12, Gs) ускоряют сборку плотных контактов и поддерживают трансэндотелиальное электрическое сопротивление [51].

В зоне плотных контактов эспрессируются межклеточная молекула адгезии ICAM-1 и молекулы контактной адгезии JAM-A, JAM-B и JAM-C, которые относятся к классу иммуноглобулинов. JAM-B и JAM-C участвуют в миграции сквозь эндотелий лейкоцитов [52]. ICAM-1 (CD54) – одна из главных молекул адгезии, которая обусловливает изменение проницаемости сосудов и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. ICAM-1 связывается с интегринами CD11/CD18 и LFA-1 лейкоцитов, в основном нейтрофилов, после чего они легко проникают в ткани [53]. Экспрессия ICAM-1 увеличивается после активации эндотелиоцитов активными формами кислорода и провоспалительными стимулами, действие которых опосредуется сигнальными путями с участием Akt/PKB, NF-κB, MAP-киназы p38 и ERK1/2 [54–56]. В норме эндотелиальные клетки церебральных капилляров имеют низкую экспрессию молекул адгезии лейкоцитов, что делает практически невозможным проникновение иммунных клеток в центральную нервную систему. Провоспалительные цитокины (α-ФНО, ИЛ-1β и ИЛ-6), высвобожденные активированной микроглией, индуцируют перегруппировку и изменение экспрессии белков плотных контактов (ZO-1 и окклюдин), что приводит к увеличению проницаемости эндотелия, диффузии малых молекул и миграции лейкоцитов через образующиеся щели [57].

При исследовании особенностей формирования ГЭБ у крыс в физиологических условиях, а также после перинатальной гипоксии и стресса в молодом возрасте, было установлено, что в физиологических условиях количество клеток, экспрессирующих JAM, ZO1 и клаудин 5, несколько увеличивается в период от 7-го до 70-го дня жизни в коре, гиппокампе и миндалине головного мозга. После перенесенной перинатальной гипоксии количество клеток, экспрессирующих белки плотных контактов (JAM, клаудин), значительно увеличивается с 28-го по 70-й дни жизни крысы, в то время как количество ZO1 положительных клеток за тот же период времени снижается. То есть перенесенный в раннем возрасте стресс вызывает дисбаланс между экспрессией ZO1 и других белков плотных контактов, но эти изменения противоположны по направлению [58].

1.3. Базальная мембрана

Немаловажная роль в регуляции проницаемости капилляров головного мозга принадлежит базальной мембране, объединенной с эндотелиоцитами в единую систему при помощи фокальных контактов [59]. Интегрины – основные белки этого контакта представляют собой гликопротеиновые комплексы, состоящие из

α- и β-субъединиц. В цитоплазме эндотелиальной клетки интегрины соединяются с актиновыми микрофиламентами цитоскелета. Механические силы, действующие на внеклеточный домен интегрина, способны активировать сигнальные белки, связанные с его цитоплазматическим доменом, и запускать генерализованные реакции с участием цитоскелета. Прочность прикрепления эндотелиальных клеток к матриксу базальной мембраны может изменяться при молекулярных перестройках в области цитоплазматического домена интегрина [59, 60].

Базальная мембрана эндотелиоцитов капилляров ГЭБ является непрерывной, трехслойной и характеризуется повышенным по сравнению с аналогичной структурой других субпопуляций эндотелиоцитов содержанием коллагена IV типа. Протеазы, выделяющиеся при воздействии провоспалительных агентов, увеличивают порозность мембраны, что приводит к повышению проницаемости ГЭБ [61]. Среди белков внеклеточного матрикса базальной мембраны следует отметить ламинин. Он действует как барьер для заряженных частиц с определенными молекулярно-весовыми характеристиками и регулирует проницаемость и клеточный транспорт через ГЭБ. Толщина базальной мембраны в церебральном эндотелии колеблется от 100 до 200 нм. В капиллярах ГЭБ данная структура объединяет между собой эндотелий, перициты и перикапиллярную глию, выполняя связующую функцию. Апикальные микровыросты перицитов и базальные микровыросты эндотелиоцитов связаны между собой при помощи плотных или адгезивных контактов, обеспечивающих тесную функциональную взаимосвязь [62]. Снаружи от базальной мембраны капилляров располагается сплошной футляр из астроцитов, отростки которых образуют плотные или адгезивные соединения.

2. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ КАПИЛЛЯРОВ В ОТДЕЛЬНЫХ УЧАСТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ИЗМЕНЕНИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ СТАРЕНИЕ

Для капилляров анатомических образований, в которых ГЭБ отсутствует или слабо выражен, характерен несколько иной фенотип. К таким структурам относятся *area postrema* ромбовидной ямки (дна IV желудочка), эпифиз, нейрогипофиз, прикрепленная пластинка (*lamina affixa*), субфорникальный орган, субкомиссуральный орган. Большинство из них является нейроэндокринными структурами, участвующими в процессах нейрогуморальной регуляции. Наличие ГЭБ препятствовало бы исполнению данными анатомическими образованиями своих функций.

При электронно-микроскопическом исследовании строения стенки таких капилляров установлено присутствие как типичного, так и фенестрированного эндотелия. Клетки характеризуются менее выраженной экспрессией белков плотных контактов, низким электрическим сопротивлением, наличием в цитоплазме большого количества микровезикул и вакуолей. Это свидетельствует об их участии в процессах трансэндотелиального транспорта веществ и о меняющейся функциональной активности клеток [63].

Рядом структурно-функциональных особенностей обладает и эндотелиальный слой, выстилающий капилляры в области нейрогенных ниш, где благодаря микроокружению, формируемому клетками эндотелия и астроглии, фиксируются явления нейрогенеза в постнатальном периоде. Нейрогенными нишами в головном мозге являются субвентрикулярная зона боковых желудочков и субгранулярная зона зубчатой извилины в гиппокампе [64, 65]. Так, субвентрикулярная зона боковых желудочков характеризуется повышенной проницаемостью ГЭБ вследствие меньшего покрытия эндотелия и перицитов отростками периваскулярной астроглии. Это необходимо для секреции в нишу факторов роста и других регуляторных молекул. В субгранулярной зоне зубчатой извилины проницаемость стенки церебраль-

ных микрососудов существенно ниже, и основная часть гуморальных факторов, регулирующих нейрогенез, секретируется локально [66, 67].

При физиологическом старении происходят следующие изменения в структуре церебральных капилляров: увеличивается толщина капиллярной стенки, отмечается утрата перицитов, снижается количество эндотелиоцитов и митохондрий в них, уменьшается экспрессия белков плотных контактов, увеличивается толщина базальной мембраны. В базальной мембране возрастает концентрация коллагена IV и снижается содержание ламинина [68].

3. ТРАНСПОРТ

Барьерный фенотип, присущий эндотелиоцитам капилляров в составе ГЭБ, практически исключает возможность парацеллюлярного транспорта и пиноцитоза. Этим объясняется отсутствие (или минимальное количество) пиноцитозных везикул в клетках [63, 69]. В физиологических условиях вещества, безопасные для нейронов, транспортируются трансцеллюлярно пассивной и облегченной диффузией, а также активным транспортом.

Пассивной диффузией эндотелий преодолевают вещества, обладающие высокой липофильностью, молекулярной массой менее 400 г/моль и имеющие в своей структуре не более 8 водородных связей [70].

Облегченная диффузия также не требует энергетических затрат, но осуществляется при участии энергетически-независимых транспортных белков семейства SLC (the solute-linked carrier). Примером такого способа транспорта является перенос молекул глюкозы, лактата, аминокислот, пептидов малого размера, лекарственных средств и их конъюгатов, стероидов и т.д. [63, 70].

Активный транспорт осуществляется энергетически-зависимыми белками-транспортерами, в подавляющем большинстве суперсемейства ABC (the adenosine triphosphate (ATP) – binding cassette). Они состоят из двух трансмембранных доменов: один осуществляет гидролиз АТФ с высвобождением энергии, второй использует энергию и переносит субстрат через мембрану [71]. Белки суперсемейства ABC осуществляют вынос (эффлюкс) из центральной нервной системы метаболитов, токсинов, избытка нутриентов [63]. Наиболее изученным представителем данного семейства является Р-гликопротеин, отвечающий за мультирезистентность центральной нервной системы к лекарственным средствам [72, 73], выводя их из эндотелиоцитов обратно в кровеносное русло. Ингибирование Р-гликопротеина и других белков, ассоциированных с неспецифической лекарственной устойчивостью, является одной из основных проблем фармакотерапии заболеваний центральной нервной системы [74].

Одним из эффлюксных механизмов является конвективно-опосредованное выделение, когда вещество минует прохождение через биологические мембраны. На сегодняшний день многие его аспекты остаются неизученными [63].

Основным видом транспорта, отвечающим за перенос макромолекул, является везикулярный или канальцевый транспорт. Он подразделяется на рецептор-опосредованный и абсорбцио-опосредованный трансцитоз. Рецептор-опосредованный трансцитоз осуществляется за счет связывания макромолекулы с рецепторами на внешней стороне мембраны. Абсорбцио-опосредованный трансцитоз реализуется за счет разности электрических зарядов мембраны клетки и макромолекулы. Таким образом происходит сближение между ними и удержание макромолекулы на поверхности мембраны [75].

Механизмы трансцитоза в церебральных эндотелиоцитах отличаются от таковых в эндотелиальных клетках других тканей [76, 77]. Перенос макромолекул реа-

лизуется субстрат-специфическими транспортными системами преимущественно путем рецептор-опосредованного трансцитоза [78].

Эндоцитарные пути в эндотелиальных клетках делятся на две категории: клатрин-опосредованный эндоцитоз и клатрин-независимый эндоцитоз [79]. В эндотелиоцитах головного мозга преобладает достаточно изученный на данный момент клатрин-опосредованный эндоцитоз. Однако механизмы, сопровождающие формирование везикул, до сих пор являются предметом активных исследований. Так, в работах последних лет уточняется роль в эндоцитозе белков Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) и гликокаликса [80]. Белок BAR обнаружен в трех изоформах: N-BAR, F-BAR и I-BAR [58]. N-BAR и F-BAR способствуют образованию инвагинаций плазмолемы, I-BAR участвует в образовании ее выпячиваний. Белок N-BAR существует в двух изоформах, -1 и -2, причем обе содержат домен SH3, который взаимодействует с динамином – белком, обеспечивающим отделение клатринового пузырька от плазмолеммы [81], а также домен CLAP, который обеспечивает связывание клатрина и адаптерного белка AP2 [82].

Наибольший интерес в последние годы вызывает внутриклеточный трафик в эндотелии головного мозга [83, 84]. Трехмерные реконструкции серийных электронно-микроскопических срезов показали, что внутриклеточные структуры, возникающие в ходе трансцитоза, редко были отдельными пузырьками, а являлись частью большой многомерной сети канальцев. Эти исследования предполагают, что транспортировка через канальцы приобретает первостепенную роль в перемещении молекул через ГЭБ [84].

Как утверждают недавние исследования [60], с возрастом экспрессия генов, кодирующих образование рецепторов, включая Tfrc, снижается. Уменьшается синтез белков, участвующих в реализации рецептор-опосредованного трансцитоза, включая клатрин, PICALM, Rin3 и Epsin1. И осуществляется переход от лиганд-специфичного к неспецифическому кавеолярному трансцитозу. Белок F-BAR PACSIN-2 (или синдапин-2) участвует в биогенезе кавеол и опосредованном кавеолами эндоцитозе [85–88]. Интересно, что экспрессия Cav1, который кодирует кавеолин-1, усиливается с возрастом вместе со снижением Mfsd2a, супрессора образования кавеол в церебральных эндотелиоцитах [60]. В реализации механизмов кавеолярного трансцитоза участвует также и гиалуроновая кислота, входящая в состав гликокаликса [24, 33].

Наличие GPI-домена в глипикане-1, с помощью которого он связывается со специфически устроенными участками на мембране эндотелия – липидными рафтами, позволяет предположить участие гликокаликса в процессах рафт-зависимого GPI-связанного эндоцитоза. Однако существование данного типа транспорта и его механизмы в церебральном эндотелии изучены недостаточно.

Особый интерес для исследователей вызывает транспорт воды в центральной нервной системе. Он считается активно регулируемым процессом и осуществляется интегральными мембранными водными белками – аквапоринами. Открытие экспрессии аквапоринов в мозге побудило к изучению возможной связи между данными белками и неврологическими состояниями, связанными с нарушениями движения воды, например, отеком мозга [89]. В церебральном эндотелии экспрессируются аквапорины-1 и -7. Они в основном локализуются на апикальной мембране эндотелиальных клеток сосудистого сплетения, что позволяет предположить их участие в секреции ликвора [90]. Аквапорин-1 играет важную роль в ангиогенезе, миграции и росте клеток. Предполагается, что он может быть вовлечен в опухолевый процесс, так как был обнаружен на эндотелии сосудов различных опухолей: глиобластомы, астроцитомы, метастазирующей карциномы, менингиомы, а также субэпендимальной астроцитомы и опухоли сосудистого сплетения [91].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндотелиальные клетки, выстилающие церебральные капилляры, характеризуются неоднородным фенотипом, что определяется особенностями их локализации и функциональной нагрузкой: эндотелиоциты капилляров сосудистых сплетений играют исключительную роль в регуляции продукции ликвора, эндотелиальные клетки капилляров в структурах, где присутствует ГЭБ, обеспечивают избирательную проницаемость. Уникальные структурно-функциональные характеристики эндотелиальной выстилки капилляров, входящих в состав ГЭБ (отсутствие фенестр, наличие комплекса плотных межклеточных контактов, обилие митохондрий, низкий уровень пиноцитоза, высокое трансэндотелиальное сопротивление), достаточно глубоко исследованы и подробно описаны в современной литературе. Однако ряд вопросов так и остаются не в полной мере изученными. К ним относятся особенности морфологии и функционирования эндотелия в области нейрогенных ниш, роль элементов цитоскелета эндотелиоцитов в формировании и динамической перестройке фокальных и межклеточных контактов, особенности транс- и парацеллюлярного транспорта (в особенности адресной доставки лекарственных препаратов), механизмы поддержания целостности эндотелиального монослоя и многие другие.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание текста рукописи – А.В.Е., обзор публикаций по теме статьи – Е.А.В., Т.И.Б., А.В.Б., В.С.С., В.В.Г., редактирование рукописи – В.С.С., В.В.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Живень МК, Захарова ИС, Шевченко АИ, Покушалов ЕА, Закиян СМ* (2015) Гетерогенность клеток эндотелия. Патол кровообращ и кардиохирург 19(4-2): 104–112. [*Zhiven' MK, Zaharova IS, Shevchenko AI, Pokushalov EA, Zakiyan SM* (2015) Heterogeneity of endothelial cells. Pathol Blood Circul Card Surg 19(4–2): 104–112. (In Russ)]. https://doi.org/10.21688/1681-3472-2015-4-2-104-112
2. *Atkins G, Jain M, Hamik A* (2011) Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vasc Biol 31(7): 1476–1484. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.228999
3. *Lippmann E, Azarin S, Kay J, Nessler R, Wilson H, AlAhmad, A Palecek S, Shusta E* (2012) Derivation of blood brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 30(8): 783–791. https://doi.org/10.1038/nbt.2247
4. *Timmermans F, Plum J, Yöder M, Ingram D, Vandekerckhove B, Case J* (2009) Endothelial progenitor cells: identity defined? J Cell Mol Med 13(1): 87–102. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x
5. *Stankovich B, Aguayo E, Barragan F, Sharma A, Pallavicini M* (2011) Differential adhesion molecule expression during murine embryonic stem cell commitment to the hematopoietic and endothelial lineages. PLoS One 6(9): e23810. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023810
6. *Shapoval NS, Malinovskaya NA, Morgun AV, Salmina AB, Obolenskaya ON, Medvedeva NA, Medvedev OS* (2021) The effect of ubiquinol on cerebral endothelial cells in different regions of rat brain. Cell and Tissue Biol 15: 260–266. https://doi.org/10.1134/S1990519X21030111

7. *Uryu K, Laurer H, McIntosh T, Praticò D, Martinez D, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ* (2002) Repetitive mild brain trauma accelerates Aβ deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. J Neurosci 22 (2): 446–454. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00446.2002
8. *Ling Guo, Hongyan Zhang, Yinglong Hou, Tianshu Wei, Ju Liu* (2016) Plasmalemma vesicle-associated protein: A crucial component of vascular homeostasis. Exp Therap Med 12:1639–1644. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3557
9. *Strickland LA, Jubb AM, Hongo JA, Zhong F, Burwick J, Fu L, Frantz GD, Koeppen H* (2005) Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). J Pathol 206(4): 466–475. https://doi.org/10.1002/path.1805
10. *Shue EH, Carson-Walter EB, Liu Y, Winans BN, Ali ZS, Chen J, Walter KA* (2008) Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) is a marker of blood-brain barrier disruption in rodent models. BMC Neurosci 9: 29. https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-29
11. *Salmina AB, Kuvacheva NV, Morgun AV, Komleva YK, Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Gorina YV, Taranushenko TE, Petrova LL* (2015) Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. Int J Biochem Cell Biol 64: 174–184. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.005
12. *Rutkai I, Evans WR, Bess N, Salter-Cid T, Cikic S, Chandra PK, Katakam PVG, Mostany R, Busija DW* (2020) Chronic imaging of mitochondria in the murine cerebral vasculature using in vivo two-photon microscopy. Am J Physiol Heart Circul Physiol 318(6): 1379–1386. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00751.2019
13. *Figley CR* (2011) Lactate transport and metabolism in the human brain: implications for the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. J Neurosci 31(13): 4768–4770. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6612-10.2011
14. *Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F* (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. Cell Cycle 8(23): 3984–4001. https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238
15. *Шахов АС, Дугина ВБ, Алиева ИБ* (2019) Актиновый цитоскелет эндотелиоцитов – структурные особенности организации на страже барьерной функции (обзор). Биохимия 84(4): 494–508. [*Shakhov AS, Dugina VB, Alieva IB* (2019) Actin cytoskeleton of endotheliocytes – structural features of the organization guarding the barrier function (review). Biochemistry 84(4): 494–508. (In Russ)]. https://doi.org/10.1134/S0320972519040031
16. *Zielinski A, Linnartz C, Pleschka C, Dreissen G, Springer R, Merkel R, Hoffmann B* (2018) Reorientation dynamics and structural interdependenciesof actin, microtubules and intermediate filaments upon cyclic stretch application. Cytoskeleton. 75(9): 385–394. https://doi.org/10.1002/cm.21470
17. *Zhang C, Chen H, He Q, Luo Y, He A, Tao A, Yan J* (2021) Fibrinogen/akt/microfilament axis promotes colitis by enhancing vascular permeability. CMGH Cell Mol Gastroenterol Hepatol 11(3): 683–696. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.10.007
18. *Amann KJ, Pollard TD* (2000) Cellular regulation of actin network assembly. Curr Biol 10(20): 728–730. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00751-X
19. *Cerutti C, Ridley AJ* (2017) Endothelial cell adhesion and signaling. Exper Cell Res 358(1): 31–38. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003
20. *Алиева ИБ* (2014) Роль микротрубочек цитоскелета в регуляции барьерной функции эндотелия. Биохимия 79(9): 964–975. [*Alieva IB* (2014) The role of cytoskeletal microtubules in the regulation of endothelial barrier function. Biochemistry 79(9): 964–975. (In Russ)]. https://doi.org/10.1134/S0006297914090119
21. *Власов ТД, Лазовская ОА, Шиманьски ДА, Нестерович ИИ, Шапорова НЛ* (2020) Эндотелиальный гликокаликс: методы исследования и перспективы их применения при оценке дисфункции эндотелия. Регионарн кровообращ и микроциркул 19 (1): 5–16. [*Vlasov TD, Lazovskaya OA, SHiman'ski DA, Nesterovich II, SHaporova NL* (2020) Endothelial glycocalyx: research methods and prospects for their application in assessing endothelial dysfunction. Region Blood Circul and Microcircul 19 (1): 5–16. (In Russ)]. https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-1
22. *Черток ВМ, Черток АГ* (2016) Регуляторный потенциал капилляров мозга. Тихоокеанск мед журн 2: 72–80. [*Chertok VM, Chertok AG* (2016) Regulatory potential of brain capillaries. Pacific Med J 2: 72–80. (In Russ)].

23. *Song HW, Foreman KL, Gastfriend BD, Kuo JS, Palecek SP, Shusta EV* (2020) Transcriptomic comparison of human and mouse brain microvessels. Sci Rep 10: 12358. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69096-7
24. *Zeng Y* (2016) Endothelial glycocalyx as a critical signalling platform integrating the extracellular hemodynamic forces and chemical signalling. J Cell Mol Med 221(8): 1457–1462. https://doi.org/10.1111/jcmm.13081
25. *Максименко АВ, Турашев АД* (2014) Эндотелиальный гликокаликс системы кровообращения. I. Обнаружение, компоненты, структурная организация. Биоорган химия 40 (2): 119–128. [*Maksimenko AV, Turashev AD* (2014) Endothelial glycocalyx of blood circulation. I. Finding, components, structure organization (Review). Bioorgan Chem 40(2): 119–128. (In Russ)]. https://doi.org/10.1134/s1068162014020113
26. *Ostrowski SR, Gaïni S, Pedersen C, Johansson PI* (2015) Sympathoadrenal activation and endothelial damage in patients with varying degrees of acute infectious disease: An observational study. J Crit Care Elsevier Inc 30(1): 90–96. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.10.006
27. *Zeng Y, Liu J* (2016) Role of glypican-1 in endothelial NOS activation under various steady shear stress magnitudes. Exp Cell Res Elsevier 348(2): 184–189. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.017
28. *Mahmoud M, Mayer M, Cancel LM, Bartosch, AM, Mathews R, Tarbell JM* (2021) The Glycocalyx core protein Glypican 1 protects vessel wall endothelial cells from stiffness-mediated dysfunction and disease. Cardiovasc Res 117(6): 1592–1605. https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa201
29. *Yen W, Cai B, Yang J, Zhang L, Zeng M, Tarbell JM, Fu BM* (2015) Endothelial surface glycocalyx can regulate flow-induced nitric oxide production in microvessels in vivo. PLoS One 10(1): 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117133
30. *Zeng Y* (2017) Endothelial glycocalyx as a critical signalling platform integrating the extracellular hemodynamic forces and chemical signalling. J Cell Mol Med 21(8): 1457–1462. https://doi.org/10.1111/jcmm.13081
31. *Gao L, Lipowsky HH* (2010) Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its Thickness and diffusion of small solutes. Microvasc Res 80(3): 394–401. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.06.005
32. *Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, Chen Z* (2011) Matrix metalloproteinase-2 and –9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood- brain barrier by disrupting tight junction proteins. PLoS One 6 (8): e20599. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020599
33. *Cao R-N, Li T, Zhong-Yuan X, Rui X* (2019) Endothelial glycocalyx as a potential therapeutic target in organ injuries. Chin Med J (Engl) Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health) 132(8): 963–975. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000177
34. *Lennon FE, Singleton PA* (2011) Hyaluronan regulation of vascular integrity. Am J Cardiovasc Dis 1(3): 200–213.
35. *Lipowsky HH* (2012) The Endothelial Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte Adhesion and its Mediation by Extracellular Proteases. Annu Rev Biomed Eng 40(4): 840–848. https://doi.org/10.1007/s10439-011-0427-x
36. *Wolburg H, Lippoldt A* (2002) Tight junctions of the blood- brain barrier: development, composition and regulation. Vasc Pharmacol 38: 323–337. https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00200-8
37. *Nagafuchi A* (2001) Molecular architecture of adherens junctions. Curr Opin Cell Biol 13(5): 600–603. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00257-X
38. *Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M* (2000) Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. J Biol Chem 275(40): 30970–30976. https://doi.org/10.1074/jbc.M003946200
39. *Hatzfeld M* (2005) The p120 family of cell adhesion molecules. Eur J Cell Biol 84(2,3): 205–214. https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2004.12.016
40. *Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, Lyck R, Muller WA, Lassman H, Engelhardt B* (2019) PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular t-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. Front Immunol 10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00711
41. *Andjelkovic AV, Stamatovic SM, Martinez-Revollar G, Keep RF, Phillips CM* (2020) Modeling blood-brain barrier pathology in cerebrovascular disease in vitro: current and future paradigms. Fluids and Barriers of the CNS 17(1): 44. https://doi.org/10.1186/s12987-020-00202-7
42. *Nusrat A, Brown GT, Tom J, Drake A, Bui TT, Quan C, Mrsny RJ* (2005) Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin.

Mol Biol Cell 16(4): 1725–1734.
https://doi.org/10.1091/MBC.E04-06-0465
43. *Van Itallie CM, Anderson JM* (2004) The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. Proc Am Thorac Soc 1(1): 38–41.
https://doi.org/10.1513/pats.2306013
44. *Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N* (2004) Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. Exp Cell Res 300(1): 202–212.
https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2004.07.012
45. *Matter K, Balda MS* (2003) Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. J Cell Biol 161(3): 459–460.
https://doi.org/10.1083/jcb.200304039
46. *Belanger M, Asashima T, Ohtsuki S, Yamaguchi H, Ito S, Terasaki T* (2007) Hyperammonemia induces transport of taurine and creatine and suppresses claudin-12 gene expression in brain capillary endothelial cells in vitro. Neurochem Int 50(1): 95–101.
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.07.005
47. *Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T* (2007) Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. J Cell Physiol 210(1): 81–86.
https://doi.org/10.1007/s00441-005-1101-0
48. *Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Małecki A* (2008) Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. Pharmacol Rep 60(5): 600–622. PMID: 19066407
49. *Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick- Jones J, Shore D, Citi S* (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. J Cell Biol 147(7): 1569–1582.
https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1569
50. *Tiwari SB, Amiji MM* (2006) A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. Curr Drug Deliv 3(2): 219–232.
https://doi.org/10.2174/156720106776359230
51. *Meyer TN, Hunt J, Schwesinger C, Denker BM* (2003) Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases. Am J Physiol Cell Physiol 285(5): C1281–C1293.
https://doi.org/10.1152/ajpcell.00548.2002
52. *Van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP* (2002) Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. J Anat 200(6): 549–560.
https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00047_7.x
53. *Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW* (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. Blood 106(2): 584–592.
https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4942
54. *Гончаров НВ, Попова ПИ, Головкин АС, Залуцкая НМ, Пальчикова ЕИ, Занин КВ, Авдонин ПВ* (2020) Дисфункция эндотелия сосудов-патогенетический фактор в развитии нейродегенеративных заболеваний и когнитивных расстройств. Обозрение психиатр и мед психол им ВМ Бехтерева 3: 11–26. [*Goncharov NV, Popova PI, Golovkin AS, Zaluckaya NM, Pal'chikova EI, Zanin KV, Avdonin PV* (2020) Vascular endothelial dysfunction is a pathogenetic factor in the development of neurodegenerative diseases and cognitive disorders. Rev Psych Med Psychol named after VM Bekhterev 3: 11–26. (In Russ)].
https://doi.org/10.31363/2313-7053-2020-3-11-26
55. *Надеев АД, Кудрявцев ИВ, Серебрякова МК, Авдонин ПВ, Зинченко ВП, Гончаров НВ* (2015) Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода. Цитология 57(12): 909–916. [*Nadeev AD, Kudryavtsev IV, Serebriakova MK, Avdonin PV, Zinchenko VP, Goncharov NV* (2015) Dual Proapoptotic and pronecrotic effect of hydrogen peroxide on human umbilical vein endothelial cells. Citologia 57(12): 909–916. (In Russ)].
56. *Li Q, Syrovets T, Simmet T, Ding J, Xu J, Chen W, Zhu D, Gao P* (2013) Plasmin induces intercellular adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells via nuclear factor-κB/mitogen-activated protein kinases-dependent pathways. Exp Biol Med 238(2): 176–186.
https://doi.org/10.1177/1535370212473700
57. *Hodo TW, de Aquino MTP, Shimamoto A, Shanker A* (2020) Critical neurotransmitters in the neuroimmune network. Front Immunol 11(JUN): 1869.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01869
58. *Kuvacheva NV, Morgun AV, Malinovskaya NA, Gorina YV, Khilazheva ED, Pozhilenkova EA, Panina YA, Boytsova EB, Ruzaeva VA, Trufanova LV, Salmina AB* (2016) Tight Junction Proteins of Cerebral Endothelial Cells in Early Postnatal Development. Cell Tissue Biol 10: 372–377.
https://doi.org/10.1134/S1990519X16050084
59. *Erickson MA, Wilson ML, Banks WA* (2020) In vitro modeling of blood-brain barrier and interface functions in neuroimmune communication. Fluids Barr CNS 17: 26.
https://doi.org/10.1186/s12987-020-00187-3

60. *Yang AC, Stevens MY, Chen MB, Lee DP, Stähli D, Gate D, Contrepois K, Chen W, Iram T, Zhang L, Vest RT, Chaney A, Lehallier B, Olsson N, Bois H, Hsieh R, Cropper HC, Berdnik D, Li L, Wang EY, Traber GM, Bertozzi CR, Luo J, Snyder MP, Elias JE, Quake SR, James ML, Wyss-Coray T* (2020) Physiological blood–brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. Nature 583(7816): 425–430.
https://doi.org/10.1038/s41586-020-2453-z
61. *Kaplan L, Chow BW, Gu C* (2020) Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling. Nat Rev Neurosci 21: 416–432.
https://doi.org/10.1038/s41583-020-0322-2
62. *Luis A-M, Muge Y, Turgay D* (2021) Pericyte morphology and function. Hystol Histopathol 36(6): 18314.
https://doi.org/10.14670/HH-18-314
63. *Блинов ДВ* (2014) Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболеваний ЦНС. Часть 2: функции и механизмы гематоэнцефалического барьера. Эпилепсия и пароксизмальн состояния 6(1): 70–84. [*Blinov DV* (2014) Modern ideas about the role of violation of the resistance of the blood-brain barrier in the pathogenesis of CNS diseases. Part 2: Functions and mechanisms of the blood-brain barrier. Epilepsy and Paroxysmal States 6(1): 70–84. (In Russ)].
64. *Komleva Y, Kuvacheva NV, Malinovskaya NA, Gorina YV, Lopatina OL, Teplyashina EA, Pozhilenkova EA, Zamay AS, Morgun AJ, Salmina AB* (2016). Regenerative potential of the brain: Composition and forming of regulatory microenvironment in neurogenic niches. Human Physiol 42: 865–873.
https://doi.org/10.1134/s0362119716080077
65. *Mesnil M, Defamie N, Naus C, Sarrouilhe D* (2021) Brain disorders and chemical pollutants: a gap junction link? Biomolecules 11(1): 51.
https://doi.org/10.3390/biom11010051
66. *Salmina AB, Kapkaeva MR, Vetchinova AS, Illarioshkin SN* (2021) Novel approaches used to examine and control neurogenesis in Parkinson's decease. Int J Mol Sci 22(17).
https://doi.org/10.3390/ijms22179608
67. *Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Komleva YK, Salmin VV, Salmina AB* (2017) Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. Rev Neurosci 28(4): 397–415.
https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0071
68. *Erdő F, Denes L, de Lange E* (2017) Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review. J Cerebral Blood Flow & Metabolism 37(1): 4–24.
https://doi.org/10.1177/0271678X16679420
69. *Горбачев ВИ, Маньков АВ, Христенко ИВ, Капустина АВ* (2006) О некоторых механизмах гомеостаза центральной нервной системы. Acta Biomed Scient 5(51): 52–54. [*Gorbachev VI, Man'kov AV, Hristenko IV, Kapustina AV* (2006) About some mechanisms of homeostasis of the central nervous system. Acta Biomed Scient 5(51): 52–54. (In Russ)].
70. *Morris ME, Rodriguez-Cruz V, Felmlee MA* (2017) SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. The AAPS J 19(5): 1317–1331.
https://doi.org/10.1208/s12248-017-0110-8
71. *Girardin F* (2006) Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development. Dialogues Clin Neurosci 8(3): 311–321.
https://doi.org/10.31887/dcns.2006.8.3/fgirardin
72. *Моргун АВ* (2012) Основные функции гематоэнцефалического барьера. Сибирск мед журн 109(2): 5–7. [*Morgun AV* (2012) The main functions of the blood-brain barrier. Siber Med J 109(2): 5–7. (In Russ)].
73. *Freeman MR* (2010) Specification and Morphogenesis of Astrocytes. Science 330(6005): 774–778.
https://doi.org/10.1126/science.1190928
74. *Мизиряк ЕВ, Кривошапкин АЛ, Педдер ВВ, Бгатова НП, Котлярова АА* (2019) Морфофункциональные особенности гематоэнцефалического барьера и возможные пути его обхода с помощью физических и физико-химических факторов (обзор). Южно-Сибирск научн вестн 4(28) 2: 45–51. [*Miziryak EV, Krivoshapkin AL, Pedder VV, Bgatova NP, Kotlyarova AA* (2019) Morphofunctional features of the hemato-encephalic barrier and possible ways to bypass it with the help of physical and physico-chemical factors (review). South Siber Scient Bull 4(28) 2: 45–51. (In Russ)].
https://doi.org/10.25699/SSSB.2019.28.48974
75. *Аляутдин РН* (2012) Транспорт лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер: линия мажино или волшебный сезам? Мол мед 3: 3–12 [*Alyautdin RN* (2012) Drugs targeting through the blood-brain barrier: Maginot line or magic sesame? Mol Med 3: 3–12. (In Russ)].
76. *Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, Gu C* (2014) Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. Nature 509(7501): 507–511.
https://doi.org/10.1038/nature13324

77. *Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, Deik AA, Ginty DD, Clish CB, Gu C* (2017) Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis. Neuron 94(3): 581–594. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.043
78. *Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV* (2015) Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. Cell 163(5): 1064–1078. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067
79. *Doherty GJ, McMahon HT* (2009) Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem 78: 857–902. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540
80. *Leite DM, Matias D, Battaglia G* (2020) The Role of BAR Proteins and the Glycocalyx in Brain Endothelium Transcytosis. Cells 9 (12): E2685. https://doi.org/10.3390/cells9122685
81. *Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P* (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. Nat Cell Biol 1: 33–39. https://doi.org/10.1038/9004
82. *Slepnev VI, Ochoa G, Butler MH, De Camilli P* (2000) Tandem Arrangement of the Clathrin and AP-2 Binding Domains in Amphiphysin 1 and Disruption of Clathrin Coat Function by Amphiphysin Fragments Comprising These Sites. J Biol Chem 275(23): 17583–17589. https://doi.org/10.1074/jbc.M910430199
83. *Villasenor R, Schilling M, Sundaresan J, Lutz Y, Collin L* (2017) Sorting Tubules Regulate Blood-Brain Barrier Transcytosis. Cell Rep 21(11): 3256–3270. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.055
84. *Tian X, Leite DM, Scarpa E, Nyberg S, Fullstone G, Forth J, Matias D, Apriceno A, Poma A, Duro-Castano A, Vuyyuru M, Harker-Kirschneck L, Šarić A, Zhang Z, Xiang P, Fang B, Tian Y, Luo L, Rizzello L, Battaglia G* (2020) On the shuttling across the blood-brain barrier via tubule formation: Mechanism and cargo avidity bias. Sci Adv 6: eabc4397. https://doi.org/10.1101/2020.04.04.025866
85. *Senju Y, Itoh Y, Takano K, Hamada S, Suetsugu S* (2011) Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. J Cell Sci 124(12): 2032–2040. https://doi.org/10.1242/jcs.086264
86. *Hansen CG, Howard G, Nichols BJ* (2011) Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. J Cell Sci 124 (16): 2777–2785. https://doi.org/10.1242/jcs.084319
87. *Chandrasekaran R, Kenworthy AK, Lacy DB* (2016) Clostridium difficile Toxin A Undergoes Clathrin-Independent, PACSIN2-Dependent Endocytosis. PLoS Pathog 12. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006070
88. *De Kreuk B, Anthony EC, Geerts D, Hordijk PL* (2012) The F-BAR Protein PACSIN2 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Internalization. J Biol Chem 287(52): 43438–43453. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391078
89. *Verkman AS* (2011) Aquaporins at a glance. J Cell Sci 124(13): 2107–2112. https://doi.org/10.1242/jcs.079467
90. *Щепарева МЕ, Захарова МН* (2020) Роль аквапоринов в функционировании нервной системы в норме и при патологии. Нейрохимия 37(1): 5–14 [*Shchepareva ME, Zaharova MN* (2020) The role of aquaporins in the functioning of the nervous system in normal and pathological conditions. Neurochemistry 37(1): 5–14. (In Russ)].
91. *Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S* (2002) Increased aquaporin I water channel expression in human brain tumors. Brain J Cancer 87(6): 621–623. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600512

Morphological and Histophysiological Features of the Brain Capillaries Endothelium

A. V. Egorova[b, *], T. I. Baranich[a, b], A. V. Brydun[a, b], V. V. Glinkina[b], and V. S. Sukhorukov[a, b]

[a] *Reserch Center of Neurology, Moscow, Russia*

[b] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

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

This review considers modern ideas about the features of the morphology and histophysiology of the brain capillaries endotheliocytes. Particular attention is paid to the ultramicroscopic structure of endothelial cells, which are part of the neurovascular unit. The relationship between their main characteristics and the realization of the barrier function is discussed. The specifics of intercellular contacts in capillary endotheliocytes as part of the blood-brain barrier, the structure of their cytoskeleton and glycocalyx were analyzed.

The features of the capillaries structure in the neurogenic niches, as well as in anatomical structures where the blood-brain barrier is absent or weakly expressed, are considered. A separate part of the review is devoted to the transport of substances in brain endotheliocytes. An analysis of modern sources of information made it possible to establish that, despite a significant number of publications devoted to the description of endothelial cells of cerebral microvessels, a number of questions remain unexplored, and the study of structural features and functioning of the cerebral endothelium does not lose its relevance.

Keywords: cerebral endotheliocytes, brain capillaries, neurovascular unit

EDN: TDITXD
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 579–593

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРКАПНИИ И ГИПОКСИИ НА ФИЗИОЛОГИЮ И МЕТАБОЛИЗМ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНДОТЕЛИЯ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ

© 2022 г. П. П. Трегуб[1, 2, *]

[1]*Научный центр неврологии, Москва, Россия*

[2]*Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 20.02.2022 г.
После доработки 06.04.2022 г.
Принята к публикации 07.04.2022 г.

В настоящем обзоре приведены данные относительно роли дисфункции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при неврологической патологии, описание эпигенетических и метаболических регуляторов его функциональной активности и структурной целостности. Также обзор содержит информацию об экспериментальных результатах исследований нейропротекторных эффектов гипоксии и гиперкапнии с оценкой их влияния на функционирование ГЭБ. Кроме того, в обзоре приводятся аргументы в пользу комбинированного использования препаратов, модулирующих метаболизм и проницаемость ГЭБ, в сочетании с гиперкапнической гипоксией для достижения большей нейропротекторной эффективности. Приведенные данные демонстрируют, что существует значительное количество препаратов, обладающих высоким потенциалом для повышения нейропротекторной эффективности при сочетании с гиперкапнической гипоксией. К таким группам препаратов относятся антиоксиданты, эндотелио- и мембранопротекторы, ингибиторы c-Jun N-терминальных киназ (JNK) и энерготропные препараты.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, гиперкапния, гипоксия, церебральный эндотелий, нейропротекция

DOI: 10.31857/S0869813922050120

Пермиссивная гиперкапния и ее сочетание с перемежающейся гипоксией формируют эффект увеличения толерантности головного мозга к ишемии [1]. Однако механизмы и сигнальные пути нейропротекторной эффективности гиперкапнии и ее сочетания с дефицитом кислорода на сегодняшний день исследованы мало.

Между тем, одним из таких механизмов может выступать сохранение функциональной активности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), т.к. поддержание целостности ГЭБ является значимым нейропротекторным звеном в структуре формирования ишемической толерантности головного мозга [2]. При этом нарушение целостности ГЭБ является ранним признаком ишемического повреждения мозга и выступает прогностическим фактором неблагоприятного исхода [3].

Функциональная активность ГЭБ, главным образом, зависит от поддержания его стабильного метаболизма, целостности и избирательной проницаемости [4]. Эти элементы, в свою очередь, регулируются целым рядом гуморальных, нейротрофических и эпигенетических сигнальных механизмов [5].

В настоящем обзоре приведены данные относительно роли дисфункции ГЭБ при неврологической патологии, описание эпигенетических и метаболических регуляторов его функциональной активности и структурной целостности. Также обзор содержит информацию об экспериментальных результатах исследований нейропротекторных эффектов гипоксии и гиперкапнии с оценкой их влияния на функционирование ГЭБ. Кроме того, в обзоре приводятся аргументы в пользу комбинированного использования препаратов, модулирующих метаболизм и проницаемость ГЭБ, в сочетании с гиперкапнической гипоксией для достижения большей нейропротекторной эффективности.

РОЛЬ ДИСФУНКЦИИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В РАЗВИТИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

ГЭБ – сложная и неоднородная система головного мозга с многоуровневым избирательным транспортом, необходимая для поддержки регуляции и защиты центральной нервной системы (ЦНС). Структурную основу ГЭБ составляют эндотелиальные клетки, астроциты и перициты. Эндотелиальные клетки церебральных сосудов связаны между собой плотными контактами. Это имеет важное значение для реализации главной функции ГЭБ – поддержания гомеостаза мозга и защиты нервной ткани от циркулирующих в крови токсинов, микроорганизмов, гуморальных и клеточных факторов иммунной системы, воспринимающих ткань мозга как чужеродную [6, 7].

Исследователи подчеркивают роль дисфункции ГЭБ при развитии различных неврологических заболеваний. Например, при посттравматическом исследовании резецированной церебральной ткани и мозга у пациентов с фармакочувствительной и резистентной эпилепсией [8] выявлено, что имеется четко локализованная избыточная экспрессия Р-гликопротеина в эпилептогенном гиппокампе у больных с лекарственно устойчивой эпилепсией. Авторы считают, что на фоне хронического течения эпилепсии развивается воспаление в церебральной сосудистой сети, повышается проницаемость ГЭБ и экспрессия Р-гликопротеина.

В современных исследованиях показано, что эпилептические приступы могут индуцировать повышенную проницаемость ГЭБ для цитокинов, оказывающих влияние на патогенез и ход эпилепсии [9]. У интерлейкина-1β, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли α (TNFα) были зарегистрированы проконвульсивные и противосудорожные эффекты, зависимые от концентрации свободных и доступных рецепторов. Судороги не только индуцировали экспрессию цитокинов в головном мозге, но и увеличивали их периферический уровень на фоне генерализованных тоникоклонических или продолжительных парциальных приступов, возвращаясь к исходному уровню после разных интервалов времени.

Установлена многоуровневая система химической регуляции гомеостаза в ткани головного мозга, повышающая защиту нейронов от стресса и повреждения, а также роль многочисленных ростовых и нейротрофических факторов в репаративных процессах, во многом определяющих исходы и прогноз гипоксического поражения мозга [10, 11].

Отмечается, что повышение проницаемости ГЭБ в условиях хронической гипоксии/ишемии мозга в пери- и неонатальном периоде может выступать одним из факторов прогрессирования нейродегенеративных процессов, возникающих из-за поступления в периферический кровоток забарьерных антигенов с последующим иммунным ответом и дисфункцией протеолитических и нейромедиаторных систем [12, 13].

Нарушение целостности и проницаемости ГЭБ является важным элементом в патогенезе гипоксического/ишемического и инфекционного поражения головно-

го мозга [14]. Однако особенности функционирования ГЭБ при нарушениях развития головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях изучены существенно меньше. При этом исследование молекулярных механизмов этих особенностей выступает не только важным шагом в понимании патогенеза заболеваний, но и перспективным направлением для повышения эффективности фармакотерапии. Так, недавно появились убедительные экспериментальные свидетельства о нарушении структуры тесных контактов и дизрегуляции белков-транспортеров ГЭБ при таких нарушениях развития головного мозга, как аутизм, шизофрения, эпилепсия, а также нейродегенеративных состояниях (болезни Альцгеймера и Паркинсона) [15].

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ФУНКЦИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНДОТЕЛИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Эпигенетические факторы, обуславливающие метилирование ДНК и ремоделирование гистонов, важны для нормального развития мозга в онтогенезе [16]. Они подвержены регулирующему влиянию гипоксического стимула, который может вызвать как повреждающий эффект, так и эффект прекондиционирования [17]. Если стимул является избыточным и/или длительным, то это вызывает наступление гипоксически-ишемическое поражение мозга и определяет будущие неврологические расстройства.

Показано, что блокирование гистондеацетилазы в культуре микроглии оказывает защитное действие на олигодендроциты после экспериментальной гипоксии-ишемии [18]. При этом фракция M1 подавляет активность олигодендроцитов, а M2 ее усиливает и позволяет снижать экспрессию провоспалительных факторов и снижать экспрессию противовоспалительных цитокинов. Метилирование и деметилирование происходит при участии большого количества ферментов, в т.ч. гистонацетилтрансфераз, деацетилатов, гистоновых метилтрансфераз и деметилаз [19, 20]. Эти процессы способствуют модулированию транскрипции в ответ на эндогенные и экзогенные факторы, такие как гипоксия и воспаление [21]. В моделях *in vivo* показано, что при экспериментальной гипоксии/ишемии в неонатальном периоде возрастает экспрессия каспазы-3, снижается экспрессия синапсина и ингибируется метилирование гистонов H3K4me2/-me3 и H3K27me2/-me3, что вызывает индукцию нейронального апоптоза в гиппокампе [23].

В настоящее время наиболее существенными факторами эпигенетического влияния являются микроРНК – небольшие некодирующие РНК, обеспечивающие посттранскрипционную модуляцию экспрессии генов [24]. Эти молекулы играют важную роль в онтогенетическом развитии мозга и патогенезе неврологических заболеваний, в том числе ишемического инсульта [25]. При этом ГЭБ рассматривается в качестве мишени для патогенетических факторов [26]. При гипоксии-ишемии нарушение структуры и организации этих белков в наружной мембране эндотелиальных клеток обуславливает нарушение проницаемости церебрального эндотелия [27]. Повышенная адгезия иммунных клеток к поврежденному эндотелию, в том числе, обуславливает их инфильтрацию в окружающую ткань [28].

Доказано, что деградация ГЭБ повышает риск раннего инсульта, а ее блокирование обеспечивает защиту паренхимы головного мозга [29]. Деградация белков плотных контактов, или белков клеточной адгезии, под действием металлопротеиназы (MMP) напрямую регулируется микроРНК. MiR-539 напрямую ингибирует экспрессию MMP-9 и защищает эндотелиальные клетки от экспериментальной ишемии, предотвращая повышение проницаемости ГЭБ [30]. MiR-143 активируется после ишемического инсульта, что было показано в исследованиях на человеке и животных [31, 32].

Некоторые микроРНК могут защищать целостность ГЭБ за счет снижения адгезии иммунных клеток и экспрессии провоспалительных цитокинов. Например, miR-210 активирует экспрессию ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и хемокиновые лиганды CCL1 и CCL2, связанные с провоспалительным ответом в модели ишемического инсульта у мышей [33], а сверхэкспрессия miR-126-3p и -5p в ишемизированном мозге мышей подавляет провоспалительные цитокины и молекулы адгезии, сохраняя целостность церебрального эндотелия, и снижает негативные последствия после перенесенного инсульта [34, 35]. Напротив, miR-34a активируется в эндотелиальных клетках после эпизода острой гипоксии-ишемии, что отрицательно влияет на функцию митохондрий в эндотелиоцитах, воздействуя на цитохром С. При этом нокаутирование miR-34a снижает проницаемость ГЭБ, выраженность нарушений плотных межклеточных контактов и улучшает исходы инсульта [36, 37].

MiR-26b ингибирует аутофагию и выживание эндотелиоцитов при экспериментальной гипоксии/ишемии *in vitro*, а длинная некодирующая РНК Malat1, связывая miR-26b, оказывает обратное действие [38]. МикроРНК miR-15a активируется в церебральном эндотелии мышей после острого кислородно-глюкозного голодания, вызывает гибель клеток и ингибируется через активацию δ-рецептора под воздействием пролифератора пероксисом PPAR, который выступает потенциальным нейропротектором при ишемическом инсульте [39]. Главное значение в сохранении проницаемости ГЭБ принадлежит эндотелию и, в меньшей степени, перицитам. Показано, что при гипоксически-ишемическом поражении перициты отделяются и мигрируют от базальной мембраны, способствуя повышению проницаемости. Данный процесс индуцируется под действием miR-149-5p [40].

MiR-210 признана одним из важнейших регуляторов неонатальной гипоксии-ишемии [41]. Эта микроРНК активирована при неонатальной гипотрофии, а острая гипоксия-ишемия приводит к усилению сверхэкспрессии miR-210, что увеличивает проницаемость ГЭБ за счет ингибирования экспрессии окклюдина и β-катенина [42]. Сообщалось, что miR-210 проявляет широкий спектр биологической активности, включающей митохондриальный обмен и дифференцировку клеток [43]. В норме сверхэкспрессия miR-210 способствует ангиогенезу и нейрогенезу [44]. Она обуславливает защитный эффект при ишемическом инсульте и способствует накоплению нервных клеток-предшественников вокруг периинфарктной области [45, 46]. Другие микроРНК (miR-21, miR-374a, miR-424, miR-199a и miR-20b) также могут играть роль в патогенезе гипоксически-ишемического поражения головного мозга [47—50].

ЦЕЛОСТНОСТЬ ГЭБ КАК ФАКТОР ИШЕМИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

ГЭБ анатомически определяется тесными соединениями между соседними эндотелиальными клетками, выстилающими просвет микрососудов мозга, но в структуру ГЭБ также входят астроциты, перициты, нейроны и внеклеточный матрикс [51]. Последний представляет собой базальную мембрану, лежащую в основе сосудистой сети, и ее нарушения тесно связаны с повышенной проницаемостью ГЭБ в патологическом состоянии. При этом нарушение целостности ГЭБ с последующим вазогенным отеком является ранним признаком ишемического повреждения мозга и выступает ранним прогностическим фактором неблагоприятного исхода [52].

Несколько исследований показали, что ишемическая толерантность способствует сохранности ГЭБ и сокращает образование отека во время контрольной ишемии. Прекондиционирование, вызванное 15-минутной окклюзией средней мозговой артерии и проведенное за три дня до тестовой ишемии у крыс, сокращало

и нарушение целостности ГЭБ и отек в периинфарктной зоне, но не в ядре ишемии, что было измерено после 24-часовой окклюзии [53]. Позднее это было подтверждено Zhang и соавт. [54] во время эксперимента, когда молодых крыс подвергали 2-часовой гипоксии/ишемии, транссудация IgG как признак нарушения целостности ГЭБ была связана с ранним повреждением нейронов, и оба этих неблагоприятных эффекта значительно ослаблялись после гипертермического прекондиционирования [55]. И опять же, сложно определить, приводила ли сохранность целостности ГЭБ к уменьшению ишемического повреждения или являлась его последствием. С механистической точки зрения совершенно ясно, что уменьшение воспалительной реактивности головного мозга, вероятно, способствует сохранению целостности ГЭБ [5, 9, 33]. Тем не менее, сохранение целостности ГЭБ может быть главной чертой ишемической толерантности, принимая во внимание взаимодействие между поврежденной/уязвимой тканью и циркуляцией воспалительных клеток во время рециркуляции.

Известно, что матриксные металлопротеиназы (ММП), в особенности ММП-9, разрушают нейроваскулярный матрикс в результате реперфузии, приводя, таким образом, к разрушению ГЭБ [56, 57]. Было показано, что нарушение целостности ГЭБ, наряду с экспрессией ММП-9, уменьшалось после экспериментальной ишемии у крыс, при этом ишемии предшествовало ишемическое прекондиционирование [58]; полученные данные связываются авторами с влиянием белка теплового шока с молекулярной массой 70 килодальтон (HSP70), сверхэкспрессия которого подавляет ММП-9.

Адгезионные молекулы, выделяемые клетками эндотелия (например, ICAM-1), опосредуют прочное прилипание лейкоцитов к выстилке сосудов и также запускают сигнальные каскады, которые способствуют увеличению проницаемости ГЭБ и лейкоцитарной инфильтрации [59]. Повышенная экспрессия ICAM-1 клетками церебрального эндотелия наблюдалась во время ишемии/реперфузии в моделях *in vivo* и *in vitro* [60, 61]. Прекондиционирование в культуре эндотелиальных клеток сокращало их ответную воспалительную реакцию и полностью блокировало повышенные уровни ICAM-1, индуцируемые посредством ФНО-α [62]. Данные, подтверждающие эти результаты, были получены с гипоксическим прекондиционированием, которое также ингибировало адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам, вызванную гипоксией/реоксигенацией [63].

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНДОТЕЛИЯ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ/ГИПЕРКАПНИИ

Регуляция метаболизма в клетках, входящих в структуру ГЭБ, подвержена влиянию как гуморальных факторов, присутствующих в периферическом кровотоке, так и молекулярно-клеточных сигнальных систем, влияющих на церебральный эндотелий [64]. Особенно важным это становится в условиях гипоксии и ишемии тканей головного мозга.

Важная роль в метаболическом регулировании церебрального эндотелия отведена продукции и межклеточному транспорту лактата [65], а также его утилизации из окружающей ткани и системного кровотока, что имеет место при развитии ишемического повреждения [66]. При этом продукция лактата тесно связана с редокс-состоянием клеток, в частности соотношением НАД$^+$/НАДН в митохондриях [67]. Кроме того, в условиях высокой потребности в энергопродукции, сформированной кислородно-глюкозной депривацией, активируются процессы митохондриального биогенеза [68]. Этот процесс стимулируется коактиватором 1α-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PGC-1) и АМФ-активируемой про-

теинкиназой (AMPK) [69], а ингибируется индуцируемым гипоксией фактором 1 (HIF-1) [70].

Многие события при межклеточных взаимодействиях на уровне ГЭБ определяются активностью транскрипционного фактора HIF-1, опосредующего ответ клеток на гипоксию [71]. Известно, что HIF-1-индуцируемые реакции энергетического обмена находят свое отражение в изменении процессов гликолиза, аккумуляции лактата и изменении характера нейрон-астроглиального метаболического сопряжения [72]. В числе генов, контролируемых HIF-1, входят гены, кодирующие фактор 1 из стромальных клеток (SDF-1), ферменты гликолиза, переносчики глюкозы и лактата, что необходимо для обеспечения функционирования клеток в условиях острой или хронической гипоксии [51].

В наших работах показана стимулирующая роль в отношении HIF-1 не только со стороны гипоксии, но и пермиссивной гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии [73, 74]. Эти обстоятельства также могут свидетельствовать в пользу положительного индуцирующего влияния перемежающей гиперкапнии в сочетании с гипоксией на метаболизм клеток церебрального эндотелия.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРКАПНИИ И ГИПОКСИИ НА СОХРАНЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ И ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЭБ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ

Результаты одного из наших исследований свидетельствуют в пользу того, что снижение проницаемости ГЭБ после сочетанного воздействия перемежающей гиперкапнии и гипоксии является вероятным механизмом для формирования ишемической толерантности головного мозга [75]. В пользу нейропротекторной эффективности этого механизма также выступают результаты исследования, демонстрирующие положительное влияние 3-часовой пермиссивной гиперкапнии (80 и 100 мм Hg), предварительное воздействие которой вызывало сохранение целостности ГЭБ при травматическом повреждении головного мозга [76]. Вероятными элементами сигнального пути в механизме снижения проницаемости ГЭБ после перемежающего воздействия гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии могут выступать усиление пролиферации эндотелиальных клеток [77], супрессия белка аквапорина-4 и ингибирование апоптоза в клетках церебрального эндотелия [78].

Гипоксическое прекондиционирование вызывает снижение проницаемости ГЭБ, что, как правило, в дальнейшем оказывает защитный эффект на его целостность в условиях последующего ишемического повреждения [2]. Некоторые авторы связывают этот механизм с модуляцией белков плотных соединений сфингозинкиназой-2, окклюдина и ZO-1 [79, 80]. При этом гипоксическое прекондиционирование ингибирует адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам [63], а повышение уровня HIF-1α после гипоксии стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов ГЭБ [3]. Все эти факторы также должны благоприятно способствовать функционированию ГЭБ в условиях ишемии.

Учитывая, что изолированное воздействие перемежающей пермиссивной гиперкапнии, а также ее сочетание с гипоксией снижают степень проницаемости ГЭБ, можно предположить, что оба эти компонента оказывают влияние на нейропротекторный механизм, активируя разные сигнальные пути [75].

Необходимо также отметить, что существуют данные, которые демонстрируют отрицательное влияние гипоксического прекондиционирования на целостность ГЭБ [81]. Показано, что кратковременное гипоксическое воздействие усиливает проницаемость ГЭБ через сигнальный путь, опосредованный фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), что повышает вероятность усугубления отека мозга при церебральной ишемии. Однако стоит принимать во внимание, что в данной работе авторы концентрируются на кратковременных вазогенных эффектах гипоксиче-

ского прекондиционирования и их влияния на проницаемость ГЭБ, отождествляя их с характеристиками его целостности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ, МОДУЛИРУЮЩИХ МЕТАБОЛИЗМ И ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЭБ В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЕЙ

Использование воздействий перемежающей гиперкапнической гипоксии, несмотря на их высокую нейропротекторную эффективность, имеет существенные ограничения для использования в клинической практике. Это связано с достижением значимого протекторного эффекта от респираторного воздействия не ранее, чем через 7 сеансов 30-минутных тренировок [82]. Перспективным вариантом для потенцирования защитной эффективности респираторных тренировок представляется комбинация гиперкапнически-гипоксических воздействий с фармакологическими активаторами базовых нейропротекторных механизмов [83]. К таким механизмам, в контексте данного обзора, можно отнести поддержание метаболизма и проницаемости ГЭБ.

На основании данных о нейропротекторных механизмах, реализуемых посредством модулирования функционального состояния ГЭБ, можно выделить сигнальные пути, дополнительная стимуляция которых имеет потенциал для усиления защитных эффектов при сочетании с респираторными гиперкапнически-гипоксическими воздействиями. Очевидно, что высоким потенциалом для потенцирования эффективности воздействий гиперкапнической гипоксии могут быть препараты, обладающие антиоксидантной эффективностью и оказывающими эндотелиопроективный эффект [84]. Например, аскорбиновая кислота (витамин С) и α-токоферол (витамин Е) [85], ретинол (витамин А) [86].

Перспективным направлением с точки зрения положительного влияния на гемореологию крови, провоспалительные факторы и нормализацию показателей NO-продуцирующей системы является использование производных 3-оксипиридина [87]. У этих соединений обнаружено свойство восстанавливать NO-продуцирующую функцию эндотелия, улучшать эндотелий-зависимую и эндотелий-независимую вазодилатацию в клинических условиях. Так, на фоне гипотензивного и кардиопротекторного свойств этилметилгидроксипиридина сукцинат в сочетании с гиперкапнической гипоксией оказывает выраженное позитивное влияние на гемореологию [88]. Кроме того, эти препараты оказывают мощное мембранопротекторное действие, повышают активность антиоксидантных ферментов, поддерживают процесс окислительного фосфорилирования в условиях гипоксии и активируют энергопродукцию в митохондриях в результате увеличения доставки и потребления клетками сукцината [89, 90].

Высокий потенциал для усиления защитных эффектов гиперкапнической гипоксии имеет игнибирование c-Jun N-терминальных киназ (JNK) при использовании синтетических препаратов (например, IQ-1), которые оказывают выраженный кардио- и нейропротекторный эффект [91, 92]. Принимая во внимание, что гиперкапническая гипоксия активирует сигнальные пути нейропротекции, не связанные напрямую с ингибированием пируватдегидрогеназы, можно ожидать, что комбинация респираторного воздействия с препаратами-ингибиторами JNK будет обладать большим нейропротекторным потенциалом, чем их изолированное применение. Кроме того, на основании данных о том, что JNK репрограммирует метаболизм митохондрий на гликолитическую продукцию лактата посредством фосфорилирования пируватдегидрогеназы (PDH) [93], можно предположить, что нейропротекторные свойства ингибиторов JNK могут быть опосредованы повы-

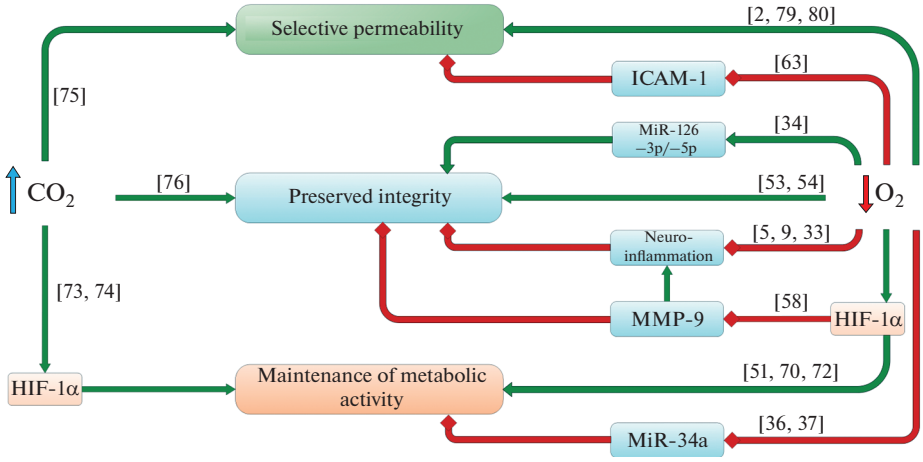

Рис. 1. Воздействие пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии на сигнальные пути, регулирующие структурную целостность ГЭБ, его ограниченную проницаемость и метаболическую активность. Красные линии – ингибирование; зеленые линии – активация/индукция. В квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

шением активности PDH и изменением уровня НАД$^+$ в клетках эндотелия ГЭБ с модуляцией его проницаемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структура ГЭБ в условиях гипоксического/ишемического повреждения находится под регуляторным влиянием целого ряда сигнальных систем: эпигенетический механизм молекулярно-клеточного взаимодействия; трофические и мембранные факторы, поддерживающие структурную целостность и ограниченную проницаемость; нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение. При этом на все эти системы, в той или иной степени, можно оказывать нейропротекторное влияние посредством сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии (рис. 1).

Приведенные данные демонстрируют, что существует значительное количество препаратов, обладающих высоким потенциалом для повышения нейропротекторной эффективности при сочетании с гиперкапнической гипоксией. К таким группам препаратов относятся антиоксиданты, эндотелио- и мембранопротекторы, ингибиторы JNK и энерготропные препараты. Вместе с этим, экспериментальных и клинических данных недостаточно для подтверждения эндотелиопротективного действия отдельных фармакологических модуляторов нейропротекторных механизмов, что требует дальнейшего изучения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено за счет средств госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tregub P, Kulikov V, Motin Y, Bespalov A, Osipov I* (2015) Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. J Stroke Cerebrovasc Dis 24(2): 381–387. https://doi.org/101016/jjstrokecerebrovasdis201409003
2. *Obrenovitch TP* (2008) Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. Physiol Rev 88: 211–247. https://doi.org/101152/physrev000392006
3. *Кувачева НВ, Моргун АВ, Хилажева ЕД, Бойцова ЕБ, Рузаева ВА, Шуваев АН, Малиновская НА, Пожиленкова ЕА, Салмина АБ* (2016) Особенности пролиферации клеток гематоэнцефалического барьера при подавлении активности HIF-1 in vitro. Сиб мед обозр 98(2): 51–56. [*Kuvacheva NV, Morgun AV, Khilazheva ED, Boytsova EB, Ruzaeva VA, Shuvaev AN, Malinovskaja NA, Pozhilenkova EA, Salmina AB* (2016) Features of proliferation of bloodbrain barrier cells upon suppression of HIF-1 activity in vitro. Sib Med Rev 98(2): 51–56. (In Russ)].
4. *Бережанская СБ, Лукьянова ЕА, Жаворонкова ТЭ, Каушанская ЕЯ, Созаева ДИ* (2017) Современная концепция структурно-функциональной организации гематоэнцефалического барьера и основные механизмы нарушения его резистентности. Педиатрия Журн им ГН Сперанского 96(1): 135–141. [*Berezhanskaja SB, Luk'janova EA, Zhavoronkova TJe, Kaushanskaja EJa, Sozaeva D*I (2017) Sovremennaja koncepcija strukturno-funkcional'noj organizacii gematojencefalicheskogo bar'era i osnovnye mehanizmy narushenija ego rezistentnosti. Pediatrija Zhurn im GN Speranskogo 96(1): 135–141. (In Russ)].
5. *Салмина АБ, Комлева ЮК, Малиновская НА, Моргун АВ, Тепляшина ЕА, Лопатина ОЛ, Горина ЯВ, Харитонова ЕВ, Хилажева ЕД, Шуваев АН* (2021) Повреждение гематоэнцефалического барьера при стрессе и нейродегенерации: биохимические механизмы и новые модели для трансляционных исследований. Биохимия 86(6): 917–932. [*Salmina AB, Komleva JuK, Malinovskaja NA, Morgun AV, Tepljashina EA, Lopatina OL, Gorina JaV, Haritonova EV, Hilazheva ED, Shuvaev AN* (2021) Povrezhdenie gematojencefalicheskogo bar'era pri stresse i nejrodegeneracii: biohimicheskie mehanizmy i novye modeli dlja transljacionnyh issledovanij. Biochemistry 86(6): 917–932. (In Russ)]. https://doi.org/10.31857/S0320972521060130
6. *Ballabh P, Braun A, Nedergaard M* (2014) The blood-brain barrier: an overview structure, regulation and clinical implications. Neurobiology of Disease 16: 1–13. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016
7. *Tran KA, Zhang X, Predescu D, Huang X, Machado RF, Göthert JR, Malik AB, Valyi-Nagy T, Zhao YY* (2016) Endothelial β-catenin signaling is required for maintaining adult bloodbrain barrier integrity and central nervous system homeostasis. Circulation 133(2):177–186. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982
8. *Liu JY, Thom M, Catarino CB, Martinian L, Figarella-Branger D, Bartolomei F, Koepp M, Sisodiya SM* (2012) Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmaco-resis tance in human epilepsy. Brain 135(10): 3115–3133. https://doi.org/10.1093/brain/aws147
9. *Gang L, Bauer S, Nowak M, Norwood B, Tackenberg B, Rosenow F, Knake S, Oertel WH, Hammer HM* (2011) Cytokines and epilepsy. Seizure-Eur J Epilep 20(3): 249–256. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.12.005
10. *Моргун АВ, Овчаренко НВ, Таранушенко ТЕ, Устинова СИ, Окунева ОС, Антонова СК, Гилязова ДФ, Успенская ОА, Салмина АБ* (2013) Маркеры апоптоза и нейроспецифические белки в диагностике перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденных детей. Сиб мед обозр 3(81): 3–11 [*Morgun AV, Ovcharenko NV, Taranushenko TE, Ustinova SI, Okuneva OS, Antonova SK, Gilyazova DF, Uspenskaya OA, Salmina AB* (2013) Markers of apoptosis and neurospecific proteins in the diagnosis of perinatal lesions of the central nervous system in newborns. Sib Med Rev 3(81): 3–11. (In Russ)].
11. *Кувачева НВ, Салмина АБ, Комлева ЮК, Малиновская НА, Моргун АВ, Пожиленкова ЕА, Замай ГС, Яузина НА, Петрова ММ* (2013) Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 113(4): 80–85. [*Kuvacheva NV, Salmina AB, Komleva YuK, Malinovskaia NA, Morgun AV, Pozhilenkova EA, Zamaĭ GS, Iauzina NA, Petrova MM* (2013) Permeability of the hematoencephalic barrier in normalcy, brain development pathology and neurodegeneration. Zh Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova 113(4): 80–85. (In Russ)].
12. *Чехонин ВП, Лебедев СВ, Блинов ДВ, Гурина ОИ, Семенова АВ, Лазаренко ИП, Петров СВ, Рябухин ИА, Рогаткин СО, Володин НН* (2004) Патогенетическая роль нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейроспецифических белков при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях центральной нервной системы у новорожденных. Вопр гинекол акушер перинат 3(2): 50–61. [*Chekhonin VP, Lebedev SV, BIinov DV, Gurina OI, Semenova AV, Lazarenko IP, Petrov SV, Ryabukhin LA, Rogatkin SO, Volodin NN* (2004) Pathogenetic role of impaired permeability of the blood-brain barrier for neu-

rospecific proteins in perinatal hypoxic-ischemic lesions of the central nervous system in newborns. Vopr Ginecol Akush Perinat 3(2): 50–61. (In Russ)].

13. *Чехонин ВП, Лебедев СВ, Дмитриева ТБ, Блинов ДВ, Гурина ОИ, Семенова АВ, Володин НН* (2003) Иммуноферментный анализ NSE и GFAP, как критерий динамической оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера крыс при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС. Бюлл эксп биол мед 136(9): 299–303 [*Chehonin VP, Lebedev SV, Dmitrieva TB, Blinov DV, Gurina OI, Semenova AV, Volodin NN* (2003) Enzyme immunoassay of NSE and GFAP as a criterion for dynamic assessment of the permeability of the blood-brain barrier of rats with perinatal hypoxic-ischemic CNS lesion. Bull Exp Biol Med 136 (9): 299–303. (In Russ)].
14. *Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E* (2017) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci 7: 41–53.
https://doi.org/10.1038/nrn1824
15. *Chalbot S, Zetterberg H, Blennow K, Fladby T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K* (2010) Cerebrospinal Fluid Secretory Ca^{2+}dependent phospholipase A2 activity: a biomarker of blood-cerebrospinal fluid barrier permeability. Neurosci Lett 478(3): 179–183.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.012
16. *Ванюшин БФ* (2006) Метилирование ДНК и эпигенетика. Генетика 42(9): 1186–1199. [Vanyushin BF (2006) DNA methylation and epigenetics. Genetics 42(9): 1186–1199. (In Russ)].
17. *Нетребенко ОК, Щеплягина ЛА, Грибакин СГ* (2020) Метаболическое программирование и эпигенетика в педиатрии. Лечение и профилактика. 10(1): 29–35. [*Netrebenko OK, Scheplyagina LA, Gribakin SG* (2020) Metabolic programming and epigenetics in pediatrics. Treatment and Prevention 10(1): 29–35. (In Russ)].
18. *Meng Q, Yang G, Yang Y, Ding F, Hu F* (2020) Protective effects of histone deacetylase inhibition by Scriptaid on brain injury in neonatal rat models of cerebral ischemia and hypoxia. Int J Clin Exp Pathol 13(2): 179–191.
19. *Jambhekar A, Dhall A, Shi Y* (2019) Roles and regulation of histone methylation in animal development. Nat Rev Mol Cell Biol 20(10): 625–641.
https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1
20. *Yao B, Jin P* (2014) Unlocking epigenetic codes in neurogenesis. Genes Dev 28(12): 1253–1271.
https://doi.org/10.1101/gad.241547.114
21. *Чурилова АВ, Глущенко ТС, Рыбникова ЕА, Самойлов МО* (2018) Влияние ингибитора деацетилаз гистонов на экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в структурах переднего мозга крыс при действии гипоксии. Цитология 60(12): 1016–1021. [*Churilova AV, Gluschenko TS, Rybnikova EA, Samoilov MO* (2018) The effect of histone deacetylase inhibitor on the expression level of glucococrticoid receptor in rat forebrain under hypoxia. Cytology 60(12): 1016–1021. (In Russ)].
22. *Pierre WC, Legault LM, Londono I, McGraw S, Lodygensky GA* (2020) Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups. FASEB J 34(1): 432–445.
https://doi.org/10.1096/ fj.201901461R
23. *Deniz BF, Confortim HD, Miguel PM, Bronauth L, Fernandes IR, Muotri AR, Pereira LO* (2021) High gestational folic acid supplementation prevents hypoxia-ischemia-induced caspase-3 augmenting without changing synapsin and H3 methylation levels in the rat hippocampus. Int J Dev Neurosci 81(6): 510–519.
https://doi.org/10.1002/jdn.10132
24. *Tornabene E, Helms HCC, Pedersen SF, Brodin B* (2019) Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial cells/astrocyte co-cultures. PLoS One 14: e0221103.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221103
25. *Rink C, Khanna S* (2017) Micro RNA in ischemic stroke etiology and pathology. Physiol Genomics 43(10): 521–528.
https://doi.org/10.1152/ physiolgenomics.00158.2017
26. *Shen G, Ma Q* (2020) MicroRNAs in the Blood-Brain Barrier in Hypoxic-Ischemic Brain Injury. Curr Neuropharmacol 18(12): 1180-1186.
https://doi.org/10.2174/1570159X18666200429004242
27. *Ek CJ, D'Angelo B, Baburamani AA, Lehner C, Leverin AL, Smith PL, Nilsson H, Svedin P, Hagberg H, Mallard C* (2015) Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 35(5): 818–827.
https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.255
28. *Cerutti C, Ridley AJ* (2017) Endothelial cell-cell adhesion and signaling. Exp Cell Res 358(1): 31–38.
https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003
29. *Shi Y, Jiang X, Zhang L, Pu H, Hu X, Zhang W, Cai W, Gao Y, Leak RK, Keep RF, Bennett MV, Chen J* (2017) Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A 114(7):

1243–1252.
https://doi.org/10.1073/pnas.1621174114
30. *Fan F, Yang J, Xu Y, Guan S* (2018) MiR-539 targets MMP-9 to regulate the permeability of blood-brain barrier in ischemia/reperfusion injury of brain. Neurochem Res 43(12): 2260–2267.
https://doi.org/10.1007/s11064-018-2646-0
31. *Bai Y, Zhang Y, Han B, Yang L, Chen X, Huang R, Wu F, Chao J, Liu P, Hu G, Zhang JH, Yao H* (2018) Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity. J Neurosci 38(1): 32–50.
https://doi.org/10.1523/ JNEUROSCI.1348-17.2017
32. *Wang Y, Wang MD, Xia YP, Gao Y, Zhu YY, Chen SC, Mao L, He QW, Yue ZY, Hu B* (2018) MicroRNA-130a regulates cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability by targeting Homeobox A5. FASEB J 32(2): 935–944.
https://doi.org/10.1096/ fj.201700139RRR
33. *Huang L, Ma Q, Li Y, Li B, Zhang L* (2018) Inhibition of microRNA-210 suppresses pro-inflammatory response and reduces acute brain injury of ischemic stroke in mice. Exp Neurol 300: 41–50.
https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.024
34. *Pan J, Qu M, Li Y, Wang L, Zhang L, Wang Y, Tang Y, Tian HL, Zhang Z, Yang GY* (2020) MicroRNA-126-3p/-5p overexpression attenuates blood-brain barrier disruption in a mouse model of middle cerebral artery occlusion. Stroke 51(2): 619–627.
https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.027531
35. *Bernstein DL, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Reichenbach NL, Polyak B, Persidsky Y, Rom S* (2020) miR-98 reduces endothelial dysfunction by protecting blood-brain barrier (BBB) and improves neurological outcomes in mouse ischemia/reperfusion stroke model. J Cereb Blood Flow Metab 40(10): 1953–1965.
https://doi.org/10.1177/0271678X19882264
36. *Bukeirat M, Sarkar SN, Hu H, Quintana DD, Simpkins JW, Ren X* (2016) MiR-34a regulates bloodbrain barrier permeability and mitochondrial function by targeting cytochrome c. J Cereb Blood Flow Metab 36(2): 387–392.
https://doi.org/10.1177/0271678X15606147
37. *Hu H, Hone EA, Provencher EAP, Sprowls SA, Farooqi I, Corbin DR, Sarkar SN, Hollander JM, Lockman PR, Simpkins JW, Ren X* (2020) MiR-34a interacts with cytochrome c and shapes stroke outcomes. Sci Rep 10(1): 3233.
https://doi.org/10.1038/s41598-020-59997-y
38. *Li Z, Li J, Tang N* (2017) Long noncoding RNA Malat1 is a potent autophagy inducer protecting brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by sponging miR-26b and upregulating ULK2 expression. Neuroscience 354: 1–10.
https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.017
39. *Yin KJ, Deng Z, Hamblin M, Xiang Y, Huang H, Zhang J, Jiang X, Wang Y, Chen YE* (2018) Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. J Neurosci 30(18): 6398–6408.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0780-10.2018
40. *Wan Y, Jin HJ, Zhu YY, Fang Z, Mao L, He Q, Xia YP, Li M, Li Y, Chen X, Hu B* (2018) MicroRNA-149-5p regulates bloodbrain barrier permeability after transient middle cerebral artery occlusion in rats by targeting S1PR2 of pericytes. FASEB J 32(6): 3133–3148.
https://doi.org/10.1096/fj.201701121R
41. *Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK* (2012) miR-210: the master hypoxamir. Microcirculation 19(3): 215–223.
https://doi.org/10.1111/j.1549- 8719.2011.00154.x
42. *Ma Q, Dasgupta C, Li Y, Huang L, Zhang L* (2017) MicroRNA-210 suppresses junction proteins and disrupts blood-brain barrier integrity in neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury. Int J Mol Sci 18(7): E1356.
https://doi.org/10.3390/ijms18071356
43. *Zaccagnini G, Greco S, Voellenkle C, Gaetano C, Martelli F* (2021) miR-210 hypoxamiR in Angiogenesis and Diabetes. Antioxid Redox Signal.
https://doi.org/10.1089/ars.2021.0200
44. *Ma Q, Zhang L, Pearce WJ* (2019) MicroRNAs in brain development and cerebrovascular pathophysiology. Am J Physiol Cell Physiol 317(1): 3–19.
https://doi.org/10.1152/ajpcell.00022.2019
45. *Jiang Y, Li L, Tan X, Liu B, Zhang Y, Li C* (2015) miR-210 mediates vagus nerve stimulationinduced antioxidant stress and anti-apoptosis reactions following cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. J Neurochem 134(1): 173–181.
https://doi.org/10.1111/jnc.13097
46. *Meng ZY, Kang HL, Duan W, Zheng J, Li QN, Zhou ZJ* (2018) MicroRNA-210 promotes accumulation of neural precursor cells around ischemic foci after cerebral ischemia by regulating the

SOCS1-STAT3-VEGF-C pathway. J Am Heart Assoc 7(5): e005052.
https://doi.org/10.1161/ JAHA.116.005052

47. *Garberg HT, Huun MU, Baumbusch LO, Åsegg-Atneosen M, Solberg R, Saugstad OD* (2017) Tempora profile of circulating microRNAs after global hypoxia-ischemi in newborn piglets. Neonatology 111(2): 133–139.
https://doi.org/10.1159/000449032
48. Whitehead CL, Teh WT, Walker SP, Leung C, Larmour L, Tong S (2018) Circulating MicroRNAs in maternal blood as potential biomarkers for fetal hypoxia in-utero. PLoS One 8(11): e78487. https://doi.org/. pone.0078487
https://doi.org/10.1371/journal
49. *Ge X, Han Z, Chen F, Wang H, Zhang B, Jiang R, Lei P, Zhang J* (2015) MiR-21 alleviates secondary blood-brain barrier damage after traumatic brain injury in rats. Brain Res 1603: 150–157.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.009
50. *Yao X, Wang Y, Zhang D* (2018) microRNA-21 confers neuroprotection agains cerebral ischemia-reperfusion injury and alleviates blood-brain barrier disruption in rats via the MAPK signaling pathway. J Mol Neurosci 65(1): 43–53.
https://doi.org/10.1007/s12031-018-1067-5
51. *Салмина АБ, Моргун АВ, Кувачева НВ, Пожиленкова ЕА, Солончук ЮР, Лопатина ОЛ, Комлева ЮК, Таранушенко ТЕ* (2014) Эндотелиальные прогениторные клетки в развитии и восстановлении церебрального эндотелия (обзор). Соврем технол мед 6(4): 213–222. [*Salmina AB, Morgun AV, Kuvacheva NV, Pozhilenkova EA, Solonchuk JuR, Lopatina OL, Komleva JuK, Taranushenko TE* (2014) Endothelial Progenitor Cells in the Development and Recovery of the Cerebral Endothelium (Review). Sovrem Technol Med 6(4): 213–222. (In Russ)].
52. *Siegenthaler JA, Sohet F, Daneman R* (2013) 'Sealing off the CNS': cellular and molecular regulation of blood-brain barriergenesis. Curr Opin Neurobiol 23(6): 1057–1064.
https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.06.006
53. *Masada T, Hua Y, Xi G, Ennis SR, Keep RF* (2013) Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 21: 22–33.
https://doi.org/10.1097/00004647-200101000-00004
54. *Zhang FY, Chen XC, Ren HM, Bao WM* (2006) Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. Neurol Res 28: 21–24.
https://doi.org/10.1179/016164106X91825
55. *Ikeda T, Xia XY, Xia YX, Ikenoue T* (1999) Hyperthermic preconditioning prevents blood-brain barrier disruption produced by hypoxia-ischemia in newborn rat. Brain Res 117: 53–58.
https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00097-8
56. *Maruoka N, Murata T, Omata N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Wada Y* (2012) Hypoxic tolerance induction in rat brain slices following 3-nitropropionic acid pretreatment as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. Neurosci Lett 319: 83–86.
https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02542-3
57. *Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA* (2017) Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab 27: 697–709.
https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375
58. *Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH* (2006) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. Nat Med 12: 441–445.
https://doi.org/10.1038/nm1387
59. *Tohidpour A, Morgun AV, Boitsova EB, Malinovskaya NA, Martynova GP, Khilazheva ED, Kopylevich NV, Gertsog GE, Salmina AB* (2017) Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. Front Cell Infect Microbiol 7: 276.
https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00276
60. *Frijns CJ, Kappelle LJ* (2012) Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. Stroke 33: 2115–2122.
https://doi.org/10.1161/01.str.0000021902.33129.69
61. *Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D* (1999) Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. J Neuroimmunol 101: 148–160.
https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00137-x
62. *Zahler S, Kupatt C, Becker BF* (2000) Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-α. FASEB J 14: 555–564.
https://doi.org/10.1096/fasebj.14.3.555
63. *Zhou SG, Lei XY, Liao DF* (2013) Effects of hypoxic preconditioning on the adhesion of neutrophils to vascular endothelial cells induced by hypoxia/reoxygenation. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xu 15: 159–162.
64. *Хилажева ЕД, Писарева НВ, Моргун АВ, Бойцова ЕБ, Таранушенко ТЕ, Фролова ОВ, Салмина АБ* (2017) Активация лактатных рецепторов GPR81 стимулирует митохондриаль-

ный биогенез в клетках эндотелия церебральных микрососудов. Анн клин эксп неврол 11(1): 34–39. [*Hilazheva ED, Pisareva NV, Morgun AV, Bojcova EB, Taranushenko TE, Frolova OV, Salmina AB* (2017) Aktivacija laktatnyh receptorov GPR81 stimuliruet mitohondrial'nyj biogenez v kletkah jendotelija cerebral'nyh mikrososudov. Ann Clin Exp Neurol 11(1): 34–39. (In Russ)].

65. *Verdegem D, Moens S, Stapor P, Carmeliet P* (2014) Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. Cancer Metab 2: 19. https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-19
66. *Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R* (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. Cell Cycle 8: 3984–4001. https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238
67. *Bergersen LH, Gjedde A* (2012) Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? Front Neuroenergetics 4: 5. https://doi.org/10.3389/fnene.2012.00005
68. *Vásquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, Parra V, Hill JA, Rothermel BA, Lavandero S* (2016) Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. J Physiol 594(3): 509–525. https://doi.org/10.1113/JP271301
69. *Jornayvaz FR, Shulman GI* (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays Biochem 47: 69–84. https://doi.org/10.1042/bse0470069
70. *Lin XW, Tang L, Yang J, Xu WH* (2016) HIF-1 regulates insect lifespan extension by inhibiting c-Myc-TFAM signaling and mitochondrial biogenesis. Biochim Biophys Acta 1863: 2594–2603. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.07.007
71. *Ruzaeva VA, Morgun AV, Khilazheva ED, Kuvacheva NV, Pozhilenkova EA, Boitsova EB, Martynova GP, Taranushenko TE, Salmina AB* (2016) Development of blood-brain barrier under the modulation of HIF activity in astroglialand neuronal cells in vitro. Biomed Khim 62: 664–669. https://doi.org/10.18097/pbmc20166206664
72. *Patten DA, Lafleur VN, Robitaille GA, Chan DA, Giaccia AJ, Richard DE* (2010) Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrialderived reactive oxygen species. Mol Biol Cell 21(18): 3247–3257. https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0025
73. *Куликов ВП, Трегуб ПП, Ковзелев ПД, Дорохов ЕА, Белоусов АА* (2015) Гиперкапния – альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1a и эритропоэтина в головном мозге. Патол физиол эксп терапия 59(3): 34–37 [*Kulikov VP, Tregub PP, Kovzelev PD, Dorohov EA, Belousov AA* (2015) Giperkapnija – al'ternativnyj gipoksii signal'nyj stimul dlja povyshenija HIF-1a i jeritropojetina v golovnom mozge. Patol Fiziol Exp Ter 59(3): 34–37. (In Russ)].
74. *Tregub PP, Malinovskaya NA, Morgun AV, Osipova ED, Kulikov VP, Kuzovkov DA, Kovzelev PD* (2020) Hypercapnia potentiates HIF-1α activation in the brain of rats exposed to intermittent hypoxia. Respir Physiol Neurobiol 278: 103442. https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103442
75. *Трегуб ПП, Малиновская НА, Куликов ВП, Кузовков ДА* (2021) Гиперкапния и ее сочетание с гипоксией снижают проницаемость гематоэнцефалического барьера у крыс. Патол физиол эксп терапия 65(2): 30–36 [*Tregub PP, Malinovskaya NA, Kulikov VP, Kuzovkov DA* (2021) Hypercapnia and its combination with hypoxia reduce the permeability of the blood-brain barrier in rats. Patol Fiziol Exp Ter 65(2): 30–36. (In Russ)].
76. *Yang W, Wang Q, Chi, L, Wang Y-Z, Cao H-L, Li W-Z* (2019) Therapeutic hypercapnia reduces blood–brain barrier damage possibly via protein kinase Cε in rats with lateral fluid percussion injury. J Neuroinflam 16: 36.
77. *Tregub PP, Morgun AV, Osipova ED, Kulikov VP, Malinovskaya NA, Kuzovkov DA* (2020) Hypercapnia and Hypoxia Stimulate Proliferation of Astrocytes and Neurons In Vitro. Bull Exp Biol Med 169(6): 755–758. https://doi.org/10.1007/s10517-020-04972-w
78. *Yang W, Zhang X, Wang N, Tan J, Fang X, Wang Q, Tao T, Li W* (2016) Effects of acute systemic hypoxia and hypercapnia on brain damage in a rat model of hypoxia-ischemia. PLoS One 11: e0167359. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167359
79. *Kangwantas K, Pinteaux E, Penny J* (2016) The extracellular matrix protein laminin-10 promotes blood-brain barrier repair after hypoxia and inflammation in vitro. J Neuroinflammation 13: 25. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0495-9
80. *Wacker BK, Freie AB, Perfater JL, Gidday JM* (2017) Junctional protein regulation by sphingosine kinase 2 contributes to blood-brain barrier protection in hypoxic preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab 32(6): 1014–1023. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.3

81. *Chi OZ, Mellender SJ, Barsoum S, Liu X, Weiss HR* (2017) Hypoxic Preconditioning Increases Blood-Brain Barrier Disruption in the Early Stages of Cerebral Ischemia. Curr Neurovasc Res 14(1): 26–31.
https://doi.org/10.2174/1567202614666161104114821
82. *Tregub P, Kulikov V, Bespalov A* (2013) Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. Pathophysiology 3: 165–170.
https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2013.09.001
83. *Куликов ВП, Каланова ЛА, Трегуб ПП* (2021) Потенцирование защитного эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими нейропротекторами. Патол физиол эксп терапия 3: 21–25. [*Kulikov VP, Kalanova LA, Tregub PP* (2021) Potencirovanie zashhitnogo jeffekta giperkapnicheskoj gipoksii pri kombinacii s farmakologicheskimi nejroprotektorami. Patol Fiziol Exp Ter 3: 21–25. (In Russ)].
84. *Шахмарданова СА, Гулевская ОН, Селецкая ВВ, Зеленская АВ, Хананашвили ЯА, Нефедов ДА, Галенко-Ярошевский ПА* (2016) Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине. Журн фунд мед биол 3: 4–15. [*Shahmardanova SA, Gulevskaja ON, Seleckaja VV, Zelenskaja AV, Hananashvili JaA, Nefedov DA, Galenko-Jaroshevskij PA* (2016) Antioxidants: classification, pharmacotherapeutic properties, use in practical medicine. J Fund Med Biol 3: 4–15. (In Russ)].
85. *Ashor AW, Siervo M, Lara J, Oggioni C, Afshar S, Mathers JC* (2015) Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Br J Nutr 113(8): 1182–1194.
https://doi.org/10.1017/S0007114515000227
86. *Brüll V, Burak C, Stoffel-Wagner B, Wolffram S, Nickenig G, Müller C, Langguth P, Alteheld B, Fimmers R, Stehle P, Egert S* (2017) Acute intake of quercetin from onion skin extract does not influence postprandial blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese adults with hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. Eur J Nutr 56(3): 1347–1357.
https://doi.org/10.1007/s00394-016-1185-1
87. *Смирнова КВ, Гильдиков ДИ* (2021) Сравнительная эффективность антиоксидантных препаратов в эксперименте in vitro. Рос ветерин журн 2: 37–40. [*Smirnova KV, Gil'dikov DI* (2021) Comparative efficacy of antioxidant drugs in an in vitro experiment. Ros Veterin J 2: 37–40. (In Russ)].
88. *Москаленко СВ, Шахматов ИИ, Бондарчук ЮА, Алексеева ОВ, Улитина ОМ* (2018) Реакция системы гемостаза при гиперкапнической гипоксии после курсового применения мексидола с использование метода тромбоэластографии. Каз мед журн 99(6): 936–941. [*Moskalenko SV, Shahmatov II, Bondarchuk JuA, Alekseeva OV, Ulitina OM* (2018) The reaction of the hemostasis system in hypercapnic hypoxia after a course of mexidol using the method of thromboelastography. Kaz Med J 99(6): 936–941. (In Russ)].
89. *Хлебодаров ФЕ, Михин ВП, Тюриков ПЮ* (2009) Дисфункция сосудистого эндотелия и ее коррекция цитопротекторами у больных стабильной стенокардией напряжения и артериальной гипертонией. Рос кардиол журн 6: 34–39. [*Khlebodarov FE, Mikhin VP, Tyurikov PYu* (2009) Vascular endothelial dysfunction and its correction by cytoprotectors in patients with stable angina pectoris and arterial hypertension. Rus Cardiol J 6: 34–39. (In Russ)].
90. *Семененков ИИ, Пристром МС* (2019) Влияние комплексного применения нормобарической гипоксии и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на изменения жирнокислотного состава плазмы крови и показателей системного иммунного воспаления у пациентов с ишемической болезнью сердца, ассоциированной с хронической обструктивной болезнью легких. Кардиоваск тер проф 18(S1): 136–137 [*Semenenkov II, Pristrom MS* (2019) Influence of the combined use of normobaric hypoxia and omega-3 polyunsaturated fatty acids on changes in the fatty acid composition of blood plasma and indicators of systemic immune inflammation in patients with coronary heart disease associated with chronic obstructive pulmonary disease. Cardiovasc Ter Prof 18(S1): 136–137. (In Russ)].
91. *Шведова МВ, Анфиногенова ЯД, Попов СВ, Щепеткин ИА, Аточин ДН* (2016) C-Jun n-терминальные киназы и их модуляторы при ишемически-реперфузионном повреждении миокарда (обзор литературы). Сиб жур клин эксп мед 31(3): 7–15. [*Shvedova MV, Anfinogenova JaD, Popov SV, Shhepetkin IA, Atochin DN* (2016) C-Jun n-terminal kinases and their modulators in ischemia-reperfusion myocardial injury (literature review). Sib J Clin Exp Med 31(3): 7–15. (In Russ)].
92. *Plotnikov MB, Chernysheva GA, Smolyakova VI, Aliev OI, Trofimova ES, Sherstoboev EY, Osipenko AN, Khlebnikov AI, Anfinogenova YJ, Schepetkin IA, Atochin DN* (2020) Neuroprotective Effects of a Novel Inhibitor of c-Jun N-Terminal Kinase in the Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. Cells 9(8): 1860.
https://doi.org/10.3390/cells9081860
93. *Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E* (2008) c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. J Neurochem 104(2): 325–335.
https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04957.x

The Effect of Hypercapnia and Hypoxia on the Physiology and Metabolism of the Cerebral Endothelium in Ischemic Conditions

P. P. Tregub[a, b, *]

[a] *Scientific Center of Neurology, Moscow, Russia*
[b] *Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russia*
**e-mail: pfiza_asmu@mail.ru*

This review provides data on the role of blood-brain barrier (BBB) dysfunction in neurological pathology, a description of epigenetic and metabolic regulators of its functional activity and structural integrity. Also, the review contains information on experimental results of studies of neuroprotective effects of hypoxia and hypercapnia with an assessment of their impact on the functioning of the BBB. In addition, the review provides arguments in favor of the combined use of drugs that modulate the metabolism and permeability of the BBB, in combination with hypercapnic hypoxia to achieve greater neuroprotective efficacy. These data demonstrate that there are a significant number of drugs with high potential to increase neuroprotective efficacy in combination with hypercapnic hypoxia. Such groups of drugs include antioxidants, endothelium- and membrane protectors, JNK inhibitors and energotropic drugs.

Keywords: blood-brain barrier, hypercapnia, hypoxia, cerebral endothelium, neuroprotection

EDN: CBJJQK
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 594–625

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ И МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕЕ КРИТЕРИЕВ В КОНТЕКСТЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИСТОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

© 2022 г.
А. Г. Кутихин[1, *], Д. К. Шишкова[1], Е. А. Великанова[1], М. Ю. Синицкий[1], А. В. Синицкая[1], В. Е. Маркова[1]

[1]*Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия*

**E-mail: antonkutikhin@gmail.com*

Поступила в редакцию 05.03.2022 г.
После доработки 04.04.2022 г.
Принята к публикации 05.04.2022 г.

Данная проблемная статья посвящена обсуждению методологических аспектов определения различных критериев дисфункции эндотелия (провоспалительной активации эндотелия, нарушений эндотелиальной механотрансдукции, развития эндотелиально-мезенхимального перехода, нарушения биосинтеза и выделения монооксида азота (NO), нарушения целостности эндотелия и его протромботической активации) при экспериментальном моделировании *in vitro* и *in vivo*. Классическое определение дисфункции эндотелия включает в себя патофизиологически значимое снижение выделения эндотелиальными клетками вазодилататоров, частичную потерю эндотелием своих атромбогенных свойств, провоспалительную активацию эндотелиальных клеток и патологическое повышение проницаемости эндотелия. Клинически значимыми последствиями дисфункции эндотелия являются артериальная гипертензия, макро- и микроангиопатия вследствие атерогенеза, а также возникающая по причине повышения сосудистой проницаемости микроальбуминурия. На основании результатов исследований последних лет предлагается расширить определение дисфункции эндотелия, добавив в него нарушения эндотелиальной механотрансдукции и развитие эндотелиально-мезенхимального перехода. Чувствительными и надежными биомаркерами, обусловливающими паракринные эффекты дисфункциональных эндотелиальных клеток *in vitro*, являются интерлейкин-6, интерлейкин-8 и MCP-1/CCL2, однако *in vivo* данные цитокины также выделяются иммунными клетками и поэтому не обладают достаточной специфичностью для отражения дисфункции эндотелия. Концептуальные улучшения методологии моделирования дисфункции эндотелия, в том числе в контексте имитации гистогематического барьера, включают в себя культивирование эндотелиальных клеток в системе пульсирующего потока (в том числе на подложке из коллагена IV типа – основного компонента эндотелиальной базальной мембраны), а также выделение лизата эндотелия из кровеносных сосудов модельных лабораторных животных *in situ* с целью последующего профилирования генной и белковой экспрессии. В сочетании с моделированием паракринных эффектов дисфункциональных эндотелиальных клеток при помощи кондиционированной среды указанные модели анализа состояния эндотелия в условиях потока обладают высоким потенциалом для приближения экспериментального сценария дисфункции эндотелия к реальным физиологическим условиям.

Ключевые слова: дисфункция эндотелия, воспаление, механотрансдукция, эндотелиально-мезенхимальный переход, оксид азота, гистогематический барьер, пульсирующий поток

DOI: 10.31857/S0869813922050077

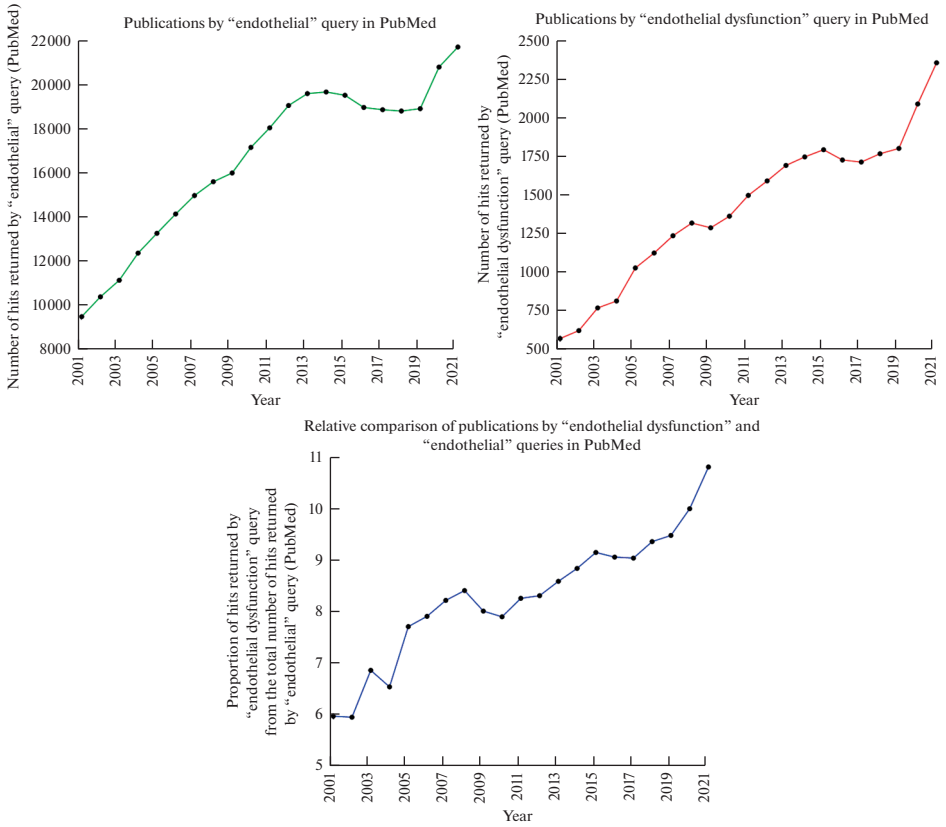

Рис. 1. Динамика публикаций по запросам “endothelial” и “endothelial dysfunction”, а также доля публикаций по запросу “endothelial dysfunction” от общего количества публикаций по запросу “endothelial” в базе данных PubMed с 2001 по 2021 гг.

Исследование различных аспектов нормальной и патологической физиологии эндотелия продолжает оставаться одной из самых актуальных тем сердечно-сосудистой биологии, что подтверждается стабильным увеличением количества соответствующих публикаций за последние 20 лет (с 9512 в 2001 до 21748 в 2021 гг.). Особую актуальность при этом имеет изучение дисфункции эндотелия, поскольку доля посвященных этой проблеме публикаций от общего количества публикаций по физиологии эндотелия растет с каждым годом (с 5.99% в 2001 до 10.83% в 2021 гг.). Интерес к дисфункции эндотелия в последние два года, отраженный резким подъемом соответствующей кривой на графике (рис. 1), может быть объясним особенностями течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19), которая сопровождается развитием дисфункции эндотелия у существенной доли пациентов.

Несмотря на существенное количество публикаций по дисфункции эндотелия в ведущих журналах, печатающих исследования, посвященных сердечно-сосудистым проблемам (*Circulation Research*, *Cardiovascular Research*, *Arteriosclerosis*, *Thrombosis* и *Vascular Biology*) за последние 20 лет (671), в которых была показана расшифровка целого ряда механизмов, обеспечивающих нормальную физиологию эндотелия (поддержание эндотелиального фенотипа, поддержание артериальной, венозной или лимфатической спецификации эндотелия, протективное влияние ламинарно-

го потока с высоким напряжением сдвига) или способствующих его патологической активации (атерогенное воздействие турбулентного потока, эндотелиально-мезенхимальный переход, нарушения эндотелиальной механотрансдукции), определение дисфункции эндотелия с 1990-х годов остается статичным. Как в описательных, так и в критических обзорах дисфункция эндотелия определяется как "сниженный синтез, выделение или биодоступность монооксида азота (NO), которое может приводить к нарушению баланса между процессами вазоконстрикции и вазодилатации и сопровождаться провоспалительной и протромботической активацией эндотелия" [1–6]. Более краткие определения дисфункции эндотелия звучат как "нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации в ответ на физиологическое воздействие" [7, 8] или "потеря эндотелием своей противовоспалительной, антитромботической и вазодилатирующей способности" [9]. Клинически релевантное определение дисфункции эндотелия звучит как "снижение вазодилатирующего ответа на воздействие эндотелий-зависимого вазодилататора (к примеру, ацетилхолина или брадикинина) или пульсирующего потока (flow-mediated vasodilation)" [10]. Пожалуй, наиболее полное определение дисфункции эндотелия на сегодняшний день принадлежит советскому и американскому патофизиологу М.С. Голигорскому, который, помимо патофизиологически значимого (приводящего к нарушению регуляции сосудистого тонуса гладкомышечными клетками) снижения выделения вазодилататоров и частичной потери эндотелием атромбогенности, предложил также включить в него нарушения барьерной функции эндотелия, сниженную способность к пролиферации и миграции и сниженный ангиогенный потенциал дисфункциональных эндотелиальных клеток, а также выделил клинические последствия дисфункции эндотелия: артериальную гипертензию, макро- и микроангиопатию, развивающуюся вследствие атерогенеза и воспалительной инфильтрации, и микроальбуминурию, возникающую вследствие повышения сосудистой проницаемости [11, 12]. Им были постулированы следующие признаки дисфункциональных эндотелиальных клеток: сниженное выделение биодоступного NO, повышенная способность к адгезии лейкоцитов, накопление холестерина и окисленных липопротеинов низкой плотности, нарушенная передача вазодилатирующих молекул сосудистым гладкомышечным клеткам, повышенный синтез компонентов внеклеточного матрикса (приобретение профибротического фенотипа) и склонность к преждевременному старению и апоптозу [11, 12].

Вместе с тем работа комплексной научной группы по определению ясных диагностических критериев дисфункции эндотелия, основанных на клинико-лабораторных биомаркерах, по собственному заключению ее членов не привела к удовлетворительному результату [13]. Практически все биомаркеры из 62 исследований, оцененных в данной работе, характеризовались отсутствием специфичности для эндотелиальных клеток [13]. К аналогичным результатам пришли и авторы масштабного протеомного исследования по идентификации маркеров, связанных с дисфункцией эндотелия у пациентов с сахарным диабетом [14]. Таким образом, в настоящее время можно констатировать отсутствие ясности в патофизиологическом и клиническом определении дисфункции эндотелия, а также ограниченность классического определения данного понятия нарушением эндотелий-зависимой вазорелаксации. Следует отметить, что некоторые авторы расширяют один из компонентов определения дисфункции эндотелия до "дисфункционального выделения молекул-мессенджеров", не ограничиваясь NO [15]. Существенный объем новых знаний (с момента данного М.С. Голигорским определения прошло более 15 лет) о физиологии эндотелия требует анализа возможности введения новых критериев дисфункции эндотелия. Данная проблемная статья посвящена критическому обсуждению изучения различных аспектов нормальной и патологической физиоло-

гии эндотелия, в том числе важных для надлежащего моделирования гистогематического барьера, в методологическом контексте.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Культивирование эндотелиальных клеток в условиях пульсирующего потока

В отличие от большинства клеточных линий, трехмерное культивирование которых в статических условиях относительно соответствует испытываемым ими биомеханическим воздействиям в организме, эндотелиальные клетки требуют создания однонаправленного пульсирующего потока для адекватного моделирования своей физиологии, в том числе профиля генной и белковой экспрессии. Подходящим решением для культивирования эндотелиальных клеток в условиях потока является система, сочетающая в себе насос для создания пульсирующего потока, трубки-коннекторы, проточные камеры для культивирования клеток и программное обеспечение для регулирования задаваемых параметров потока (в том числе напряжения сдвига – shear stress). Преимуществами использования такой системы являются вариабельность доступных коннекторов и культуральных проточных камер, которые для более физиологичного моделирования базальной мембраны могут быть покрыты коллагеном IV типа. Прозрачность проточных камер позволяет в любое время осуществлять визуализацию жизнеспособных или фиксированных культур эндотелиальных клеток методами фазово-контрастной, эпифлуоресцентной или конфокальной микроскопии, в том числе после их мечения флуоресцентными зондами (для жизнеспособных культур) или антителами, конъюгированными с флуорофорами (для фиксированных культур). Возможность флуоресцентной визуализации жизнеспособных клеточных культур позволяет изучать различные аспекты функционирования лизосом (поскольку лизосомальные зонды являются сенсорами pH, градиент которого часто теряется при фиксации) и митохондрий, не прибегая к необходимости окрашивания данных органелл специфичными антителами. Наличие в системе четырех отдельных модулей, подключаемых к одному насосу и управляемых посредством специализированного программного обеспечения через ноутбук, позволяет проводить работу одновременно с четырьмя экспериментальными группами, что обеспечивает пространство для маневра при планировании дизайна эксперимента. Как правило, анализ производится после временной остановки системы пульсирующего потока и извлечения из нее проточных камер, однако в теории длина коннекторов позволяет визуализировать клетки и в условиях движущегося потока (то есть без остановки системы) в случае необходимости.

Важным техническим нюансом работы с системой пульсирующего потока является равномерность предварительного заселения поверхности всех культуральных проточных камер для создания одинаковых экспериментальных условий во всех камерах и обеспечения сохранности целостности эндотелиального монослоя в процессе эксперимента. Поскольку прочность адгезии клеток является ключевым параметром для обеспечения исходной целостности эндотелиального монослоя и технической валидности проводимого эксперимента, с целью надежной адгезии эндотелиальных клеток к культуральному пластику проточной камеры (или подложки из коллагена IV типа, если таковая в камере имеется) после процедуры рассева следует оставлять аликвотированную в камеры суспензию клеток в течение 12–16 ч в статических условиях. Кроме того, для адаптации эндотелиальных клеток к условиям потока, необходимой для адекватной оценки изменения их генной и белковой экспрессии при каком-либо воздействии, рекомендуется предварительное поточное прекондиционирование адгезированных к культуральному пластику эндотелиальных клеток путем помещения проточной камеры в систему пульсиру-

ющего потока с последующим запуском системы (без каких-либо дополнительных воздействий) на 24–48 ч. Критерием адаптации клеток к потоку, косвенно отражающим соответствующие изменения исходной генной и белковой экспрессии, является элонгация (удлинение формы) эндотелиальных клеток.

Следует отметить, что полная конфлюэнтность эндотелиального монослоя препятствует надлежащей элонгации эндотелиальных клеток, что может снижать физиологичность моделирования механотрансдукции (трансформации эндотелиальными клетками механического воздействия, в данном случае потока, в биохимические сигналы), однако в то же время обеспечивает целостность эндотелиального монослоя, не менее важную для адекватной оценки его физиологии. Напротив, неполная конфлюэнтность эндотелиального монослоя позволяет эндотелиальным клеткам в достаточной степени изменить геометрию в соответствии с направлением потока, однако оставляет вероятность также и неполной целостности монослоя в момент запуска системы, что может привести к его размыванию и открепленню пласта адгезированных друг к другу эндотелиальных клеток от культурального пластика камеры. Оптимальной для физиологичного моделирования эндотелиальной механотрансдукции и, следовательно, профиля генной и белковой экспрессии, представляется степень конфлюэнтности эндотелиальных клеток в 75–80%.

С точки зрения молекулярного профилирования следует отметить, что площадь одной проточной камеры обеспечивает ее заполнение количеством эндотелиальных клеток, достаточным для анализа генной экспрессии методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) в случае лизиса тризолом. При необходимости проведения полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq), жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS) или иммуноблоттинга рекомендуется объединять клеточный лизат с трех проточных камер внутри одной экспериментальной группы в один образец для получения достаточного для анализа количества материала. Иными словами, в случае анализа указанными методами для получения одного образца необходимо проведение трех последовательных запусков системы пульсирующего потока.

При лизисе клеток внутри проточной камеры тризолом (для выделения РНК) или RIPA-буфером (для выделения белка) важным является предварительно забрать из камеры максимальное количество фосфатно-солевого буфера для промывания клеток (оставив его только непосредственно внутри канала камеры). Вследствие различной плотности тризола, RIPA-буфера и фосфатно-солевого буфера тризол и RIPA-буфер практически не смешиваются с фосфатно-солевым буфером и в течение нескольких секунд (пока идет пипетирование) вытесняют его из канала наружу камеры, что позволяет не забирать изначально остающийся в канале фосфатно-солевой буфер во избежание воздушной эмболии канала и соответствующего воздействия на клетки (впрочем, при желании это тем не менее возможно сделать). После 5-минутного лизиса клеток в тризоле или RIPA-буфере рекомендуется еще два раза пропустить собранный из камеры тризол или RIPA-буфер через камеру, чтобы собрать остатки клеточного дебриса.

Как правило, для культивирования эндотелиальных клеток в условиях потока целесообразно использовать полную (содержащую сыворотку) культуральную среду. В частности, такая среда является наиболее подходящей при расселении эндотелиальных клеток в культуральные проточные камеры и при их прекондиционировании в условиях пульсирующего потока. В принципе, такая среда может быть использована и собственно при экспериментах в условиях потока, однако в соответствии с представлениями и желаниями экспериментатора может быть заменена на бессывороточную культуральную среду (поскольку сыворотка представляет из себя стохастическое сочетание гетерогенных молекул). С этой позиции представляют существенный интерес бессывороточные среды с заранее определенной концен-

трацией факторов роста (defined medium). Такие среды позволяют и повысить жизнеспособность эндотелиальных клеток в процессе эксперимента и минимизировать стохастичность влияния отдельных компонентов гетерогенной сыворотки на результаты. В настоящее время на рынке представлен широкий выбор сред для культивирования первичных эндотелиальных клеток человека, в число которых входят и сывороточная, и бессывороточная, и бессывороточная с факторами роста среда. Личный опыт авторов данной статьи также позволяет говорить о взаимозаменяемости сред различных производителей и соответствующих первичных эндотелиальных культур.

Что касается самих культур эндотелиальных клеток, то следует подчеркнуть важность использования именно первичных, а не иммортализованных культур, физиология которых необратимо изменена вне зависимости от способа иммортализации. При этом и с исследовательской, и с финансовой стороны совершенно целесообразно приобретение коммерческих культур эндотелиальных клеток у соответствующих производителей. Данные культуры обладают способностью к быстрой пролиферации (скорость которой, безусловно, варьирует в зависимости от донора и от клеточной линии, однако в ряде случаев не уступает иммортализованным эндотелиальным клеткам), неприхотливы в культивировании и выдерживают множественное пассажирование (при разморозке на 2-м пассаже их удавалось успешно культивировать и до 12-го пассажа без существенного замедления пролиферации). Кроме того, такой подход к источнику эндотелиальных клеток для экспериментов часто позволяет прицельно выбрать линию клеток именно того сосуда, патология которого исследуется концептуально. В частности, для моделирования дисфункции эндотелия при атеросклерозе рекомендуются сравнительные и одновременные эксперименты на любой из линий атерочувствительных артерий (к примеру, коронарной артерии, сонной артерии или аорты) и линии атерорезистентной артерии (традиционно в качестве такой артерии рассматривается внутренняя грудная артерия). Следует подчеркнуть необходимость использования артериальных эндотелиальных клеток для исследования артериальных патологий, а венозных эндотелиальных клеток – для изучения венозных патологий. Отдельно стоит заострить внимание на изучении нормальной и патологической физиологии эндотелиальных клеток, заселяющих новые биоматериалы для производства тканеинженерных медицинских изделий или их готовые прототипы (к примеру, сосудистые протезы малого диаметра). Для моделирования (пато)физиологии эндотелия в таких условиях также следует применять те эндотелиальные клетки, которые соответствуют анатомической локализации медицинского изделия (к примеру, в том случае, если сосудистые протезы малого диаметра планируется использовать в качестве кондуитов для коронарного шунтирования, эксперименты по изучению физиологии эндотелия на таких кондуитах или биоматериалах для них следует ставить на первичных эндотелиальных клетках коронарной или внутренней грудной артерии).

Культивирование эндотелиальных клеток в статических условиях

Несмотря на всю привлекательность культивирования эндотелиальных клеток в условиях пульсирующего потока с точки зрения объективного моделирования их нормальной физиологии, достаточно большое количество экспериментальных приложений требует значительной клеточной массы, невозможной к получению на малой культуральной площади проточных камер. К примеру, анализ паракринных эффектов эндотелиальных клеток в обязательном порядке включает в себя измерение содержания провоспалительных цитокинов, концентрация которых должна быть достаточна для их детекции. Объем культуральной среды, загружаемой в один модуль пульсирующего потока (на примере системы, с которой работали

авторы), составляет 15 мл, а площадь одной культуральной проточной камеры составляет ≈2.5–3.0 см^2, что эквивалентно площади 8–9 лунок 96-луночного плоскодонного планшета или 0.25–0.3 × 10^6 (250–300 тысяч) клеток. Соответственно, количество культивируемых в системе пульсирующего потока клеток не соответствует объему среды с точки зрения даже высокоточного и количественного иммуноферментного анализа, не говоря уже о менее чувствительных скрининговых полуколичественных методах, таких, как дот-блоттинг. Искусственное испарение культуральной среды для концентрирования содержащихся в них молекул сопряжено с высоким риском контаминации, которая делает невозможной дальнейший объективный анализ. Кроме того, моделирование паракринных эффектов эндотелиальных клеток требует добавления кондиционированной (то есть инкубированной с дисфункциональными эндотелиальными клетками) среды к интактным культурам, что опять же представляется малореальным в условиях потока вследствие несоответствия количества клеток объему среды.

Поэтому эксперименты, результат которых напрямую зависит не от содержимого эндотелиальных клеток (к примеру, транскрипты, внутриклеточные белки и рецепторы), а от их секретома (совокупности молекул, выделяемых ими в микроокружение – к примеру, цитокинов, про- и антиангиогенных молекул), целесообразно проводить в статических условиях. При моделировании паракринных эффектов культур эндотелиальных клеток следует помнить о важности применения бессывороточной культуральной среды (как вариант – бессывороточной культуральной среды с определенной концентрацией факторов роста), поскольку сыворотка содержит ксеногенные (гетерологические) внеклеточные везикулы, а также цитокины и про-/антиангиогенные молекулы, которые могут взаимодействовать с поликлональными антителами для иммуноферментного анализа или дот-блоттинга. Использование бессывороточной культуральной среды с определенной концентрацией факторов роста способствует жизнеспособности клеток, подвергшихся воздействию триггера дисфункции эндотелия (что позволяет осуществлять более физиологичное моделирование в контексте последующего добавления кондиционированной среды к интактным эндотелиальным клеткам), однако может затруднять объективную оценку изменений в концентрации про- и антиангиогенных молекул в культуральной среде методами иммуноферментного анализа и дот-блоттинга, поскольку в их число также входят и факторы роста. Как правило, кондиционированная среда переносится к интактным культурам эндотелиальных клеток после не более чем 24 ч культивирования, поскольку далее даже в контрольных культурах эндотелиальных клеток (без добавления стимула дисфункции эндотелия) начинаются изменения физиологии, связанные с сывороточной депривацией. Кроме того, для объективной оценки ответа интактных культур эндотелиальных клеток на добавление кондиционированной среды (в том числе для полуколичественного и количественного анализа изменений их секреторного профиля) требуется их 24-часовая инкубация с кондиционированной средой, а истощение культуральной среды при ее добавлении к монослою эндотелиальных клеток (как дисфункциональных, кондиционирующих среду, так и интактных, инкубируемых уже с кондиционированной средой) происходит как раз через 48 ч (24 ч инкубации с дисфункциональными клетками и 24 ч инкубации с интактными клеточными культурами).

Также культивирование эндотелиальных клеток в статических условиях применимо в том случае, когда эксперимент подразумевает их фракционирование на органеллы с целью разделения белков различной локализации (к примеру, ядерных, цитозольных и митохондриальных или лизосомальных белков). Одной из целей такого экспериментального дизайна может быть дальнейшая жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией, которая требует предварительного обогащения анализируемых образцов для максимизации суммарного количества идентифициру-

емых клеточных белков. В этом случае для выделения достаточного количества белка для анализа требуется существенный объем клеточной массы, невозможный к получению на ограниченной площади культуральных проточных камер.

Исследование биологии эндотелия in vivo

Помимо экспериментов на культурах эндотелиальных клеток в условиях однонаправленного пульсирующего потока *in vitro*, изучение патологических эффектов и механизмов действия их пусковых факторов (триггеров) также подразумевает исследования *in vivo* на лабораторных животных. Наиболее подходящими моделями для этого можно считать мелких лабораторных животных (крыс и мышей), поскольку относительная простота их содержания и размножения позволяет проводить масштабные эксперименты с достаточным количеством биологических повторов (репликат) для обеспечения достаточной степени доказательности экспериментов.

Рассматривая возможные животные модели для изучения дисфункции эндотелия, следует подчеркнуть, что для каждого эксперимента может потребоваться индивидуализация экспериментальной модели (к примеру, определенные линии трансгенных мышей или крыс). Данный постулат особенно применим к анализу влияния различных коморбидных (сопутствующих) патологий, основными из которых являются сахарный диабет, хроническая болезнь почек и хроническая обструктивная болезнь легких. Каждое из данных состояний имеет свои характерные, классические и относительно новые, животные модели для исследования состояния органов и тканей, в том числе эндотелия. Если же рассматривать сценарий отсутствия выраженных коморбидных патологий, наиболее релевантный научной задаче поиска способов фармакологического и нефармакологического вмешательства для коррекции дисфункции эндотелия, стоит выделить три основных животных модели. Первой из них являются нормолипидемические и нормотензивные крысы Wistar, позволяющие анализировать состояние эндотелия в отсутствие каких-либо дополнительных факторов сердечно-сосудистого риска, второй – крысы с врожденной артериальной гипертензией (к примеру, линии SHR или НИСАГ), третьей – гиперлипидемические (к примеру, ApoE- или LDLR-нокаутные) мыши, с рождения склонные к гипер/дислипидемии, отложению липидов в крупных артериях и развитию атеросклероза. Использование трех данных моделей позволяет изучать развитие дисфункции эндотелия в отсутствие модифицируемых факторов сердечно-сосудистого риска, а также при двух наиболее распространенных и важных факторах сердечно-сосудистого риска – артериальной гипертензии и гипер/дислипидемии. Поскольку данные состояния являются скорее неизбежно ассоциированными с возрастом процессами, чем сопутствующими заболеваниями, целесообразно рассматривать данные животные модели как некий “нормальный патофизиологический сценарий”, обусловливающий релевантность исследования дисфункции эндотелия в дополнение к нормофизиологическому сценарию, наблюдаемому у крыс Wistar.

Наиболее подходящим сосудом для анализа дисфункции эндотелия у крыс и мышей *in vivo* представляется аорта, поскольку: 1) данный сосуд относится к артериальному руслу (что позволяет связывать дисфункцию эндотелия с развитием артериальных патологий, главным образом атеросклероза); 2) содержит неразрывно связанные сегменты с атерогенным турбулентным кровотоком (дуга и бифуркация аорты) и с атеропротективным ламинарным кровотоком (нисходящая аорта); 3) обладает максимальным диаметром среди всех остальных сосудов организма, что позволяет собрать достаточное количество материала для анализа. Из этого следует, что при изучении дисфункции эндотелия у лабораторных животных целесообразно исследовать состояние эндотелия в сосудистых сегментах как с турбулентным, так и с ламинарным кровотоком. Если в качестве сегмента с ламинарным

кровотоком единственным возможным выбором является нисходящая аорта в силу своей длины и простоты своей геометрии, то для выбора сегмента с турбулентным кровотоком существуют два варианта (как указано выше, дуга и бифуркация аорты). Сравнивая данные сосудистые сегменты, стоит отметить крайне малые размеры собственно раздваивающегося фрагмента бифуркации (ее части с истинно турбулентным кровотоком) даже в сравнении с обладающей относительно небольшими размерами дугой аорты. Поэтому представляется разумным предпочесть для анализа состояния эндотелия при турбулентном кровотоке именно дугу аорты.

Анализ состояния эндотелия в дуге аорты и нисходящей аорте *in situ* (то есть в нативном состоянии, без дополнительного воздействия на эндотелиальные клетки) может быть выполнен как минимум тремя способами: при помощи быстрого промывания указанных аортальных сегментов тризолом с целью сбора эндотелиального лизата для последующего выделения РНК и профилирования методом ОТ-кПЦР, посредством аналогичного промывания RIPA-буфером с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз или, используя продольную диссекцию цельного сегмента и его окрашивание первичными и вторичными флуоресцентно меченными антителами с последующей *en face*-визуализацией, подразумевающей микроскопию уложенной интимой вверх аорты без приготовления срезов.

Сбор эндотелиального лизата тризолом или RIPA-буфером целесообразно проводить при помощи инсулинового шприца (в силу малого диаметра аорты крыс и мышей) после тщательного промывания физиологическим раствором хлорида натрия для очищения от крови. Как правило, для выделения достаточного количества РНК или белка из сегментов аорты крысы достаточно однократного, но медленного шприцевого промывания тризолом или RIPA-буфером (хотя также оправдан вариант с трехкратным относительно быстрым промыванием). При этом следует отметить, что для достижения достаточной для иммуноблоттинга концентрации белка применительно к сегментам крысиной аорты объем RIPA-буфера не должен превышать 200 мкл для дуги аорты и 300 мкл для нисходящей аорты; вероятно, он должен быть еще меньшим для обладающих меньшим диаметром аорт мышей. Гистологическим обоснованием применения такой методики у крыс и мышей является то, что их интима в норме состоит исключительно из монослоя эндотелиальных клеток, не содержит каких-либо других клеточных популяций и отделена от содержащей сосудистые гладкомышечные клетки мышечной оболочки внутренней эластической мембраной. Безусловно, данная методика не является абсолютно чистой и сопряжена с некоторой степенью контаминации лизатом гладкомышечных клеток (что подтверждается выявлением альфа-актина гладких мышц при помощи иммуноблоттинга и соответствующих транскриптов при ОТ-кПЦР), однако, во-первых, она может быть предварительно оптимизирована для каждого конкретного эксперимента, а во-вторых, в случае такой контаминации целесообразно внесение поправки на количество белка или транскриптов альфа-актина гладких мышц в контрольной и экспериментальной группах (по аналогии с принципом ΔCt при анализе данных ОТ-кПЦР).

Особенностью иммуноблоттинга белков крыс является то, что молекулярные массы детектируемых белков часто не совпадают с таковыми у человека, которые используются производителями антител в качестве референтных. Помимо того, что данная особенность может вызывать вопросы у требовательных к техническим деталям рецензентов, она ограничивает одновременное использование двух и более первичных антител, иногда практикуемое с целью экономии ресурсов при анализе белков человека в случае предварительного тестирования таких антител, расхождения их по молекулярным массам и отсутствия их неспецифического связывания с нецелевыми белками или их фрагментами. Тем не менее, приведенные ограничения не умаляют технической валидности иммуноблоттинга лизата эндотелия крыс.

Еще одним упомянутым выше способом анализа является конфокальная микроскопия эндотелия *en face*. Необходимость использования именно конфокальной микроскопии обусловлена сильным фоновым свечением от нижележащей внутренней эластической мембраны в зеленом флуоресцентном канале, что требует отсечения отдельных оптических срезов для визуализации окрашенных флуоресцентно меченными антителами эндотелиальных клеток. Вероятно, с целью минимизации аутофлуоресцентного зеленого свечения следует использовать сочетание Alexa Fluor 555- и Alexa Fluor 647-меченных вторичных антител, светящихся в красном и дальнем красном флуоресцентном каналах. Хотя данный способ анализа состояния эндотелия является допустимым, его доказательная мощность в большинстве случаев (за исключением оценки эндотелиально-мезенхимального перехода) представляется ограниченной в силу качественно-комплементарного характера полуколичественного анализа конфокальных изображений; кроме того, его использование приводит к довольно нерациональному использованию имеющейся ткани, поскольку достаточно большая часть аортального сегмента уходит на окрашивание всего лишь одной комбинацией антител.

МЕХАНИЗМЫ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАССМОТРЕНИИ ФОРМУЛИРОВКИ ЕЕ КРИТЕРИЕВ

Провоспалительная активация эндотелия

Основными критериями провоспалительной активации эндотелия являются адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам вследствие связывания лейкоцитарных рецепторов с соответствующими рецепторами эндотелиальных клеток и повышенное выделение эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов [16–18]. К лейкоцитарным рецепторам, ответственным за прикрепление лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, относятся VLA-4/CD49d (связь с VCAM1 эндотелиальных клеток), Mac-1 (комплекс CD11b и CD18, связь с ICAM1 эндотелиальных клеток), LFA-1/CD11a (связь с ICAM1 эндотелиальных клеток) и PSGL-1/CD162 (связь с E-селектином эндотелиальных клеток) [19–22].

Объективный анализ адгезии клеток мононуклеарной фракции крови к эндотелию, частично отражающей провоспалительную активацию эндотелия, невозможен при культивировании эндотелиальных клеток в статических условиях по причине пассивного оседания и неминуемой адгезии моноцитов и лимфоцитов как к эндотелиальным клеткам, так и к культуральному пластику даже после многих (7–10) стадий интенсивной отмывки. Соответственно, даже в случае полной конфлюэнтности эндотелиального монослоя является невозможным отделить истинную адгезию клеток мононуклеарной фракции крови к эндотелию от “псевдоадгезии”, которая обусловлена механическим прикреплением осевших моноцитов и лимфоцитов к нижележащей поверхности независимо от ее покрытия клетками. В то же время добавление клеток мононуклеарной фракции крови в систему для культивирования эндотелиальных клеток в условиях пульсирующего потока (в количестве 1.25×10^5 клеток на 1 мл, что эквивалентно 1.5×10^6 клеток на модуль системы потока) позволяет исключить такую “псевдоадгезию” под действием силы тяжести и обеспечить достаточное количество адгезировавшихся к эндотелиальному монослою моноцитов и лимфоцитов. Визуализацию при таком методе анализа можно проводить при помощи флюоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе, используя любой альтернативный ядерный краситель (к примеру, CellTracker Green) для мечения клеток мононуклеарной фракции крови перед их добавлением в систему пульсирующего потока и стандартный ядерный краситель (к примеру, Hoechst 33342) для мечения клеток внутри камеры после остановки системы и ее извлечения непосредственно перед визуализацией. В таком дизайне

клетки мононуклеарной фракции крови дают и синее, и зеленое свечение (если использовать CellTracker Green), а эндотелиальные клетки – исключительно синее свечение. Для большей наглядности рекомендуется сочетать фазово-контрастную и флуоресцентную визуализацию на инвертированном микроскопе.

Хотя анализ адгезии клеток мононуклеарной фракции крови к эндотелиальным клеткам и является функциональным анализом с высокой степенью доказательности провоспалительной активации эндотелия, современные критерии доказательности патофизиологических экспериментов (отражаемые требованиями соответствующих научных журналов) также включают в себя измерение экспрессии генов и белков, ответственных за адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам. К таким генам целесообразно относить *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP*, кодирующие сосудистую молекулу клеточной адгезии, межклеточную молекулу клеточной адгезии, Е-селектин и Р-селектин соответственно. Оптимальным методом для измерения экспрессии данных генов являются различные варианты полимеразной цепной реакции (к примеру, ОТ-кПЦР или цифровая капельная ПЦР), а для измерения белков – иммуноблоттинг с использованием соответствующих антител (при этом количество молекул VCAM1 и ICAM1 существенно превышает количество Е-селектина, что позволяет использовать именно их в качестве маркеров провоспалительной активации). Альтернативной мерой измерения данных белков может быть полуколичественный анализ полученных при конфокальной микроскопии изображений, однако множественное использование такого метода в различных экспериментах не привело к удовлетворительным результатам. В отношении молекул клеточной адгезии рекомендуется использовать конфокальную микроскопию исключительно для качественного анализа их локализации в клетке (к примеру, в цитозоле или на плазматической мембране), но не для количественного анализа их экспрессии. Другим вариантом включения подобного варианта анализа дисфункции эндотелия в доказательную базу экспериментальной работы является обязательное сочетание результатов полуколичественного анализа конфокальных изображений с данными ОТ-кПЦР и иммуноблоттинга. Таким образом, полуколичественный анализ конфокальных изображений используется либо для изучения качественных феноменов (локализация объекта интереса внутри клетки, в том числе в ассоциации с конкретными органеллами), либо в качестве комплементарного (дополнительного), но не самостоятельного аналитического метода.

В отношении повышенного выделения эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов следует отметить, что их спектр не столь велик и включает в себя шесть основных молекул: интерлейкин (ИЛ)-6, ИЛ-8, моноцитарную хемоаттрактантную молекулу 1 (MCP-1/CCL2), CXCL1 (связанный с ростом онкоген, GRO-α), фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) и ингибитор активатора плазминогена (PAI-1, серпин E1) [23, 24]. Намного шире спектр выделяемых эндотелиальными клетками про- и антиангиогенных молекул [23, 24], при этом к про-ангиогенным молекулам относятся ангиопоэтин-1 [25, 26], растворимая форма рецептора к сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGFR2) [27, 28], ангиогенин [29, 30], эпидермальный фактор роста (EGF) [31, 32], плацентарный фактор роста (PlGF) [33, 34], тромбоцитарный фактор роста (вернее, его субъединицы PDGF-AA и PDGF-BB) [35, 36], основной фактор роста фибробластов (bFGF)[37, 38], эндотелин-1 [39, 40], пентраксин 3 [41, 42], дипептидилпептидаза 4 [43, 44], CD105/эндоглин [45, 46], фактор роста гепатоцитов (HGF) [47, 48], белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста – IGFBP-1 [49, 50], IGFBP-2 [51, 52] и IGFBP-3 [53, 54], CXCL16 [55, 56], трансформирующий фактор роста (TGF-β1) [57, 58], урокиназный активатор плазминогена (uPA) и соответствующий растворимый рецептор (uPAR) [59, 60], матриксная металлопротеиназа-1 (ММП-1) [60, 61], ИЛ-6 [62, 63], ИЛ-8 [64, 65] и MCP-1/CCL2 [66, 67], а к антиангиогенным –

ангиопоэтин-2 [68, 69], тромбоспондин-1 [70, 71], эндостатин [72, 73], тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП-1 [74, 75] и ТИМП-2 [76, 77]) и ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) [78, 79].

Методологически измерение цитокинов, про- и антиангиогенных факторов в культуральной среде с эндотелиальных клеток целесообразно осуществлять в первую очередь посредством скринингового полуколичественного профилирования при помощи дот-блоттинга (в настоящее время на рынке представлены специализированные наборы, позволяющие определение всех указанных выше цитокинов и абсолютного большинства из вышеуказанных про- и антиангиогенных белков). Скрининговое измерение молекул при помощи дот-блоттинга позволяет определить те из них, что являются дифференциально экспрессированными между экспериментальной и контрольной группами, и далее провести прицельный количественный анализ различий при помощи высокоточного иммуноферментного анализа. Если возможности провести дот-блоттинг нет (к примеру, вследствие отсутствия хемилюминесцентного сканера), для оценки провоспалительной активации эндотелиальных клеток следует измерить концентрацию ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2 в культуральной среде методом иммуноферментного анализа. Перед дот-блоттингом или иммуноферментным анализом следует провести низкоскоростное центрифугирование собранной среды (1000–3000 *g*) с целью очистки от клеточного дебриса.

Помимо собственно оценки выделения эндотелиальными клетками в микроокружение провоспалительных цитокинов как обязательного компонента провоспалительной активации эндотелия, для оценки патофизиологической значимости изменений секреторного профиля дисфункциональных эндотелиальных клеток также рекомендуется проведение экспериментов с кондиционированной (то есть инкубированной с эндотелиальными клетками и выбранным триггером дисфункции эндотелия) бессывороточной средой, которую не позднее чем через 24 ч следует добавить к интактным культурам эндотелиальных клеток не более чем на 24 ч для оценки ее патологического воздействия в сравнении с аналогичной средой, инкубированной с эндотелиальными клетками от того же донора без триггера дисфункции эндотелия. В том случае, если стоит задача по идентификации ответственного за патогенные эффекты паракринного компонента, после изначального эксперимента с полной кондиционированной средой целесообразно проведение повторного эксперимента с фракционированием кондиционированной среды (посредством ультрацентрифугирования) на внеклеточные везикулы и не содержащую внеклеточных везикул кондиционированную среду с их последующим раздельным добавлением к интактным культурам эндотелиальных клеток. Перед переносом кондиционированной среды от дисфункциональных эндотелиальных клеток к интактным следует провести ее низкоскоростное центрифугирование с целью очистки от клеточного дебриса для последующего объективного анализа паракринного воздействия кондиционированной среды.

Собственные исследования нашей группы показали, что добавление в систему пульсирующего потока кальципротеиновых частиц (также называемых в русскоязычной терминологии кальций-фосфатными бионами) приводит к их интернализации эндотелиальными клетками уже в течение часа, стабильно вызывает гибель небольшой, но статистически значимой доли (1–2%) эндотелиальных клеток в течение 4 ч вследствие патологической пермеабилизации лизосом и митохондрий и стимулирует выделение основных эндотелиальных провоспалительных цитокинов, указанных выше – ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2 [80, 81]. Это позволило рассматривать кальципротеиновые частицы как модельный триггер дисфункции эндотелия, пригодный для анализа основных патофизиологических звеньев ее развития.

Последующие эксперименты показали, что 4-часовое инкубирование первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии и внутренней грудной артерии с кальципротеиновыми частицами вызывает адгезию мононуклеарных клеток периферической крови к артериальным эндотелиальным клеткам в потоке, которая сопровождается повышением уровня указанных выше молекул клеточной адгезии VCAM1 и ICAM1 [82–84]. Кроме того, было выявлено, что как полная, так и очищенная от внеклеточных везикул кондиционированная среда, полученная от первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии в результате добавления к ним кальципротеиновых частиц, приводила к повышению экспрессии генов молекул клеточной адгезии *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* в сочетании с повышением экспрессии генов цитокинов *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF*, увеличению экспрессии рецепторов эндотелиальных клеток к лейкоцитам VCAM1 и ICAM1, а также усиленному выделению ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2 при ее добавлении к интактным культурам эндотелиальных клеток коронарной артерии от этого же донора. В то же время добавление внеклеточных везикул от обработанных кальципротеиновыми частицами эндотелиальных клеток не приводило к таким эффектам, указывая на ведущую роль растворимых факторов в развитии паракринной провоспалительной активации эндотелия. Поскольку сдвига секретируемых эндотелиальными клетками в окружающую среду про- и антиангиогенных факторов выявлено не было, было предположено, что из растворимых факторов главную патогенетическую роль в данном патофизиологическом сценарии играют именно провоспалительные цитокины (ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1/CCL2).

Таким образом, первым и самым главным критерием дисфункции эндотелия следует считать его провоспалительную активацию, которая может быть определена по трем критериям: 1) повышенной адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам при их совместном культивировании в условиях пульсирующего потока, сопровождающейся повышением экспрессии белков *VCAM1* и *ICAM1*, а также соответствующих генов; 2) повышенному выделению трех основных эндотелиальных провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2 в микроокружение; 3) доказанной патогенности паракринного воздействия эндотелиальных клеток (к примеру, способностью кондиционированной ими среды вызывать развитие дисфункции эндотелия в интактных клеточных культурах).

Нарушения эндотелиальной механотрансдукции

Еще одним аспектом патофизиологии эндотелия, невозможным к изучению в статических условиях культивирования, являются нарушения эндотелиальной механотрансдукции (трансформации механического воздействия, в данном случае потока, в биохимические сигналы). Механотрансдукция играет чрезвычайно важную роль в физиологии эндотелия *in vivo*, что отражается восприимчивостью сосудистых сегментов с турбулентным кровотоком (к примеру, дуга аорты) к атеросклерозу в сравнении с сосудистыми сегментами с ламинарным кровотоком (к примеру, нисходящая аорта) [16–18]. Помимо множества механосенсоров, в число которых входят рецепторы VEGFR2 [85, 86], Tie2 [87] и PECAM-1/CD31 [88, 89], интегрины и связанные с ними очаги адгезии [90–93], белки межклеточных контактов VE-кадгерин и окклюдин [85, 89, 94], активируемые растяжением ионные каналы [95, 96], трансмембранные протеогликаны [97], G-белок-связанные рецепторы [98], гетеротримерные G-белки [99, 100], гликокаликс [101, 102], кавеолин-1 и кавеолы [103, 104], первичные реснички [105, 106], промежуточные филаменты [107, 108] и актиновый цитоскелет [109–111], передача сигнала от механосенсоров осуществляется через ряд специализированных транскрипционных факторов: KLF2 [112–114], KLF4 [115–117], NRF2 [118, 119], YAP и TAZ [120, 121]. При этом

три из данных факторов (KLF2, KLF4 и NRF2) являются атеропротективными [113–116, 118, 119, 122–131], а два (YAP и TAZ) – атерогенными [120, 121, 131–134].

Функция атерогенных транскрипционных факторов YAP и TAZ в значительной степени регулируется на посттрансляционном уровне посредством фосфорилирования (которое провоцирует их секвестрирование в цитозоле и деградацию данных белков посредством убиквитинирования с последующим транспортом в протеасомы), что отражает необходимость оценки не только общей, но и фосфорилированной формы данных молекул посредством иммуноблоттинга с их последующим сравнением относительно друг друга. Другим вариантом анализа активности атерогенных транскрипционных факторов YAP и TAZ могла бы быть оценка относительного содержания общей и фосфорилированной формы данных факторов в цитозоле и ядре методом иммуноблоттинга после фракционирования клеток. К сожалению, такой способ, хотя и является объективным, требует значительного количества клеточной массы, невозможной к получению в культуральных проточных камерах, а в статических условиях оценить нарушения эндотелиальной механотрансдукции возможным не представляется. Попытки оценки сравнительной интенсивности флуоресцентного сигнала общей и фосфорилированной формы YAP и TAZ в цитозоле и ядре при иммуноокрашивании также (по собственному опыту авторов) не привели к объективному результату; тем не менее, нельзя исключать их комплементарной (но не самостоятельной) доказательной мощности. При оценке нарушений эндотелиальной механотрансдукции, сопровождающей дисфункцию эндотелия, следует помнить об иррелевантности измерения генной экспрессии в том случае, если функциональность белка главным образом управляется посредством его посттрансляционных модификаций. К примеру, экспрессия генов *YAP1* и *WWTR1*, кодирующих транскрипционные факторы YAP1 и TAZ соответственно, никак не связана с тем, подвергаются ли далее данные белки фосфорилированию и деградации в протеасомах.

Вполне естественно, что при отсутствии внешних биомеханических воздействий, за исключением контакта эндотелиальных клеток друг с другом, даже при полностью конфлюэнтном монослое надлежащее моделирование эндотелиальной механотрансдукции представляется затруднительным. В то же время при культивировании в системе пульсирующего потока соблюдаются сразу несколько условий для физиологичного моделирования эндотелиальной механотрансдукции: постоянное воздействие однонаправленного пульсирующего потока с регулируемым напряжением сдвига, постепенная элонгация эндотелиальных клеток вдоль направления потока и обеспечение контактов эндотелиальных клеток внутри монослоя друг с другом за счет их элонгации даже при изначально неполной конфлюэнтности.

Эксперименты с модельным триггером дисфункции эндотелия – кальципротеиновыми частицами показали, что интернализация КФБ приводила к снижению экспрессии механочувствительных атеропротективных транскрипционных факторов KLF2 и KLF4, также снижая степень фосфорилирования атерогенного транскрипционного фактора YAP1 и приводя таким образом к его активации, подавляемой в физиологических условиях. При этом данные эффекты наблюдались как в культурах первичных эндотелиальных клетках коронарной и внутренней грудной артерии, так и в эндотелии различных аортальных сегментов крыс (нисходящая аорта и дуга аорты). Особенно выражены указанные нарушения были в характеризующейся турбулентным кровотоком дуге аорты, где белок Yap1 был гипофосфорилирован в обоих изученных участках (серин-127 и серин-397), и также был гипофосфорилирован белок Taz, что отражало резистентность этих двух атерогенных транскрипционных факторов к деградации. Таким образом, и инкубированные с кальципротеиновыми частицами культуры эндотелиальных клеток, и эндотелий аорты подвергшихся внутривенному введению кальципротеиновых частиц крыс имели “молекулярные отпечатки” нарушенной механотрансдукции.

При попытке формулировки критериев дисфункции эндотелия следует упомянуть об отсутствии какого-либо функционального анализа (аналогичного анализу адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам) или какого-либо выделяемого в микроокружение биомаркера, позволяющего сделать однозначный вывод о развитии нарушений эндотелиальной механотрансдукции. Тем не менее, ее признаками при молекулярном профилировании эндотелиальных клеток могут являться снижение экспрессии атеропротективных транскрипционных факторов KLF2, KLF4 и NRF2 и кодирующих их генов (*KLF2*, *KLF4*, *NFE2L2*), а также гипофосфорилирование атерогенных транскрипционных факторов YAP1 и TAZ, приводящее к их активации. Вопрос о том, какие из этих изменений являются наиболее патофизиологически значимыми, является дискуссионным, поэтому представляется разумным определять нарушения эндотелиальной механотрансдукции как сочетание снижения экспрессии атеропротективных транскрипционных факторов и активирующего гипофосфорилирования атерогенных транскрипционных факторов. В соответствии с таким определением нарушение эндотелиальной механотрансдукции может быть обозначено как один из главных критериев дисфункции эндотелия.

Эндотелиально-мезенхимальный переход

Не менее важным аспектом дисфункции эндотелия является эндотелиально-мезенхимальный переход, сопровождающий развитие атеросклероза и способствующий потере ориентации эндотелиальных клеток, дезинтеграции межклеточных контактов, повышению экспрессии ими молекул клеточной адгезии и переходу на синтетический фенотип [135–139]. Эндотелиально-мезенхимальный переход сопровождается постепенным снижением экспрессии эндотелиальных маркеров (PECAM-1/CD31, VE-кадгерин/CD144, VEGFR2/KDR/CD309) и повышением экспрессии мезенхимальных маркеров (N-кадгерин/CD325, альфа-актин гладких мышц, виментин, кальпонин, SM22α, фибробласт-ассоциированный белок, фибробласт-специфичный белок) и регулируется транскрипционными факторами Snail, Slug, Twist1, Gata4 и Zeb1 [137, 139–141]. Экспрессия транскрипционного фактора Gata4 в эндотелиальных клетках человека вызывает вопросы, в то время как остальные четыре указанных транскрипционных фактора обнаруживаются в них в значительном количестве как на уровне транскриптов, так и на уровне белков.

Наиболее важными из них являются Snail и Slug, которые представляют собой два эволюционно родственных транскрипционных фактора (о чем говорят названия их генов *SNAI1* и *SNAI2*), вследствие чего при иммуноблоттинге могут быть детектированы одним из представленных на рынке антител, распознающим характерный для обоих данных транскрипционных факторов эпитоп. Впрочем, данное антитело является поликлональным, в то время как современные требования к специфичности иммуноблотов все же рекомендуют использование моноклональных антител для минимизации их неспецифического связывания. Тем не менее, различие молекулярных масс транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода в теории позволяет одновременно оценивать уровень экспрессии Snail/Slug (или Twist1), которые, как правило, локализуются на молекулярных массах до 50 кДа, и транскрипционного фактора Zeb1, который может определяться на молекулярной массе в 200 кДа.

Помимо иммуноблоттинга, объективная оценка развития эндотелиально-мезенхимального перехода также может быть проведена при помощи анализа генной экспрессии (поскольку активность транскрипционных факторов или маркеров данного процесса не зависит от посттрансляционных модификаций). При этом в первую очередь наблюдается изменение экспрессии генов транскрипционных факторов, управляющих эндотелиально-мезенхимальным переходом, а именно

SNAI1, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1*, хотя дифференциальная экспрессия каждого из них существенно зависит от типа сосудистого эндотелия (клеточной линии в случае экспериментов *in vitro* и сосудистого сегмента в случае экспериментов *in vivo*). Изменение экспрессии самих маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода происходит уже значительно позже и служит сигналом идущей трансдифференцировки. Наиболее убедительным доказательством такой трансдифференцировки, вероятно, является иммунофлуоресцентное окрашивание, которое качественно свидетельствует о приобретении экспрессии эндотелиальными клетками мезенхимальных маркеров (при условии аналогичного доказательства их отсутствия на начальном этапе эксперимента). Классическим примером такого окрашивания может служить сочетанное окрашивание на маркер эндотелиальных клеток PECAM-1/CD31 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток альфа-актин гладких мышц, а также на другой маркер эндотелиальных клеток VE-кадгерин/CD144 и маркер мезенхимальных клеток N-кадгерин/CD325. Актуальность иммунофлуоресцентного окрашивания для определения эндотелиально-мезенхимального перехода, вероятно, также делает возможным доказательство его реализации *in vivo* при диссекции цельного сегмента аорты, его окрашивании первичными и вторичными флуоресцентно меченными антителами и последующей *en face*-визуализации (интимой вверх). Такой способ позволит отличить клетки с выраженным эндотелиальным фенотипом ($CD31^{+}\alpha SMA^{-}$ или $CD144^{+}CD325^{-}$) от клеток со смешанным ($CD31^{+}\alpha SMA^{+}$ или $CD144^{+}CD325^{+}$) или чисто мезенхимальным ($CD31^{-}\alpha SMA^{+}$ или $CD144^{-}CD325^{+}$) фенотипом и, в силу своего качественного характера, даст техническую возможность провести количественный подсчет клеток с переходным или мезенхимальным фенотипом. В отношении секретома подвергшихся или подвергающихся эндотелиально-мезенхимальному переходу (важно рассматривать данный процесс как континуум, а не дискретный переход между двумя состояниями) эндотелиальных клеток следует сказать, что практическая оценка выделяемых ими в этом состоянии в микроокружение растворимых факторов в клеточных культурах достаточно затруднительна в силу длительности процесса (1–2 нед.) и не является приоритетным способом анализа эндотелиально-мезенхимального перехода в сравнении с иммунофлуоресцентным окрашиванием.

В отношении искусственного моделирования дисфункции эндотелия было выявлено, что пролонгированное внутривенное введение кальципротеиновых частиц крысам Wistar инициирует эндотелиально-мезенхимальный переход, повышая экспрессию его транскрипционных факторов Snail, Slug и Twist1 в эндотелии различных аортальных сегментов (нисходящая аорта и дуга аорты). Динамика генной и белковой экспрессии позволила сделать вывод о том, что эндотелиально-мезенхимальный переход при воздействии КФБ развивается постепенно, а повышенная экспрессия генов его транскрипционных факторов (*SNAI1*, *SNAI2* и *ZEB1*) после интернализации КФБ предшествует последующей гиперэкспрессии белков Snail, Slug и Twist1, регулирующих смену эндотелиального фенотипа на мезенхимальный.

Таким образом, к критериям эндотелиально-мезенхимального перехода можно отнести: 1) приобретение экспрессии маркеров мезенхимального фенотипа (к которым в первую очередь можно отнести N-кадгерин и альфа-актин гладких мышц); 2) повышение экспрессии не менее трех из четырех соответствующих транскрипционных факторов (Snail, Slug, Twist1 и Zeb1). Собственно эндотелиально-мезенхимальный переход также следует определять как континуум событий, а не как уже свершившийся факт приобретения эндотелиальными клетками мезенхимального фенотипа. Поскольку эндотелиально-мезенхимальный переход ассоциирован с обоими звеньями провоспалительной активации эндотелия (адгезией лейкоцитов к эндотелиальным клетками и выделением провоспалительных цито-

кинов [83, 142, 143]) и индуцируется хроническим воспалением [144, 145], турбулентным потоком [135] и нарушениями эндотелиальной механотрансдукции [146, 147] эндотелиально-мезенхимальный переход также можно рассматривать в качестве обязательного критерия дисфункции эндотелия.

Нарушение биосинтеза и выделения монооксида азота (NO)

Одним из ключевых аспектов дисфункции эндотелия является снижение способности эндотелиальных клеток вырабатывать монооксид азота (NO), являющийся ключевым вазодилататором. С методологической точки зрения можно выделить четыре этапа, на которых возможна косвенная оценка выделения NO: транскрипция гена ключевого фермента этого процесса эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*), синтез данного белка в эндотелиальных клетках в результате трансляции на рибосомах, функционально значимое посттрансляционное модифицирование данного фермента (в число таких посттрансляционных модификаций входят ингибирующее активность данного фермента фосфорилирование в позиции треонин-495 и повышающее его активность фосфорилирование в позициях серин-113 и серин-1177), а также собственно синтез NO, отражаемый количеством продуктов его метаболизма – нитратов (NO_3) и нитритов (NO_2), поскольку собственно молекула NO существует после своего биосинтеза лишь несколько секунд. Помимо оценки компонентов цепи синтеза NO, при оценке дисфункции эндотелия важным является также анализ функциональной активности активных форм азота (reactive nitrogen species), в частности, пероксинитрита ($ONOO^-$), образующегося при расцеплении сигнального пути эндотелиальной NO-синтазы, когда данный фермент “переключается” на синтез супероксида ($O_2^{\bullet-}$) вместо NO. Пероксинитрит ($ONOO^-$) в таком случае образуется из супероксида, генерируемого при расцеплении сигнального пути эндотелиальной NO-синтазы, и синтезируемого свободного NO. Другими активными формами азота являются $^{\bullet}NO_2$ и N_2O_3, образующиеся при реакциях пероксинитрита ($ONOO^-$) с другими химическими соединениями. Все активные формы азота также имеют очень короткий период жизни, и маркером вызываемого ими нитрозирующего стресса (по аналогии с индуцируемым активными формами кислорода окислительным стрессом) является 3-нитротирозин, который может быть детектирован при иммуноблоттинге при помощи соответствующего антитела. Кроме того, поскольку нитрозирующий стресс неразрывно связан с окислительным стрессом через избыточный синтез супероксида при расцеплении сигнального пути NO-синтазы, при комплексном анализе дисфункции эндотелия также целесообразен анализ функциональной активности активных форм кислорода посредством измерения концентрации продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (TBARS), включающих в себя малондиальдегид, 8-изопростан и 4-гидроксиноненаль и являющихся продуктами метаболизма свободных радикалов (в первую очередь супероксида $O_2^{\bullet-}$, пероксида водорода H_2O_2, гидроксил-радикала $^{\bullet}OH$ и синглетного кислорода $^1[O_2]$).

При измерении транскрипции гена *NOS3* у человека важно помнить о четырех изоформах данного фермента, которые должны детектироваться при помощи единого праймера. При оценке посттрансляционных модификаций данного белка принципиальную значимость имеет сравнение относительного количества его общей формы, а также ингибирующих и активирующих фосфорилированных форм. В отличие от транскрипционных факторов эндотелиальной механотрансдукции YAP и TAZ, фосфорилированные формы которых относительно легко определяются в лизате эндотелиальных клеток, детекция фосфорилированных форм NO-синтазы в лизате клеточных культур *in vitro* (в отличие от лизата эндотелия *in vivo*) достаточно затруднительна и требует большого количества загружаемого для иммуноблоттинга белка в со-

четании с малым разведением соответствующих первичных антител. Измерение нитратов и нитритов как продуктов метаболизма выделяемого эндотелиальными клетками NO в культуральной среде, а также измерение продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой как продуктов метаболизма выделяемых ими в культуральную среду активных форм кислорода может быть проведено посредством колориметрического анализа при помощи соответствующих наборов. Поскольку детекция нитратов, нитритов и продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой в культуральной среде также требует их определенной концентрации в ней (по аналогии с белковыми или пептидными растворимыми факторами), подобные эксперименты по моделированию дисфункции эндотелия рекомендуется проводить в статических условиях, с бессывороточной культуральной средой (для предотвращения контаминации нитратами, нитритами и активными формами кислорода из сыворотки), после не менее чем 24 ч инкубации эндотелиальных клеток с триггером дисфункции эндотелия для накопления достаточного количества молекул и после низкоскоростного центрифугирования для очищения анализируемой культуральной среды от клеточного дебриса.

Добавление модельного триггера дисфункции эндотелия – кальципротеиновых частиц к культурам эндотелиальных клеток в системе пульсирующего потока *in vitro* вызывало снижение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и соответствующего гена *NOS3*. Также было выявлено, что эндотелий нормолипидемических и нормотензивных крыс Wistar при регулярном внутривенном введении кальципротеиновых частиц характеризовался относительным повышением экспрессии фосфорилированной формы эндотелиальной NO-синтазы в позиции треонин-495 (отражающей ингибирование активности данного фермента), а также 3-нитротирозина (отражающего возникающий при “расцеплении” сигнального пути эндотелиальной NO-синтазы нитрозирующий стресс) в нисходящей аорте. Данные результаты свидетельствовали о выраженных нарушениях функционирования эндотелиальной NO-синтазы в результате интернализации кальципротеиновых частиц, подтверждая справедливость их использования для моделирования дисфункции эндотелия.

Определение нарушений биосинтеза и выделения NO достаточно сложно вследствие многокомпонентности его составляющих (к примеру, измерение уровня нитратов, нитритов и продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой *in vivo* не будет отражать дисфункцию эндотелия в каком-либо конкретном сосуде), при этом отсутствие патологических изменений в каком-либо из компонентов цепи биосинтеза NO (к примеру, ингибирующих посттрансляционных модификаций) не обязательно говорит об отсутствии снижения выделения NO эндотелиальными клетками. Дополнительную сложность придает возможность расцепления сигнального пути NO-синтазы, при котором даже при нормальном уровне и функционировании данного фермента выделение NO эндотелиальными клетками является сниженным и сопровождается нитрозирующим и окислительным стрессом. Наиболее разумным представляется вариант, при котором нарушение биосинтеза NO определяется как по собственно детектируемому снижению NO в микроокружении эндотелиальных клеток (более актуально для экспериментов *in vitro*), так и по снижению экспрессии гена *NOS3* и кодируемой им эндотелиальной NO-синтазы, а также повышению соотношения ее фосфорилированной формы в позиции треонин-495 к общей фракции данного фермента. Сопутствующими при этом являются полуколичественное или количественное измерение содержания 3-нитротирозина и продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой. Как было указано выше, нарушение биосинтеза и выделения NO является обязательным компонентом дисфункции эндотелия.

Нарушение целостности эндотелия

Завершающим компонентом дисфункции эндотелия, предлагаемым к рассмотрению, является патологическое повышение проницаемости эндотелиального мо-

нослоя в результате нарушения его целостности, следствием чего *in vivo* наблюдается проникновение атерогенных липопротеинов, цитокинов и иммунных клеток в интиму. Обязательным условием для моделирования данного патологического процесса, наиболее тесно относящегося к церебральному эндотелию (вследствие важности обеспечения полупроницаемости гематоэнцефалического барьера для целостности тканей центральной нервной системы), также является воздействие на эндотелиальные клетки пульсирующего потока.

Патологическое повышение проницаемости эндотелия можно смоделировать при помощи добавления плазмы крови от пациентов с изучаемой патологией или культуральной среды, насыщенной триггером дисфункции эндотелия, в систему пульсирующего потока, связанную с заселенной эндотелиальными клетками (и при необходимости покрытой коллагеном IV типа для имитации базальной мембраны) культуральной проточной камерой. После необходимого времени инкубации эндотелиальные клетки внутри контрольной и экспериментальной камер могут быть окрашены антителами к VE-кадгерину (маркер не только эндотелиальных клеток, но и межклеточных контактов, окрашивание на который позволяет оценить целостность эндотелиального монослоя) и F-актину (маркеру ориентации цитоскелета, по которому можно судить о физиологических и патологических изменениях геометрии клетки). Соответственно нарушение целостности эндотелия при конфокально-микроскопической визуализации будет определено как потеря межклеточных контактов (по окрашиванию антителами к VE-кадгерину) и потеря элонгации эндотелиальных клеток (по окрашиванию антителами к F-актину). Автоматизированный анализ изменений клеточной геометрии может быть проведен при помощи плагинов Directionality и OrientationJ в программе ImageJ.

Классическим способом для оценки нарушения целостности эндотелия *in vivo* является прижизненное окрашивание синим Эванса (Evans Blue) – красителем, связывающимся с альбумином, высокомолекулярным белком, в норме не проникающим в ткани через сохраняющий свою целостность эндотелий. При нарушении целостности эндотелия альбумин может проникать в интиму (либо через гематоэнцефалический барьер) и связываться с белками и протеогликанами межклеточного матрикса, что отражается синим окрашиванием сосудов после их эксплантации (в норме они остаются нативного цвета, поскольку окрашенный синим Эванса альбумин не в состоянии проникнуть через интактный эндотелий).

Несмотря на очевидные патофизиологические последствия нарушения целостности эндотелия, она является скорее следствием, чем обязательным компонентом дисфункции эндотелия. К примеру, при моделировании дисфункции эндотелия посредством добавления кальципротеиновых частиц в систему пульсирующего потока или их внутривенного введения лабораторным животным было показано, что, несмотря на их определенную токсичность (статистически значимая гибель 1–2% эндотелиальных клеток) и способность вызывать все вышеуказанные звенья дисфункции эндотелия (его провоспалительную активацию, нарушения эндотелиальной механотрансдукции, эндотелиально-мезенхимальный переход и нарушения биосинтеза NO), выраженности данных патологических эффектов при таком сценарии недостаточно для нарушения целостности эндотелиального монослоя в культуральных проточных камерах. Кроме того, несмотря на свою способность индуцировать формирование неоинтимы и развитие адвентициального и околососудистого воспаления, регулярное внутривенное введение кальципротеиновых частиц также не приводило к нарушениям целостности эндотелия по результатам прижизненного окрашивания альбумина синим Эванса (и наличии соответствующего положительного контроля в результате баллонной ангиопластики).

Протромботическая активация эндотелия

Следует отметить также важность протромботической активации эндотелия, особенно важной в контексте COVID-19 [148–150], основными маркерами которой являются патологически повышенное выделение фактора фон Виллебранда и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) в сочетании со сниженным выделением различных активаторов плазминогена (uPA и tPA). Безусловно, она также может (и должна) быть отнесена к признакам дисфункции эндотелия, однако в силу отсутствия подобных экспериментов у авторов более подробное обсуждение в данной статье возможным не представляется, поскольку ее целью является методологическое и концептуальное обсуждение критериев дисфункции эндотелия с целью ее четкого определения именно на основе практического опыта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Говоря об определении и о критериях дисфункции эндотелия, представляется важным подчеркнуть многогранность данного феномена, затрагивающего не только биосинтез NO, а практически все аспекты физиологии эндотелия. В частности, критериями дисфункции эндотелия являются:

1. Провоспалительная активация, определяемая по выраженной адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам (сопровождающейся повышением экспрессии белков VCAM1 и ICAM1 и кодирующих их генов), повышенному выделению основных эндотелиальных провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2) и патогенности паракринного воздействия дисфункциональных эндотелиальных клеток в эксперименте.

2. Нарушения эндотелиальной механотрансдукции, определяемые как сочетание снижения экспрессии атеропротективных транскрипционных факторов (KLF2, KLF4 и NRF2) и активирующего гипофосфорилирования атерогенных транскрипционных факторов (YAP и TAZ).

3. Эндотелиально-мезенхимальный переход, определяемый как континуум приобретения экспрессии маркеров мезенхимального фенотипа (в первую очередь N-кадгерина и альфа-актина гладких мышц) на фоне повышения экспрессии не менее трех из четырех ответственных за этот процесс транскрипционных факторов (Snail, Slug, Twist1 и Zeb1).

4. Нарушение биосинтеза NO, определяемое как по собственно детектируемому снижению продуктов метаболизма NO в микроокружении эндотелиальных клеток (более актуально для экспериментов *in vitro*), так и по снижению экспрессии гена *NOS3* и кодируемой им эндотелиальной NO-синтазы, а также повышению соотношения ее фосфорилированной формы в позиции треонин-495 к общей фракции данного фермента.

5. Протромботическая активация эндотелия, отражаемая патологическим повышением выделения фактора фон Виллебранда и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) в сочетании со сниженным выделением различных активаторов плазминогена (uPA и tPA).

6. В качестве дополнительного критерия, абсолютно подтверждающего развитие дисфункции эндотелия – нарушение его целостности, характеризующееся патологическим повышением его проницаемости.

Таким образом, дисфункцию эндотелия целесообразно определять как комплексное патологическое изменение его физиологии, включающее в себя патофизиологически значимую провоспалительную и протромботическую активацию эндотелиальных клеток, нарушения эндотелиальной механотрансдукции, эндотелиально-мезенхимальный переход и нарушение биосинтеза NO. В отношении системных биомаркеров дисфункции эндотелия *in vivo* стоит отметить, что до насто-

Таблица 1. Предлагаемая панель для скрининга дисфункции эндотелия методом ОТ-кПЦР

Ген, кодирующий молекулу-маркер дисфункции эндотелия	Молекула-маркер дисфункции эндотелия	Звено дисфункции эндотелия, отражаемое молекулой-маркером
VCAM1	Сосудистая молекула клеточной адгезии	Провоспалительная активация эндотелия (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов)
ICAM1	Межклеточная молекула клеточной адгезии	
SELE	E-селектин	
SELP	P-селектин	
IL6	Интерлейкин-6	Провоспалительная активация эндотелия (эндотелиальные провоспалительные цитокины)
CXCL8	Интерлейкин-8	
CCL2	Моноцитарный хемоаттрактантный белок	
CXCL1	Связанный с ростом онкоген, GRO-α	
MIF	Фактор ингибирования миграции макрофагов	
KLF2	Транскрипционный фактор KLF2	Нарушения эндотелиальной механотрансдукции (только в условиях потока)
KLF4	Транскрипционный фактор KLF4	
NFE2L2	Транскрипционный фактор NRF2	
SNAI1	Транскрипционный фактор Snail	Эндотелиально-мезенхимальный переход
SNAI2	Транскрипционный фактор Slug	
TWIST1	Транскрипционный фактор Twist1	
ZEB1	Транскрипционный фактор Zeb1	
CDH5	VE-кадгерин	
CDH2	N-кадгерин	
NOS3	Эндотелиальная NO-синтаза	Нарушение синтеза NO
VWF	Фактор фон Виллебранда	Протромботическая активация эндотелия
SERPINE1	Ингибитор активатора плазминогена	
PLAU	Урокиназный активатор плазминогена	
PLAT	Тканевой активатор плазминогена	

ящего времени не было выявлено ни одного надежного биомаркера, который мог бы однозначно свидетельствовать о ее развитии. Доказательными и чувствительными маркерами дисфункции эндотелия *in vitro* являются ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1/CCL2, однако данные провоспалительные цитокины также вырабатываются и другими клеточными популяциями (к примеру, различными типами лейкоцитов) и поэтому не являются специфичными для сценария *in vivo*.

В качестве молекул для скрининга дисфункции эндотелия в эксперименте рекомендуется использовать гены *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов), *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF* (основные эндотелиальные провоспалительные цитокины), *KLF2*, *KLF4* и *NFE2L2* (механочувствительные атеропротективные транскрипционные факторы – исключительно в условиях потока), *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *CDH5* и *CDH2* (транскрипционные факторы и маркеры эндотелиально-мезенхимального перехода), *NOS3* (ген эндотелиальной NO-синтазы), *VWF*, *SERPINE1*, *PLAU* и *PLAT* (факторы эндотелий-зависимого гемостаза), а также соответствующие белки, кодируемые данными генами (табл. 1). В таком экспериментальном дизайне повышенная экспрессия генов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* в сочетании с повышенной экспрессией генов *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF* свидетельствует о провоспалительной активации эндотелиальных клеток, сниженная экспрессия генов *KLF2*, *KLF4* и *NFE2L2* (в условиях потока) является индикатором нарушенной механотрансдукции, повышенная экспрессия генов *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1* в сочетании со сниженной экспрессией гена VE-кадгерина *CDH5* и повышенной экспрессией гена N-кадгерина *CDH2* говорит об эндотелиально-мезенхимальном переходе, сниженная

Таблица 2. Верификационная панель дисфункции эндотелия

Молекула-маркер дисфункции эндотелия	Метод верификации	Звено дисфункции эндотелия, отражаемое молекулой-маркером
Сосудистая молекула клеточной адгезии	Иммуноблоттинг (клеточный лизат)	Провоспалительная активация эндотелия (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов)
Межклеточная молекула клеточной адгезии		
E-селектин		
P-селектин		
Интерлейкин-6	Иммуноферментный анализ (культуральная среда)	Провоспалительная активация эндотелия (эндотелиальные провоспалительные цитокины)
Интерлейкин-8		
Моноцитарный хемоаттрактантный белок		
Связанный с ростом онкоген, GRO-α		
Фактор ингибирования миграции макрофагов		
Транскрипционный фактор KLF2	Иммуноблоттинг (клеточный лизат)	Нарушения эндотелиальной механотрансдукции (только в условиях потока)
Транскрипционный фактор KLF4		
Транскрипционный фактор NRF2		
Транскрипционный фактор YAP1 (общая фракция и активирующее фосфорилирование в позициях серин-109, серин-127 и серин-397)		
Транскрипционный фактор TAZ (общая фракция и активирующее фосфорилирование в позиции серин-89)		
Транскрипционный фактор Snail	Иммуноблоттинг (клеточный лизат)	Эндотелиально-мезенхимальный переход
Транскрипционный фактор Slug		
Транскрипционный фактор Twist1		
Транскрипционный фактор Zeb1		
VE-кадгерин		
N-кадгерин		
Эндотелиальная NO-синтаза (общая фракция, ингибирующее фосфорилирование в позиции треонин-495 и активирующее фосфорилирование в позициях серин-113 и серин-1177)	Иммуноблоттинг (клеточный лизат)	Нарушение синтеза NO и расцепление пути NO-синтазы, нитрозирующий стресс, окислительный стресс
3-нитротирозин		
Уровень нитратов и нитритов	Колориметрический анализ (культуральная среда)	
Уровень продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой		
Фактор фон Виллебранда	Иммуноблоттинг (клеточный лизат), иммуноферментный анализ (культуральная среда)	Протромботическая активация эндотелия
Ингибитор активатора плазминогена		
Урокиназный активатор плазминогена		
Тканевой активатор плазминогена		

экспрессия гена *NOS3* указывает на нарушенную способность эндотелиальных клеток выделять основной вазодилататор NO, а повышенная экспрессия генов *VWF* и *SERPINE1* в сочетании со сниженной экспрессией генов *PLAU* и *PLAT* является индикатором протромботической активации эндотелия. Аналогичное утверждение справедливо и для кодируемых данными генами белков, однако оптимальным подходом представляется предварительный скрининг указанных генов при помощи ОТ-кПЦР в силу относительно низкой стоимости и технической сложности данного метода. В случае выявления вышеуказанных признаков дисфункции эндотелия возможна их верификация при помощи иммуноблоттинга (если речь идет о клеточных белках) или иммуноферментного анализа (в случае провоспалительных цитокинов) либо расширенное профилирование посредством полнотранскриптомного секвенирования или жидкостной хромато-масс-спектрометрии (табл. 2).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2021-001 “Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза и комплексных цифровых решений на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и определения риска летального исхода” при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта “Наука и университеты”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и концептуальный анализ – А.Г.К., критический анализ собственного опыта – А.Г.К., Д.К.Ш., Е.А.В., М.Ю.С., А.В.С., анализ литературных данных – Е.А.В., М.Ю.С., А.В.С., В.Е.М., написание статьи – А.Г.К., Д.К.Ш.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Scioli MG, Storti G, D’Amico F, Rodríguez Guzmán R, Centofanti F, Doldo E, Céspedes Miranda EM, Orlandi A* (2020) Oxidative Stress and New Pathogenetic Mechanisms in Endothelial Dysfunction: Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. J Clin Med 9(6): 1995. https://doi.org/10.3390/jcm9061995
2. *Liao JK* (2013) Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. J Clin Invest 123(2): 540–541. https://doi.org/10.1172/JCI66843
3. *Mauricio MD, Aldasoro M, Ortega J, Vila JM* (2013) Endothelial dysfunction in morbid obesity. Curr Pharm Des 19(32): 5718–5729. https://doi.org/10.2174/1381612811319320007
4. *Pomilio M, Mohn A, Verrotti A, Chiarelli F* (2002) Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab 15(4): 343–361. https://doi.org/10.1515/jpem.2002.15.4.343
5. *Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C* (2014) Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. Arthritis Res Ther 16(1): 202. https://doi.org/10.1186/ar4450
6. *Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G* (2006) Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. Nutr Metab Cardiovasc Dis 16(3): 222–233. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.11.012
7. *Prati C, Demougeot C, Guillot X, Godfrin-Valnet M, Wendling D* (2014) Endothelial dysfunction in joint disease. Joint Bone Spine 81(5): 386–391. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.01.014
8. *Simonsen U, Rodriguez-Rodriguez R, Dalsgaard T, Buus NH, Stankevicius E* (2009) Novel approaches to improving endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilatation. Pharmacol Rep 61(1) :105–115. https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70012-x
9. *Bertani F, Di Francesco D, Corrado MD, Talmon M, Fresu LG, Boccafoschi F* (2021) Paracrine Shear-Stress-Dependent Signaling from Endothelial Cells Affects Downstream Endothelial Function and Inflammation. Int J Mol Sci 22(24): 13300. https://doi.org/10.3390/ijms222413300
10. *Ding H, Triggle CR* (2010) Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. Pflugers Arch 459(6): 977–994. https://doi.org/10.1007/s00424-010-0807-3
11. *O'Riordan E, Chen J, Brodsky SV, Smirnova I, Li H, Goligorsky MS* (2005) Endothelial cell dysfunction: the syndrome in making. Kidney Int 67(5): 1654–1658. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00256.x
12. *Goligorsky MS* (2005) Endothelial cell dysfunction: can’t live with it, how to live without it. Am J Physiol Renal Physiol 288(5): F871–F880. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00333.2004

13. *Pierce RW, Giuliano JS, Whitney JE, Ouellette Y; Pediatric Organ Dysfunction Information Update Mandate (PODIUM) Collaborative* (2022) Endothelial Dysfunction Criteria in Critically Ill Children: The PODIUM Consensus Conference. Pediatrics 149(1 Suppl 1): S97–S102. https://doi.org/10.1542/peds.2021-052888O
14. *Soerensen M, Debrabant B, Halekoh U, Møller JE, Hassager C, Frydland M, Hjelmborg J, Beck HC, Rasmussen LM* (2021) Does diabetes modify the effect of heparin on plasma proteins? – A proteomic search for plasma protein biomarkers for diabetes-related endothelial dysfunction. J Diabetes Complications 35(6): 107906. https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.107906
15. *Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL* (2008) Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 10(9): 1631–1674. https://doi.org/10.1089/ars.2007.2013
16. *Cahill PA, Redmond EM* (2016) Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis 248:97–109. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007
17. *Jensen HA, Mehta JL* (2016) Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. Expert Rev Cardiovasc Ther 14(9): 1021–1033. https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1207527
18. *Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G* (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circ Res 118(4): 620–636. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
19. *Hyun YM, Lefort CT, Kim M* (2009) Leukocyte integrins and their ligand interactions. Immunol Res 45(2–3): 195–208. https://doi.org/10.1007/s12026-009-8101-1
20. *McEver RP* (2015) Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. Cardiovasc Res 107(3): 331–339. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv154
21. *Allen S, Moran N* (2015) Cell Adhesion Molecules: Therapeutic Targets for Inhibition of Inflammatory States. Semin Thromb Hemost 41(6): 563–571. https://doi.org/10.1055/s-0035-1556588
22. *Dustin ML* (2019) Integrins and Their Role in Immune Cell Adhesion. Cell 177(3): 499–501. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.038
23. *Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutikhin A* (2020) Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. Int J Mol Sci 21(21): 8032. https://doi.org/10.3390/ijms21218032
24. *Kutikhin AG, Tupikin AE, Matveeva VG, Shishkova DK, Antonova LV, Kabilov MR, Velikanova EA* (2020) Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. Cells 9(4): 876. https://doi.org/10.3390/cells9040876
25. *Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD* (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 87(7): 1171–1180. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81813-9
26. *Lee J, Kim KE, Choi DK, Jang JY, Jung JJ, Kiyonari H, Shioi G, Chang W, Suda T, Mochizuki N, Nakaoka Y, Komuro I, Yoo OJ, Koh GY* (2013) Angiopoietin-1 guides directional angiogenesis through integrin alphavbeta5 signaling for recovery of ischemic retinopathy. Sci Transl Med 5(203): 203ra127. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006666
27. *Rezzola S, Di Somma M, Corsini M, Leali D, Ravelli C, Polli VAB, Grillo E, Presta M, Mitola S* (2019) VEGFR2 activation mediates the pro-angiogenic activity of BMP4. Angiogenesis 22(4): 521–533. https://doi.org/10.1007/s10456-019-09676-y
28. *Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K* (2015) VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. Proc Natl Acad Sci U S A 112(3): 761–766. https://doi.org/10.1073/pnas.1423278112
29. *Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF* (2005) Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. Oncogene 24(3): 445–456. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208223
30. *He T, Qi F, Jia L, Wang S, Wang C, Song N, Fu Y, Li L, Luo Y* (2015) Tumor cell-secreted angiogenin induces angiogenic activity of endothelial cells by suppressing miR-542-3p. Cancer Lett 368(1): 115–125. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.036
31. *Karl E, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Soengas MS, Koch AE, Polverini PJ, Núñez G, Nör JE* (2007) Unidirectional crosstalk between Bcl-xL and Bcl-2 enhances the angiogenic phenotype

of endothelial cells. Cell Death Differ 14(9): 1657–1666.
https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402174

32. *Falcon BL, Swearingen M, Gough WH, Lee L, Foreman R, Uhlik M, Hanson JC, Lee JA, McClure DB, Chintharlapalli S* (2014) An in vitro cord formation assay identifies unique vascular phenotypes associated with angiogenic growth factors. PLoS One 9(9): e106901.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106901
33. *Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP* (2006) VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. FASEB J 20(9): 1495–1497.
https://doi.org/10.1096/fj.05-5137fje
34. *Gigante B, Morlino G, Gentile MT, Persico MG, De Falco S* (2006) Plgf-/-eNos-/- mice show defective angiogenesis associated with increased oxidative stress in response to tissue ischemia. FASEB J 20(7): 970–972.
https://doi.org/10.1096/fj.05-4481fje
35. *Shikada Y, Yonemitsu Y, Koga T, Onimaru M, Nakano T, Okano S, Sata S, Nakagawa K, Yoshino I, Maehara Y, Sueishi K* (2005) Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas. Cancer Res 65(16): 7241–7248.
https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4171
36. *Wu LW, Chen WL, Huang SM, Chan JY* (2019) Platelet-derived growth factor-AA is a substantial factor in the ability of adipose-derived stem cells and endothelial progenitor cells to enhance wound healing. FASEB J 33(2): 2388–2395.
https://doi.org/10.1096/fj.201800658R
37. *Esser JS, Rahner S, Deckler M, Bode C, Patterson C, Moser M* (2015) Fibroblast growth factor signaling pathway in endothelial cells is activated by BMPER to promote angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 35(2): 358–367.
https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304345
38. *Litwin M, Radwańska A, Paprocka M, Kieda C, Dobosz T, Witkiewicz W, Baczyńska D* (2015) The role of FGF2 in migration and tubulogenesis of endothelial progenitor cells in relation to pro-angiogenic growth factor production. Mol Cell Biochem 410(1-2): 131–142.
https://doi.org/10.1007/s11010-015-2545-5
39. *Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A* (2000) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. Am J Pathol 157(5): 1703–1711.
https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64807-9
40. *Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A* (2002) Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. J Biol Chem 277(31): 27850–27855.
https://doi.org/10.1074/jbc.M202421200
41. *Rodriguez-Grande B, Varghese L, Molina-Holgado F, Rajkovic O, Garlanda C, Denes A, Pinteaux E* (2015) Pentraxin 3 mediates neurogenesis and angiogenesis after cerebral ischaemia. J Neuroinflam 12: 15.
https://doi.org/10.1186/s12974-014-0227-y
42. *Rajkovic I, Wong R, Lemarchand E, Rivers-Auty J, Rajkovic O, Garlanda C, Allan SM, Pinteaux E* (2018) Pentraxin 3 promotes long-term cerebral blood flow recovery, angiogenesis, and neuronal survival after stroke. J Mol Med (Berl) 96(12): 1319–1332.
https://doi.org/10.1007/s00109-018-1698-6
43. *Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant DS* (1998) Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. Circ Res 83(2):187–195.
https://doi.org/10.1161/01.res.83.2.187
44. *Ghersi G, Chen W, Lee EW, Zukowska Z* (2001) Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. Peptides 22(3): 453–458.
https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00340-0
45. *Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S* (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. FASEB J 17(9): 984–992.
https://doi.org/10.1096/fj.02-0634rev
46. *Browne S, Jha AK, Ameri K, Marcus SG, Yeghiazarians Y, Healy KE* (2018) TGF-beta1/CD105 signaling controls vascular network formation within growth factor sequestering hyaluronic acid hydrogels. PLoS One 13(3): e0194679.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194679
47. *Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio PM* (1992) Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. J Cell Biol 119(3): 629–641.
https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.629

48. *Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, Schwall R, Ferrara N, Gerritsen ME* (2001) Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. Am J Pathol 158(3): 1111–1120.
https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64058-8
49. *Slater T, Haywood NJ, Matthews C, Cheema H, Wheatcroft SB* (2019) Insulin-like growth factor binding proteins and angiogenesis: from cancer to cardiovascular disease. Cytokine Growth Factor Rev 46: 28–35.
https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.03.005
50. *Haywood NJ, Slater TA, Drozd M, Warmke N, Matthews C, Cordell PA, Smith J, Rainford J, Cheema H, Maher C, Bridge KI, Yuldasheva NY, Cubbon RM, Kearney MT, Wheatcroft SB* (2019) IGFBP-1 in Cardiometabolic Pathophysiology-Insights From Loss-of-Function and Gain-of-Function Studies in Male Mice. J Endocr Soc 4(1):bvz006.
https://doi.org/10.1210/jendso/bvz006
51. *Azar WJ, Azar SH, Higgins S, Hu JF, Hoffman AR, Newgreen DF, Werther GA, Russo VC* (2011) IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. Endocrinology 152(9): 3332–3342.
https://doi.org/10.1210/en.2011-1121
52. *Das SK, Bhutia SK, Azab B, Kegelman TP, Peachy L, Santhekadur PK, Dasgupta S, Dash R, Dent P, Grant S, Emdad L, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB* (2013) MDA-9/syntenin and IGFBP-2 promote angiogenesis in human melanoma. Cancer Res 73(2): 844–854.
https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1681
53. *Granata R, Trovato L, Lupia E, Sala G, Settanni F, Camussi G, Ghidoni R, Ghigo E.* Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms. J Thromb Haemost (2007) 5(4): 835–845.
https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02431.x
54. *Dallinga MG, Habani YI, Kayser RP, Van Noorden CJF, Klaassen I, Schlingemann RO* (2020) IGF-binding proteins 3 and 4 are regulators of sprouting angiogenesis. Mol Biol Rep 47(4): 2561–2572.
https://doi.org/10.1007/s11033-020-05339-0
55. *Zhuge X, Murayama T, Arai H, Yamauchi R, Tanaka M, Shimaoka T, Yonehara S, Kume N, Yokode M, Kita T* (2005) CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 331(4): 1295–1300.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.200
56. *Yu X, Zhao R, Lin S, Bai X, Zhang L, Yuan S, Sun L* (2016) CXCL16 induces angiogenesis in autocrine signaling pathway involving hypoxia-inducible factor 1alpha in human umbilical vein endothelial cells. Oncol Rep 35(3): 1557–1565.
https://doi.org/10.3892/or.2015.4520
57. *Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P* (2009) Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. J Cell Physiol 219(2): 449–458.
https://doi.org/10.1002/jcp.21706
58. Budi EH, Mamai O, Hoffman S, Akhurst RJ, Derynck R (2019) Enhanced TGF-beta Signaling Contributes to the Insulin-Induced Angiogenic Responses of Endothelial Cells. Science 11: 474–491.
https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.12.038
59. *Stepanova V, Jayaraman PS, Zaitsev SV, Lebedeva T, Bdeir K, Kershaw R, Holman KR, Parfyonova YV, Semina EV, Beloglazova IB, Tkachuk VA, Cines DB* (2016) Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Promotes Angiogenesis by Attenuating Proline-rich Homeodomain Protein (PRH) Transcription Factor Activity and De-repressing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Expression. J Biol Chem 291(29): 15029–15045.
https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678490
60. *van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH* (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(4): 716–728.
https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17
61. *Blackburn JS, Brinckerhoff CE* (2008) Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis. Am J Pathol 173(6): 1736–1746.
https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080512
62. *Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton MT, Young WL, Yang GY* (2008) Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. J Cereb Blood Flow Metab 28(1): 90–98.
https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600509
63. *Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, Matsumoto T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y* (2012) Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 51(9): 1571–1579.
https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes093

64. *Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Lugering N, Domschke W, Binion DG* (2003) Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. J Biol Chem 278(10): 8508–8515.
https://doi.org/10.1074/jbc.M208231200
65. *Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK* (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. J Immunol 170(6): 3369–3376.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369
66. *Hong KH, Ryu J, Han KH* (2005) Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. Blood 105(4): 1405–1407.
https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3178
67. *Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV* (2006) CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. J Immunol 177(4): 2651–2661.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2651
68. *Lobov IB, Brooks PC, Lang RA* (2002) Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 99(17): 11205–11210.
https://doi.org/10.1073/pnas.172161899
69. *Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos EK, Kutschera S, Bartels S, Appak S, Besemfelder E, Terhardt D, Chavakis E, Wieland T, Klein C, Thomas M, Uemura A, Goerdt S, Augustin HG* (2012) Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. J Clin Invest 122(6): 1991–2005.
https://doi.org/10.1172/JCI58832
70. *Nör JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ* (2000) Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. J Vasc Res 37(3): 209–218.
https://doi.org/10.1159/000025733
71. *Kaur S, Martin-Manso G, Pendrak ML, Garfield SH, Isenberg JS, Roberts DD* (2010) Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. J Biol Chem 285(50): 38923–38932.
https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172304
72. *Xu X, Mao W, Chen Q, Zhuang Q, Wang L, Dai J, Wang H, Huang Z* (2014) Endostar, a modified recombinant human endostatin, suppresses angiogenesis through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling pathway. PLoS One 9(9): e107463.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107463
73. *Ergün S, Kilic N, Wurmbach JH, Ebrahimnejad A, Fernando M, Sevinc S, Kilic E, Chalajour F, Fiedler W, Lauke H, Lamszus K, Hammerer P, Weil J, Herbst H, Folkman J* (2001) Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. Angiogenesis 4(3): 193–206.
https://doi.org/10.1023/a:1014027218980
74. *Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Masaki T, Fukui H* (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. Int J Cancer 105(3): 340–346.
https://doi.org/10.1002/ijc.11094
75. *Reed MJ, Koike T, Sadoun E, Sage EH, Puolakkainen P* (2003) Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis in vivo and cell migration in vitro. Microvasc Res 65(1): 9–17.
https://doi.org/10.1016/s0026-2862(02)00026-2
76. *Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG* (2003) TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. Cell 114(2): 171–180.
https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00551-8
77. *Lahat N, Bitterman H, Engelmayer-Goren M, Rosenzweig D, Weiss-Cerem L, Rahat MA* (2011) Reduced TIMP-2 in hypoxia enhances angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 300(3): C557–C566.
https://doi.org/10.1152/ajpcell.00177.2010
78. *Wu J, Strawn TL, Luo M, Wang L, Li R, Ren M, Xia J, Zhang Z, Ma W, Luo T, Lawrence DA, Fay WP* (2015) Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2-alphaVbeta3 integrin cross talk. Arterioscler Thromb Vasc Biol 35(1): 111–120.
https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304554
79. *Bajou K, Herkenne S, Thijssen VL, D'Amico S, Nguyen NQ, Bouché A, Tabruyn S, Srahna M, Carabin JY, Nivelles O, Paques C, Cornelissen I, Lion M, Noel A, Gils A, Vinckier S, Declerck PJ, Griffioen AW, Dewerchin M, Martial JA, Carmeliet P, Struman I* (2014) PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. Nat Med 20(7): 741–747.
https://doi.org/10.1038/nm.3552

80. *Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG, Antonova LV, Filip'ev DE, Golovkin AS, Shishkova DK, Burago AY, Frolov AV, Dolgov VY, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Vladimirov AA, Sozinov SA, Ismagilov ZR, Russakov DM, Lomzov AA, Pyshnyi DV, Gutakovsky AK, Zhivodkov YA, Demidov EA, Peltek SE, Dolganyuk VF, Babich OO, Grigoriev EV, Brusina EB, Barbarash OL, Yuzhalin AE* (2016) Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. Sci Rep 6: 27255. https://doi.org/10.1038/srep27255
81. *Shishkova D, Velikanova E, Sinitsky M, Tsepokina A, Gruzdeva O, Bogdanov L, Kutikhin A* (2019) Calcium Phosphate Bions Cause Intimal Hyperplasia in Intact Aortas of Normolipidemic Rats through Endothelial Injury. Int J Mol Sci 20(22): 5728. https://doi.org/10.3390/ijms20225728
82. *Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Velikanova E, Bogdanov L, Glushkova T, Kutikhin A* (2020) Calciprotein Particles Cause Endothelial Dysfunction under Flow. Int J Mol Sci 21(22): 8802. https://doi.org/10.3390/ijms21228802
83. *Shishkova DK, Velikanova EA, Bogdanov LA, Sinitsky MY, Kostyunin AE, Tsepokina AV, Gruzdeva OV, Mironov AV, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Krivkina EO, Matveeva VG, Hryachkova ON, Markova VE, Dyleva YA, Belik EV, Frolov AV, Shabaev AR, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Kolmykov RP, Sevostyanov OG, Russakov DM, Dolganyuk VF, Gutakovsky AK, Zhivodkov YA, Kozhukhov AS, Brusina EB, Ismagilov ZR, Barbarash OL, Yuzhalin AE, Kutikhin AG* (2021) Calciprotein Particles Link Disturbed Mineral Homeostasis with Cardiovascular Disease by Causing Endothelial Dysfunction and Vascular Inflammation. Int J Mol Sci 22(22): 12458. https://doi.org/10.3390/ijms222212458
84. *Kutikhin AG, Feenstra L, Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Hillebrands JL, Krenning G* (2021) Calciprotein Particles: Balancing Mineral Homeostasis and Vascular Pathology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 41(5): 1607–1624. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315697
85. *Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N* (2002) VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99(14): 9462–9467. https://doi.org/10.1073/pnas.142224299
86. *Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC* (2003) Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. Circ Res 93(4): 354–363. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000089257.94002.96.34
87. *Lee HJ, Koh GY* (2003) Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 304(2): 399–404. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00592-8
88. *Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K* (2002) Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cellmechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? J Cell Biol 158(4): 773–785. https://doi.org/10.1083/jcb.200205049
89. *Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA* (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. Nature 437(7057): 426–431. https://doi.org/10.1038/nature03952
90. *Ishida T, Peterson TE, Kovach NL, Berk BC* (1996) MAP kinase activation by flow in endothelial cells. Role of beta 1 integrins and tyrosine kinases. Circ Res 79(2): 310–316. https://doi.org/10.1161/01.RES.79.2.310
91. *Li S, Kim M, Hu YL, Jalali S, Schlaepfer DD, Hunter T, Chien S, Shyy JY* (1997) Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 272(48): 30455–30462. https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30455
92. *Jalali S, del Pozo MA, Chen K, Miao H, Li Y, Schwartz MA, Shyy JY, Chien S* (2001) Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. Proc Natl Acad Sci U S A 98(3): 1042–1046. https://doi.org/10.1073/pnas.031562998
93. *Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA* (2001) Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. EMBO J 20(17): 4639–4647. https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4639
94. *Pang Z, Antonetti DA, Tarbell JM* (2005) Shear stress regulates HUVEC hydraulic conductivity by occludin phosphorylation. Ann Biomed Eng 33(11): 1536–1545. https://doi.org/10.1007/s10439-005-7786-0

95. *Brakemeier S, Eichler I, Hopp H, Köhler R, Hoyer J* (2002) Up-regulation of endothelial stretch-activated cation channels by fluid shear stress. Cardiovasc Res 53(1): 209–218. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00476-X
96. *Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li YS, Chien S, Patapoutian A* (2014) Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 111(28): 10347–10352. https://doi.org/10.1073/pnas.1409233111
97. *Baeyens N, Mulligan-Kehoe MJ, Corti F, Simon DD, Ross TD, Rhodes JM, Wang TZ, Mejean CO, Simons M, Humphrey J, Schwartz MA* (2014) Syndecan 4 is required for endothelial alignment in flow and atheroprotective signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 111(48): 17308–17313. https://doi.org/10.1073/pnas.1413725111
98. *Chachisvilis M, Zhang YL, Frangos JA* (2006) G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103(42): 15463–15468. https://doi.org/10.1073/pnas.0607224103
99. *Gudi S, Nolan JP, Frangos JA* (1998) Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. Proc Natl Acad Sci U S A 95(5): 2515–2519. https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.251
100. *Gudi S, Huvar I, White CR, McKnight NL, Dusserre N, Boss GR, Frangos JA* (2003) Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by Galpha(q) and Gbetagamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(6): 994–1000. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000073314.51987.84
101. *Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM* (2003) Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. Circ Res 93(10): e136–142. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000101744.47866.D5
102. *Lopez-Quintero SV, Cancel LM, Pierides A, Antonetti D, Spray DC, Tarbell JM* (2013) High glucose attenuates shear-induced changes in endothelial hydraulic conductivity by degrading the glycocalyx. PLoS One 8(11): e78954. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078954
103. *Isshiki M, Ando J, Korenaga R, Kogo H, Fujimoto T, Fujita T, Kamiya A* (1998) Endothelial Ca^{2+} waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. Proc Natl Acad Sci U S A 95(9): 5009–5014. https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5009
104. *Yu J, Bergaya S, Murata T, Alp IF, Bauer MP, Lin MI, Drab M, Kurzchalia TV, Stan RV, Sessa WC* (2006) Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. J Clin Invest 116(5): 1284–1291. https://doi.org/10.1172/JCI27100
105. *Iomini C, Tejada K, Mo W, Vaananen H, Piperno G* (2004) Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress. J Cell Biol 164(6): 811–817. https://doi.org/10.1083/jcb.200312133
106. *AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, Nauli SM* (2009) Ciliary polycystin-2 is a mechanosensitive calcium channel involved in nitric oxide signaling cascades. Circ Res 104(7): 860–869. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.192765
107. *Helmke BP, Goldman RD, Davies PF* (2000) Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. Circ Res 86(7): 745–752. https://doi.org/10.1161/01.RES.86.7.745
108. *Helmke BP, Thakker DB, Goldman RD, Davies PF* (2001) Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells. Biophys J 80(1): 184–194. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76006-7
109. *Malek AM, Izumo S* (1996) Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. J Cell Sci 109 (Pt 4): 713–726. https://doi.org/10.1242/jcs.109.4.713
110. *Satcher R, Dewey CF Jr, Hartwig JH* (1997) Mechanical remodeling of the endothelial surface and actin cytoskeleton induced by fluid flow. Microcirculation 4(4): 439–453. https://doi.org/10.3109/10739689709146808
111. *Osborn EA, Rabodzey A, Dewey CF Jr, Hartwig JH* (2006) Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. Am J Physiol Cell Physiol 290(2): C444–C452. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00218.2005
112. *Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, de Jager SC, Elderkamp YW, Seppen J, de Vries CJ, Biessen EA, van Berkel TJ, Pannekoek H, Horrevoets AJ* (2005) Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone regulating genes. Am J Pathol 167(2): 609–618. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63002-7
113. *Dekker RJ, Boon RA, Rondaij MG, Kragt A, Volger OL, Elderkamp YW, Meijers JC, Voorberg J, Pannekoek H, Horrevoets AJ* (2006) KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes

functional quiescent differentiation of the endothelium. Blood 107(11): 4354–4363. https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3465

114. *Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, Kratz JR, Lin Z, Jain MK, Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G* (2006) Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. J Clin Invest 116(1): 49–58. https://doi.org/10.1172/JCI24787
115. *Villarreal G Jr, Zhang Y, Larman HB, Gracia-Sancho J, Koo A, García-Cardeña G* (2010) Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 391(1): 984–989. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.002
116. *Zhou G, Hamik A, Nayak L, Tian H, Shi H, Lu Y, Sharma N, Liao X, Hale A, Boerboom L, Feaver RE, Gao H, Desai A, Schmaier A, Gerson SL, Wang Y, Atkins GB, Blackman BR, Simon DI, Jain MK* (2012) Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. J Clin Invest 122(12): 4727–4731. https://doi.org/10.1172/JCI66056
117. *Jiang YZ, Jiménez JM, Ou K, McCormick ME, Zhang LD, Davies PF* (2014) Hemodynamic disturbed flow induces differential DNA methylation of endothelial Kruppel-Like Factor 4 promoter in vitro and in vivo. Circ Res 115(1): 32–43. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303883
118. *Dai G, Vaughn S, Zhang Y, Wang ET, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr* (2007) Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. Circ Res 101(7): 723–733. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152942
119. *Zakkar M, Van der Heiden K, Luong le A, Chaudhury H, Cuhlmann S, Hamdulay SS, Krams R, Edirisinghe I, Rahman I, Carlsen H, Haskard DO, Mason JC, Evans PC (*2009) Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29(11): 1851–1857. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.193375
120. *Wang KC, Yeh YT, Nguyen P, Limqueco E, Lopez J, Thorossian S, Guan KL, Li YJ, Chien S* (2016) Flow-dependent YAP/TAZ activities regulate endothelial phenotypes and atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 113(41): 11525–11530. https://doi.org/10.1073/pnas.1613121113
121. *Wang L, Luo JY, Li B, Tian XY, Chen LJ, Huang Y, Liu J, Deng D, Lau CW, Wan S, Ai D, Mak KK, Tong KK, Kwan KM, Wang N, Chiu JJ, Zhu Y, Huang Y* (2016) Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow. Nature 540(7634): 579–582. https://doi.org/10.1038/nature20602
122. *SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Luscinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G, Jain MK* (2004) KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. J Exp Med 199(10): 1305–1315. https://doi.org/10.1084/jem.20031132
123. *Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, Staniszewski K, Parmar K, Vaughan DE, Gimbrone MA Jr, Balasubramanian V, García-Cardeña G, Jain MK* (2005) Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. Circ Res 96(5): e48–e57. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000159707.05637.a1
124. *van Thienen JV, Fledderus JO, Dekker RJ, Rohlena J, van Ijzendoorn GA, Kootstra NA, Pannekoek H, Horrevoets AJ* (2006) Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. Cardiovasc Res 72(2): 231–240. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.008
125. *Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I* (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. Cardiovasc Res 99(2): 315–327. https://doi.org/10.1093/cvr/cvt101
126. *Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C* (2003) Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. J Biol Chem 278(2): 703–711. https://doi.org/10.1074/jbc.M203161200
127. *Hosoya T, Maruyama A, Kang MI, Kawatani Y, Shibata T, Uchida K, Warabi E, Noguchi N, Itoh K, Yamamoto M* (2005) Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. J Biol Chem 280(29): 27244–27250. https://doi.org/10.1074/jbc.M502551200
128. *Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C* (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290(5): H1862–H1870. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00651.2005

129. *Fledderus JO, Boon RA, Volger OL, Hurttila H, Ylä-Herttuala S, Pannekoek H, Levonen AL, Horrevoets AJ* (2008) KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(7): 1339–1346. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165811
130. *Lazaro I, Lopez-Sanz L, Bernal S, Oguiza A, Recio C, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Madrigal-Matute J, Gomez-Guerrero C* (2018) Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. Front Pharmacol 9: 819. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00819
131. *Nakajima H, Mochizuki N* (2017) Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation. Cell Cycle 16(20): 1893–1901. https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1364324
132. *Panciera T, Azzolin L, Cordenonsi M, Piccolo S* (2017) Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 18(12): 758–770. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.87
133. *Yu Y, Su X, Qin Q, Hou Y, Zhang X, Zhang H, Jia M, Chen Y* (2020) Yes-associated protein and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif as new targets in cardiovascular diseases. Pharmacol Res 159: 105009. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105009
134. *Yuan P, Hu Q, He X, Long Y, Song X, Wu F, He Y, Zhou X* (2020) Laminar flow inhibits the Hippo/YAP pathway via autophagy and SIRT1-mediated deacetylation against atherosclerosis. Cell Death Dis 11(2): 141. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2343-1
135. *Moonen JR, Lee ES, Schmidt M, Maleszewska M, Koerts JA, Brouwer LA, van Kooten TG, van Luyn MJ, Zeebregts CJ, Krenning G, Harmsen MC* (2015) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress. Cardiovasc Res 108(3): 377–386. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv175
136. *Chen PY, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M* (2015) Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. J Clin Invest 125(12): 4514–4528. https://doi.org/10.1172/JCI82719
137. *Mahmoud MM, Serbanovic-Canic J, Feng S, Souilhol C, Xing R, Hsiao S, Mammoto A, Chen J, Ariaans M, Francis SE, Van der Heiden K, Ridger V, Evans PC* (2017) Shear stress induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor Snail. Sci Rep 7(1): 3375. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03532-z
138. *Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, Nomura-Kitabayashi A, Pandey G, Purushothaman KR, d'Escamard V, Li JR, Hadri L, Fujitani K, Moreno PR, Benard L, Rimmele P, Cohain A, Mecham B, Randolph GJ, Nabel EG, Hajjar R, Fuster V, Boehm M, Kovacic JC* (2016) Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. Nat Commun 7: 11853. https://doi.org/10.1038/ncomms11853
139. *Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G* (2018) Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. Cardiovasc Res 114(4): 565–577. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx253
140. *Dejana E, Hirschi KK, Simons M* (2017) The molecular basis of endothelial cell plasticity. Nat Commun 8: 14361. https://doi.org/10.1038/ncomms14361
141. *Jackson AO, Zhang J, Jiang Z, Yin K* (2017) Endothelial-to-mesenchymal transition: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. Trends Cardiovasc Med 27(6): 383–393. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.03.003
142. *Cho JG, Lee A, Chang W, Lee MS, Kim J* (2018) Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. Front Immunol 9: 294. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.0029
143. *Schwartz MA, Vestweber D, Simons M* (2018) A unifying concept in vascular health and disease. Science 360(6386): 270–271. https://doi.org/10.1126/science.aat3470
144. *Chen PY, Schwartz MA, Simons M* (2020) Endothelial-to-Mesenchymal Transition, Vascular Inflammation, and Atherosclerosis. Front Cardiovasc Med 7: 53. https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00053
145. *Sánchez-Duffhues G, García de Vinuesa A, van de Pol V, Geerts ME, de Vries MR, Janson SG, van Dam H, Lindeman JH, Goumans MJ, Ten Dijke P* (2019) Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2. J Pathol 247(3): 333–346. https://doi.org/10.1002/path.5193

146. *Mehta V, Pang KL, Givens CS, Chen Z, Huang J, Sweet DT, Jo H, Reader JS, Tzima E* (2021) Mechanical forces regulate endothelial-to-mesenchymal transition and atherosclerosis via an Alk5-Shc mechanotransduction pathway. Sci Adv 7(28):eabg5060. https://doi.org/10.1126/sciadv.abg5060

147. *Egorova AD, Khedoe PP, Goumans MJ, Yoder BK, Nauli SM, ten Dijke P, Poelmann RE, Hierck BP* (2011) Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition. Circ Res 108(9): 1093–1101. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.231860

148. *Libby P, Lüscher T* (2020) COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. Eur Heart J 41(32): 3038–3044. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa623

149. *Fogarty H, Townsend L, Morrin H, Ahmad A, Comerford C, Karampini E, Englert H, Byrne M, Bergin C, O'Sullivan JM, Martin-Loeches I, Nadarajan P, Bannan C, Mallon PW, Curley GF, Preston RJS, Rehill AM, McGonagle D, Ni Cheallaigh C, Baker RI, Renné T, Ward SE, O'Donnell JS; Irish COVID-19 Vasculopathy Study* (iCVS) investigators (2021) Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome. J Thromb Haemost 19(10): 2546–2553. https://doi.org/10.1111/jth.15490

150. *Gorog DA, Storey RF, Gurbel PA, Tantry US, Berger JS, Chan MY, Duerschmied D, Smyth SS, Parker WAE, Ajjan RA, Vilahur G, Badimon L, Berg JMT, Cate HT, Peyvandi F, Wang TT, Becker RC* (2022) Current and novel biomarkers of thrombotic risk in COVID-19: a Consensus Statement from the International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. Nat Rev Cardiol 1–21. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00665-7

Perspectives Talking about Endothelial Dysfunction in the Context of Modeling a Blood–Brain Barrier

A. G. Kutikhin[a], *, D. K. Shishkova[a], E. A. Velikanova[a], M. Yu. Sinitsky[a], A. V. Sinitskaya[a], and V. E. Markova[a]

[a] *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*

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

Here, we discuss pathophysiological approaches to define the criteria of endothelial dysfunction (i.e. endothelial activation, impairment of endothelial mechanotransduction, endothelial-to-mesenchymal transition, reduced nitric oxide release, compromised endothelial integrity, and loss of anti-thrombogenic properties) in different *in vitro* and *in vivo* models. Canonical definition of endothelial dysfunction includes insufficient production of vasodilators, pro-thrombotic and pro-inflammatory activation of endothelial cells and pathological endothelial permeability. Among the clinical consequences of endothelial dysfunction are arterial hypertension, macro- and microangiopathy, and microalbuminuria. We suggest to extend an endothelial dysfunction definition by taking into account altered endothelial mechanotransduction and endothelial-to-mesenchymal transition. Albeit interleukin-6, interleukin-8, and MCP-1/CCL2 dictate the pathogenic paracrine effects of dysfunctional endothelial cells and therefore are reliable endothelial dysfunction biomarkers *in vitro*, they are non-specific for endothelial cells and cannot be used for the diagnostics of endothelial dysfunction *in vivo*. Conceptual improvements in existing methods to simulate endothelial dysfunction, in particular in relation to blood-brain barrier, include endothelial cell culture under pulsatile flow, collagen IV coating of flow culture chambers, and collection of endothelial lysate from the blood vessels of laboratory animals *in situ* for the subsequent gene and protein expression profiling. In combination with the simulation of paracrine effects by using conditioned medium from dysfunctional endothelial cells, these flow-sensitive models have a high physiological relevance bringing the experimental conditions to the physiological scenario.

Keywords: endothelial dysfunction, inflammation, mechanotransduction, endothelial-to-mesenchymal transition, nitric oxide, blood-brain barrier, pulsatile flow

EDN: HKRPRI
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 626–635

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧНОСТИ СВИНЦА И ИХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ

© 2022 г. С. Г. Дзугкоев[1, *], Ф. С. Дзугкоева[1], О. И. Маргиева[1]

[1]Институт биомедицинских исследований – филиал Федерального научного центра "Владикавказский научный центр Российской академии наук", Владикавказ, Россия
**E-mail: patbiochem@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.02.2022 г.
После доработки 10.03.2022 г.
Принята к публикации 25.03.2022 г.

В обзоре обсуждается вопрос о механизмах развития токсических эффектов ацетата свинца на сосудистую и нервную системы, а также на внутренние органы. Свинец инициирует развитие окислительного стресса и активацию свободно-радикальных процессов. Проведенные за последние годы экспериментальные и клинические исследования показали важную патогенетическую роль окислительного стресса в нарушении функции сосудистого эндотелия в развитии патологии внутренних органов, особенно почек и печени. Активация свободно-радикальных процессов, нарушение биоэнергетики клеток сопровождаются снижением уровня продукции оксида азота как основного вазодилататора. Развивается дисфункция эндотелия, происходит повышение сосудистого тонуса, что приводит к системной вазоконстрикции. С другой стороны, активные формы кислорода и продукты перекисного окисления липидов стимулируют образование провоспалительных цитокинов и проапоптических белков, вызывающие воспалительные процессы в клетках внутренних органов, повреждение ДНК, апоптоз клеток и стойкие нарушения функции почек и печени. В связи с вышеизложенным, исследователями разработаны и использованы различные вещества с антиоксидантными, противовоспалительными свойствами, а также способные улучшить биоэнергетику клеток органов. В их числе растительные производные: экстракт *Moringa oleifera*, куркумин, витамин С, сочетание витамина С с куркумином, а также аналоги антиоксидантов эндогенного происхождения – L-карнитин и коэнзим Q_{10}. В клетках внутренних органов содержится значительное количество убихинона, необходимого для функционирования дыхательной цепи и выполнения антиоксидантной роли.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ацетат свинца, перекисное окисление липидов, дисфункция эндотелия, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S0869813922050028

Изучение механизмов негативного влияния экотоксикантов на здоровье человека не перестает быть актуальной проблемой. Особое место среди ксенобиотиков занимают тяжелые металлы и их соединения, содержание которых в экосистеме по данным систематического мониторинга Роспотребнадзора в стране зачастую превышает уровень предельно допустимой концентрации. Особое место среди них занимает свинец как наиболее токсичный, включенный в список приоритетных экологических загрязнителей рядом международных организаций, в том числе ВОЗ. Анализируя направления международной деятельности в области химической без-

опасности, следует отметить, что важнейшим критерием приоритетности служит распространенность химических веществ в окружающей среде [1–4]. Актуальность изучения особенностей влияния на человека соединений свинца определяется следующими факторами: уровнем загрязнения экосистемы, стойкостью, способностью к высокой степени кумуляции в биосфере и биологических объектах и соответственно высоким уровнем риска накопления в организме человека и животных [5, 6].

Попадая в организм, свинец накапливается в сосудистой системе, включая аорту, а также в жизненно-важных органах: почках и печени. Обладая переменной валентностью, свинец индуцирует развитие окислительного стресса, нарушение NO-продуцирующей функции эндотелия сосудов и снижение продукции оксида азота (NO) как основного вазодилататора. Развивается патологический процесс, который называется дисфункция эндотелия, приводящий к повышению тонуса сосудов, вазоконстрикции и повышению кровяного давления. Помимо этого, в условиях окислительного стресса активируется продукция провоспалительных цитокинов и проапоптических белков. Все эти факторы способствуют повреждению клеток внутренних органов, снижению уровня функциональных показателей и развитию необратимых гистопатологических процессов.

Основываясь на данных литературы об участии окислительного стресса в механизмах токсичности ацетата свинца, ряд исследователей предложили использовать вещества с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами для нейтрализации негативных проявлений. В комплекс таких антиоксидантов вошли вещества растительного происхождения: экстракт *Moringa oleifera*, куркумин, витамин С, сочетание витамина С с куркумином, а также аналоги антиоксидантов эндогенного происхождения – L-карнитин и коэнзим Q_{10}.

Целью данного исследования является анализ данных современной литературы о молекулярно-клеточных механизмах токсического действия, в том числе ангиотоксического действия свинца и о разработке на их основе новых методов патогенетической коррекции.

Методологические подходы, используемые в обзоре, основываются на изучении достаточного количества источников литературы в плане реализации поставленной цели. В процессе анализа данных литературы использован критический подход к изучаемым работам, их соответствие адекватности статистическим методам и разная научная платформа подходов к анализу обсуждаемой проблемы. Особое внимание уделено рассмотрению причинно-следственных связей метаболических нарушений, включая перекисное окисление липидов (ПОЛ), нарушение антиоксидантной системы (АОС), возможности образования оксида азота, провоспалительных цитокинов и проапоптических белков, вызывающих не только функциональные, но и гистопатологические изменения во внутренних органах. Рассматриваются также возможные пути коррекции негативных проявлений свинца, которые происходят даже при воздействии относительно низких концентраций. Токсичность свинца вызывает серьезную озабоченность в области общественного здравоохранения, поскольку страдает здоровье миллионов людей в мире, причем, это касается как молодой, так и стареющей части населения [7–10]. Особенно чувствительны к воздействию свинца дети, у которых могут наблюдаться нейрокогнитивные расстройства и сердечно-сосудистые заболевания [11, 12].

При контакте человека со свинцом происходит ингибирование синтеза гема гемоглобина в кроветворных органах, развивается нормохромная анемия с последующей гипоксией [1, 9]. Нарушение транспорта кислорода и переменная валентность свинца способствуют образованию свободных радикалов кислорода (перекиси водорода H_2O_2, супероксид-анион радикала O_2^-, радикала гидроксила $OH^{-\bullet}$) и развитию оксидативного стресса [8, 13]. Перекисное окисление липидов является

достаточно распространенным явлением, играет весьма важную роль в нормальной жизнедеятельности клеток, регулируя структурную перестройку фосфолипидов клеточных мембран и изменения метаболизма. Вместе с тем интенсификация свободно-радикальных процессов является патогенетическим звеном ряда негативных проявлений, включая свинцовую интоксикацию. Достаточно многочисленные данные литературы свидетельствуют о способности свинца активировать свободно-радикальное окисление в крови, в клетках мозга, печени, миокарда [8, 13, 14]. Как политропный яд, свинец поражает нервную, сердечно-сосудистую системы и практически все внутренние органы [14–18]. Будучи основным экскреторным органом, почки удаляют из организма токсины, включая, в частности, элементы, имеющие плотность более 5 г/см^3. Клетки проксимальных канальцев почек особенно уязвимы для действия свинца. Свинцовые белковые комплексы могут быть обнаружены в качестве основных ядер включения при микроскопии почечной ткани. В механизмах элиминации нефротоксинов почками участвуют процессы мембранного транспорта, канальцевой секреции, связывания с белками, пиноцитоз и метаболическая инактивация. Поэтому в механизме развития свинцовой нефропатии участвуют эндотелиальные и мезангиальные клетки, канальцевый эпителий, базальные мембраны как гломерул, так и канальцев. Эти воздействия могут вызывать функциональные и морфологические изменения, приводящие к нефропатии. В зависимости от длительности контакта со свинцом и количества кумулированного вещества развиваются функциональные нарушения почек, которые могут закончиться хронической необратимой нефропатией [18]. Экспериментально на крысах показано, что хроническое воздействие свинца привело к его накоплению в почках, нарушению их структуры и функции. Помимо окислительного стресса, токсическое влияние свинца проявляется развитием процесса воспаления и апоптоза клеток органов, в частности почек. В этом механизме авторы отмечают участие провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли-альфа (TNF-α) интерлейкина 1β (iL-1β), интерлейкинов-2, -4, -6, -8 и проапоптических ферментов – циклооксигеназы, каспазы-3, BAX, а также снижение уровня противовоспалительных цитокинов – интерлейкина-10 (iL-10) в почках. Влияния такого плана происходят на фоне истощения антиоксидантного статуса: активности антиоксидантных ферментов и содержания восстановленного глутатиона [15, 19].

Анализируя изменения функционального состояния почек под влиянием ацетата свинца выявляется диуретическое и натрийуретическое его действие вследствие снижения канальцевой реабсорбции воды (R_{H_2O}) и натрия RNa (%) [20]. Важная роль при токсическом поражении почек отводится активности Na,K-АТФ-азы, являющейся составной частью натриевого насоса и играющей основную роль в реабсорбции натрия в почечных канальцах. Этот фермент является непосредственным участником процесса расщепления макроэргических фосфатных связей АТФ, обеспечивая энергией активный транспорт натрия и калия. Na,K-АТФ-аза стимулируется одновременным повышением концентрации натрия и АТФ внутри клетки и калия снаружи. При этом фермент при гидролизе одной молекулы АТФ выбрасывает 3 иона натрия наружу, а 2 иона калия внутрь клетки [21].

Снижение активности Na,K-АТФ-азы в эритроцитах отмечают авторы на ранних этапах воздействия свинца и кадмия [22, 23]. Уменьшению активности данного энзима могут способствовать нарушение конформации молекулы вследствие перекисного окисления липидов, а также изменения калиевых и кальций-калиевых каналов. Развивающийся окислительный стресс способствует понижению биодоступности оксида азота (NO). Зная о том, что NO вызывает дилатацию через активацию калиевых каналов и Na,K-АТФ-азу, следует отметить, что его недостаток

может приводить к нарушению ион-селективных калиевых каналов и соответственно активности Na,K-АТФ-азы [24].

Анализ данных литературы показал, что показателями повреждения почек являются функциональные изменения в нефроне, повышение в сыворотке крови содержания мочевины, креатинина и нитратов/нитритов, а также уровня проапоптических маркеров: BAX, каспазы-3 при понижении антиапоптических маркеров BCI-2 [20, 25]. Снижение функционального резерва может играть очень важную роль в чувствительности почки к повреждающему фактору. Каскад дегенеративных процессов может либо стабилизироваться, либо привести к хронической почечной недостаточности. У 73% людей, подверженных действию свинца, наблюдается хроническая болезнь почек, сочетающаяся с сердечно-сосудистыми заболеваниями [26].

В соответствии с данными литературы, на фоне свинцовой интоксикации происходит и повреждение печени, повышение в ней содержания малонового диальдегида как маркера окислительного стресса [27, 28]. Увеличивается экспрессия провоспалительных факторов и одновременно происходит нарушение обмена холестерина. Причинно-следственные связи свидетельствуют о повышении проницаемости цитоплазматической мембраны гепатоцита, способствующее выходу из клетки ферментов: АлАТ, АсАТ, кислой и щелочной фосфатаз и повышению их активности во внеклеточной среде. Одновременно выявляется увеличение содержания холестерина и триглицеридов, билирубина, креатинина, мочевины в сыворотке крови.

Низкие дозы свинца могут оказывать влияние на сосудистый тонус, изменяя содержание NO как основного регулятора. В литературе приведены данные о том, что на фоне адреномиметика – фенилэфрина свинец снижает вазоконстрикторную реакцию и увеличивает биодоступность NO. Одновременно происходит активация рецепторов ангиотензина-1 (AT1) и ангиотензина-2 (AT2) и метаболического пути фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI3K-протеинкиназы) как проявление защитной реакции [29]. Повышенная биодоступность NO в этом исследовании была обусловлена возросшим уровнем экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS), что подтверждают данные литературы [30]. Рассматривая в таком аспекте этот вопрос, следует отметить, что при повышенной биодоступности NO его взаимодействие с супероксиданион-радикалом образует пероксинитрит, играющий роль активного окислителя и оказывающий прямое влияние на активность железосодержащих ферментов и цикла лимонной кислоты. Следовательно, продуцируемый iNOS NO является ключевым фактором окислительного стресса в повреждении ДНК, подавлении активности ферментов, необходимых для репликации ДНК, регуляции генетических и эпигенетических процессов [3]. В свою очередь, генетические изменения под влиянием активных радикалов могут быть одной из причин апоптоза, повышения уровня экспрессии апоптогенных белков: BAX, FAS, p53AIP1. Вместе с тем выявляется сниженный базальный уровень NO, продуцируемый конститутивным ферментом – эндотелиальной NO-синтазой (eNOS) [31].

Итак, отравление свинцом представляет серьезную опасность для здоровья человека. Его токсичность влияет на различные метаболические пути. Исследованиями установлено, что на фоне окислительного стресса развиваются признаки воспаления: лейкоцитоз, лимфоцитоз, снижение содержания общего белка, альбуминов, глобулинов [27]. Даже малые дозы свинца, вводимые внутрибрюшинно в течение 6 недель, вызывают повреждение образования гема, повышение синтеза цитохрома P_{450} в печени и при этом оказывают генотоксическое действие [7]. Поскольку все ксенобиотики окисляются в микросомальной фракции гепатоцита, то они могут оказывать на клетку повреждающее действие, но вместе с тем, ряд веществ теряют свои токсические свойства. Одним из механизмов ангиотоксического действия свинца является активация сигнальных путей митоген-активируемой

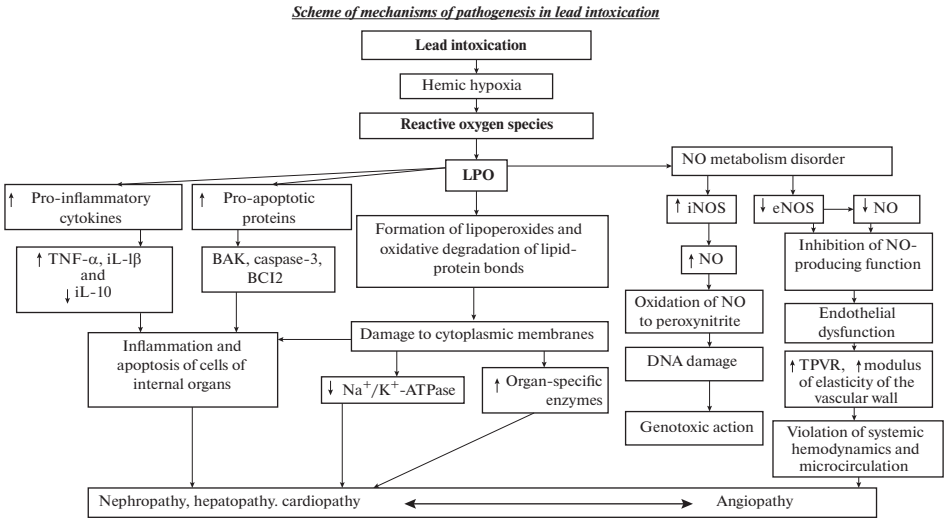

Рис. 1. Схема механизмов патогенеза при свинцовой интоксикации.

протеинкиназы, которая запускает каскад реакций синтеза провоспалительных белков, приводящий к увеличению сосудистого сопротивления и артериального давления [6, 32]. Помимо этого, тяжелые металлы увеличивают активность НАДФН-оксидазы, которая снижает биодоступность NO и приводит к системной вазоконстрикции (рис. 1).

Исходя из анализа данных литературы о метаболических нарушениях свинцовой интоксикации, ряд авторов использовали различные вещества с антиоксидантными свойствами для ингибирования окислительного стресса и восстановления функции органов. Известны данные сочетанного применения свинца с куркумином, витамином С, а также комбинации витамина С с куркумином [16, 27]. Данные показали, что антиоксиданты частично улучшили негативные изменения биохимических показателей, а также оказали противовоспалительное действие на печень, ингибируя образование провоспалительных факторов. Очевидно, растительные полифенолы вступают в реакцию хелатирования со свинцом, препятствуют его всасыванию, снижают токсичность и оказывают антиоксидантное действие [17]. Эффективным оказывается и экстракт *Moringa oleifera* в подавлении нефротоксичности [15]. Исследования о влиянии L-карнитина на токсические проявления свинца были проведены на крысах при добавлении его в пищу. Результаты показали, что L-карнитин препятствует развитию нежелательных эффектов свинца, оказывая ингибирующее влияние на уровень окислительного стресса, о котором судили по содержанию малонового диальдегида, и ферментативную составляющую: супероксиддисмутазу и каталазу [33].

Показано, что свинцовая интоксикация, вызванная добавлением ацетата свинца в дозе 1 г/100 мл H_2O в течение 28 дней у крыс, привела к снижению уровня экспрессии гена металлотионеина-3 (МТ3) в печени и почках, мРНК цитохрома С, а также нарушению липидного спектра крови – повышению общего холестерина (ОХС), ХС ЛПНП и ослаблению защитной роли коэнзима Q_{10} (KoQ_{10}) [34]. На этом фоне 28-дневное лечение коэнзимом Q_{10} (10мг/кг массы тела) показало повышение уровня экспрессии гена МТ3 в клетках печени и почек, мРНК цитохрома С, содержания антиоксидантного белка МТ3 в печени и почках. KoQ_{10} оказался весь-

ма эффективным, позитивно действующим фактором на вышеуказанные показатели, о чем свидетельствует отсутствие существенных различий от уровня контроля. Одновременно KoQ_{10} препятствовал повышению уровня ОХС, ХС ЛПНП. В своем исследовании автор использовал ПЦР-диагностику, иммуносорбентный анализ и биохимические методы определения липопротеиновых фракций. Полученные результаты являются доказательными фактами эффективности действия KoQ_{10} при свинцовой интоксикации [34].

Позитивные эффекты KoQ_{10} были установлены и в исследованиях других авторов, которые вводили крысам ацетат свинца внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг в течение 6 недель. Определяли соотношения окисленной и восстановленной форм KoQ_{10} в сыворотке крови, мозговой, почечной и печеночной тканях. Данные показали преобладание окисленной формы KoQ_{10} из-за сниженной активности NADPH-CoQ-редуктазы, что и благоприятствовало развитию окислительного стресса в клетках мозга, почек и печени [35].

Исследования показали, что повышенные концентрации свинца в окружающей среде приводят у детей к снижению уровня когнитивной функции и нарушению поведенческих реакций. Токсические воздействия свинца на организм беременной женщины в период раннего внутриутробного развития плода свидетельствовали об изменениях психометрических функций в постнатальном периоде развития ребенка, а также биохимических показателей окислительного стресса [36]. В дополнение к этому проведена серия нейрохимических исследований у крыс с моделью свинцовой интоксикации. Данные свидетельствуют о многочисленном и сложном многообразии нейротоксического действия свинца, включая нарушение поведенческих реакций. KoQ_{10} позитивно модулировал функцию корковых нейронов и их энергетический метаболизм [37, 38].

Такие позитивные изменения могут быть связаны с убихинон-ассоциированной частью дыхательной цепи. KoQ_{10} как составляющая часть III комплекса цепи переноса электронов принимает электроны и протоны от I и II комплексов и транспортирует электроны к цитохромам. В определенных точках сопряжения протоны выбрасываются на внешнюю сторону внутренней мембраны митохондрий, обращенной в межмембранное пространство, создавая электро-химический градиент, необходимый для окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ. Кроме этого, KoQ_{10} является единственным саморегенерирующим антиоксидантом липидной природы, который препятствует окислительной модификации белков и липидов цитоплазматических мембран, поддерживая нормальную структуру фосфолипидов. Антиоксидантные свойства KoQ_{10} участвуют в поддержании восстановленного α-токоферола в составе хиломикронов, ЛПНП в сыворотке крови, препятствуя их окислительной модификации. Поскольку KoQ_{10} синтезируется из мевалоната как и холестерин, он может играть роль конкурентного ингибитора синтеза холестерина, оказывая влияние на его уровень в сыворотке крови [39, 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы свидетельствует о высокой токсичности свинца и его способности накапливаться как в объектах биосферы, так и в организме человека и животных.

Рассматривая повреждение метаболических путей под влиянием свинцовой интоксикации, следует отметить, что основным патогенетическим звеном является нарушение в системе ПОЛ–АОС, приводящее к окислительному стрессу и развитию дисфункции эндотелия. Даже низкие дозы свинца влияют на сосудистый тонус, экспрессию eNOS и содержание NO как основного вазодилататора. Однако

следует отметить наличие сведений литературы о повышении экспрессии iNOS и содержания нитратов/нитритов, играющих роль в механизме токсичности. Эти факторы индуцируют повреждение ДНК и подавляют активность ферментов для репликации ДНК, соответственно, оказывают генотоксическое действие.

Другим механизмом ангиотоксического влияния свинца является активация сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы, которая запускает каскад реакций синтеза провоспалительных белков, приводящий к увеличению сосудистого тонуса и артериального давления. Как показано в обзоре литературы, свинец поражает нервную, сердечно-сосудистую системы и внутренние органы, особенно почки и печень. В развитии свинцовой нефропатии участвуют эндотелиальные и мезангиальные клетки, канальцевый эпителий, базальные мембраны гломерул и канальцев. Эти изменения в нефроне приводят к значительному сокращению функционального резерва почек, процессу воспаления и апоптозу клеток. В механизме этих изменений играют роль повышенная экспрессия провоспалительных и проапоптических ферментов и цитокинов на фоне сниженного уровня противовоспалительных цитокинов и белков. Маркерами повреждения печени являются уровни экспрессии провоспалительных факторов и активности ферментов: АлАТ, АсАТ, кислой и щелочной фосфатаз, а также холестерина и билирубина в сыворотке крови.

Коррекция и профилактика негативных проявлений свинцовой интоксикации достигается применением веществ, обладающих антиоксидантными, противовоспалительными и энергообразующими свойствами как растительного происхождения: экстракт *Moringa oleifera*, куркумина и его комбинации с витамином С, так и аналогами эндогенного происхождения: L-карнитином и коэнзимом Q_{10}. L-карнитин обеспечивает транспорт высших жирных кислот в митохондрии с последующим их окислением и энергообразованием. Высокая эффективность коэнзима Q_{10} обусловлена одновременно антиоксидантным, противовоспалительным действием, стимулированием работы электрон-транспортной цепи в митохондриях и синтеза АТФ. Анализ данных литературы предполагает дальнейшее изучение превентивных мероприятий для регуляции метаболических нарушений при интоксикационном синдроме.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках плановой НИР за счет средств федерального бюджета, выделяемых на выполнение Государственного задания.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и план статьи, редактирование рукописи статьи (С.Г.Д.), сбор данных, анализ публикаций по теме статьи, написание и редактирование рукописи (С.Г.Д., Ф.С.Д., О.И.М.)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *de Souza ID, de Andrade AS, Dalmolin RJS* (2018) Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning. Crit Rev Toxicol 48(5): 375–386. https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387
2. *Ericson B, Gabelaia L, Keith J, Kashibadze T, Beraia N, Sturua L, Kazzi Z* (2020) Elevated Levels of Lead (Pb) Identified in Georgian Spices. Ann Glob Health 86(1): 124. https://doi.org/10.5334/aogh.3044

3. *Mani MS, Kabekkodu SP, Joshi MB, Dsouza HS* (2019) Ecogenetics of lead toxicity and its influence on risk assessment. Hum Exp Toxicol 38(9): 1031–1059.
https://doi.org/10.1177/0960327119851253
4. *Obeng-Gyasi E* (2019) Sources of lead exposure in various countries. Rev Environ Health 34(1): 25–34.
https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0037
5. *Boskabady M, Marefati N, Farkhondeh T, Farzaneh Sh, Farshbaf A, Boskabady MH* (2018) The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. Environment Int 120: 404–420.
https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.013
6. *Caito S, Lopes ACBA, Paoliello MB, Aschner M* (2017) Toxicology of Lead and Its Damage to Mammalian Organs. Met Ions Life Sci
17:/books/9783110434330/9783110434330-016/9783110434330-016.xml.
https://doi.org/10.1515/9783110434330-016
7. *Minigalieva IA, Shtin TN, Makeyev OH, Panov VG, Privalova LI, Gurvic VB, Sutunkova MP, Bushueva TV, Sakhautdinova RR, Klinova SV, Solovyeva SN, Chernyshov IN, Shuman EA, Korotkov AA, Katsnelson BA* (2020) Some outcomes and a hypothetical mechanism of combined lead and benzo(a)pyrene intoxication, and its alleviation with a complex of bioprotectors. Toxicol Rep 12(7): 986–994.
https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.004
8. *Mani MS, Joshi MB, Shetty RR, Dsouza VL, Swathi M, Kabekkodu SP, Dsouza HS* (2020) Lead exposure induces metabolic reprogramming in rat models. Toxicol Lett 15 335: 11–27.
https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.09.010
9. *Кузьмина ЛП, Хотулева АГ, Безрукавникова ЛМ, Соркина НС, Цидильковская ЭС* (2018) Использование современных клинико-лабораторных методов исследования при проведении биологического мониторинга воздействия свинца на организм работников свинецперерабатывающего предприятия. Здоровье населения и среда обитания 7(304). [*Kuz'mina LP, Hotuleva A, Bezrukavnikova LM, Sorkina NS, Cidil'kovskaja JeS* (2018) The use of modern clinical and laboratory methods of research in the conduct of biological monitoring of the impact of lead on the body of workers at a lead processing enterprise. Public Health and Habitat 7(304). (In Russ)].
10. *Rahman Z, Singh VP* (2019) The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. Environ Monit Assess 191(7): 419.
https://doi.org/10.1007/s10661-019-7528-7
11. *Al Osman M, Yang F, Massey IY* (2019) Exposure routes and health effects of heavy metals on children. Biometals 32(4): 563–573.
https://doi.org/10.1007/s10534-019-00193-5
12. *Evens A, Hryhorczuk D, Lanphear BP, Rankin K, Lewis DA, Forst L, Rosenberg D* (2015) The impact of low-level lead toxicity on school performance among children in the Chicago Public Schools: a population-based retrospective cohort study. Environ Health 14, 21.
https://doi.org/10.1186/s12940-015-0008-9
13. *Fan Y, Zhao X, Yu J, Xie J, Li C, Liu D, Tang C, Wang C* (2020) Lead-induced oxidative damage in rats/mice: A meta-analysis. J Trace Elem Med Biol 58: 126443.
https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126443
14. *Bakulski KM, Seo YA, Hickman RC, Brandt D, Vadari HS, Hu H, Park SK* (2020) Heavy Metals Exposure and Alzheimer's Disease and Related Dementias. J Alzheimers Dis 76(4): 1215–1242.
https://doi.org/10.3233/JAD-200282
15. *Abdel-Daim MM, Alkahtani S, Almeer R, Albasher G* (2020) Alleviation of lead acetate-induced nephrotoxicity by Moringa oleifera extract in rats: highlighting the antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. Environ Sci Pollut Res Int 27(27): 33723–33731.
https://doi.org/10.1007/s11356-020-09643-x
16. *Alhusaini AM, Faddah LM, Hasan IH, Jarallah SJ, Alghamdi SH, Alhadab NM, Badr A, Elorabi N, Zakaria E, Al-Anazi A* (2019) Vitamin C and Turmeric Attenuate Bax and Bcl-2 Proteins' Expressions and DNA Damage in Lead Acetate-Induced Liver Injury. Dose Response 17(4): 1559325819885782.
https://doi.org/10.1177/1559325819885782
17. *Li Y, Lv H, Xue C, Dong N, Bi C, Shan A* (2021) Plant Polyphenols: Potential Antidotes for Lead Exposure. Biol Trace Elem Res 199(10): 3960–3976.
https://doi.org/10.1007/s12011-020-02498-w
18. *Gundacker C, Forsthuber M, Szigeti T, Kakucs R, Mustieles V, Fernandez MF, Bengtsen E, Vogel U, Hougaard KS, Saber AT* (2021) Lead (Pb) and neurodevelopment: A review on exposure and biomarkers of effect (BDNF, HDL) and susceptibility. Int J Hyg Environ Health 238: 113855.
https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113855
19. *Metryka E, Chibowska K, Gutowska I, Falkowska A, Kupnicka P, Barczak K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I* (2018) Lead (Pb) Exposure Enhances Expression of Factors Associated

with Inflammation. Int J Mol Sci 20; 19(6): 1813.
https://doi.org/10.3390/ijms19061813

20. *Дзугкоев СГ, Дзугкоева ФС, Маргиева ОИ, Можаева ИВ* (2022) Анализ механизмов нарушения функциональных показателей внутренних органов при сатурнизме в эксперименте у крыс. Бюл эксперим биол мед 173(2): 177–181. [*Dzugkoev SG, Dzugkoeva FS, Margieva OI, Mozhaeva IV* (2022) Analysis of the mechanisms of violation of the functional parameters of internal organs in saturnism in the experiment in rats. Bull Exp Biol Med 173(2): 177–181. (In Russ)].
https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-2-177-181
21. *Friedrich T, Tavraz NN, Junghans C* (2016) ATP1A2 Mutations in Migraine: Seeing through the Facets of an Ion Pump onto the Neurobiology of Disease. Front Physiol 7: 239.
https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00239
22. *Yücebilgiç G, Bilgin R, Tamer L, Tükel S* (2003) Effects of lead on $Na^{(+)}$-$K^{(+)}$ATPase and $Ca^{(+2)}$ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers. Int J Toxicol 22(2): 95–97.
https://doi.org/10.1080/10915810305096
23. *Nazima B, Manoharan V, Miltonprabu S* (2016) Oxidative stress induced by cadmium in the plasma, erythrocytes and lymphocytes of rats: Attenuation by grape seed proanthocyanidins. Hum Exp Toxicol 35(4): 428–447.
https://doi.org/10.1177/0960327115591376
24. *Kloza M, Baranowska-Kuczko M, Toczek M, Kusaczuk M, Sadowska O, Kasacka I, Kozłowska H* (2019) Modulation of Cardiovascular Function in Primary Hypertension in Rat by SKA-31, an Activator of $K_{Ca}2.x$ and $K_{Ca}3.1$ Channels. Int J Mol Sci 20(17): 4118.
https://doi.org/10.3390/ijms20174118
25. *Al-Megrin WA, Soliman D, Kassab RB, Metwally DM, Ahmed E Abdel Moneim, El-Khadragy MF* (2020) Coenzyme Q10 Activates the Antioxidant Machinery and Inhibits the Inflammatory and Apoptotic Cascades Against Lead Acetate-Induced Renal Injury in Rats. Front Physiol 7:11:64.
https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00064
26. *Satarug S, C Gobe G, A Vesey D, Phelps KR* (2020) Cadmium and Lead Exposure, Nephrotoxicity, and Mortality. Toxics 8(4): 86.
https://doi.org/10.3390/toxics8040086
27. *Abdelhamid FM, Mahgoub HA, Ateya AI* (2020) Ameliorative effect of curcumin against lead acetate-induced hemato-biochemical alterations, hepatotoxicity, and testicular oxidative damage in rats. Environ Sci Pollut Res Int 1: 10950–10965.
https://doi.org/10.1007/s11356-020-07718-3
28. *Okesola MA, Ajiboye BO, Oyinloye BE, Ojo OA* (2019) Effect of Zingiber officinale on some biochemical parameters and cytogenic analysis in lead-induced toxicity in experimental rats. Toxicol Mech Methods 29(4): 255–262.
https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1558321
29. *Fiorim J, Simões MR, de Azevedo BF, Ribeiro RF Junior, Dos Santos L, Padilha AS, Vassallo DV* (2020) Increased endothelial nitric oxide production after low level lead exposure in rats involves activation of angiotensin II receptors and PI3K/Akt pathway. Toxicology 443: 152557.
https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152557
30. *Abdel-Zaher AO, Abd-Ellatief RB, Aboulhagag NA, Farghaly HSM, Al-Wasei FMM* (2019) The interrelationship between gasotransmitters and lead-induced renal toxicity in rats. Toxicol Lett 310: 39–50.
https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.04.012
31. *Апыхтина ЕА, Коцуба АВ, Коркач ЮП, Андрусишина ИН, Лампека ЕГ* (2007) Вазотоксическое действие свинца: роль нарушений в обмене эндогенного оксида азота. Укр журн по проблемам медицины труда 3(11): 56–62. [*Apyhtina EA, Kocuba AV, Korkach JuP, Andrusishina IN, Lampeka EG* (2007) Vasotoxic effect of lead: the role of disturbances in the metabolism of endogenous nitric oxide. Ukr J Occupat Med 3(11): 56–62. (In Russ)].
https://doi.org/10.33573/ujoh2007.03.056
32. *Yakimova NL, Sosedova LM, Vokina VA, Titov EA, Novikov MA* (2017) Experimental lead intoxication symptoms with hyperglycemia state. Med Tr Prom Eko (2): 54–56.
33. *El-Sherbini ES, El-Sayed G, El Shotory R, Gheith N, Abou-Alsoud M, Harakeh SM, Karrouf GI* (2017) Ameliorative effects of l-carnitine on rats raised on a diet supplemented with lead acetate. Saudi J Biol Sci 24(6): 1410–1417.
https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.08.010
34. *Mazandaran AA, Khodarahmi P* (2021) The protective role of Coenzyme Q10 in metallothionein-3 expression in liver and kidney upon rats' exposure to lead acetate. Mol Biol Rep 48(4): 3107–3115.
https://doi.org/10.1007/s11033-021-06311-2
35. *Abdallah GM, El-Sayed el-SM, Abo-Salem OM* (2010) Effect of lead toxicity on coenzyme Q levels in rat tissues. Food Chem Toxicol 48(6): 1753–1756.
https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.006

36. *Rocha A, Trujillo KA* (2019) Neurotoxicity of low-level lead exposure: History, mechanisms of action, and behavioral effects in humans and preclinical models. Neurotoxicology 73: 58–80. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.021
37. *Yousef AOS, Fahad AA, Moneim AEA, Metwally DM, El-Khadragy MF, Kassab RB* (2019) The Neuroprotective Role of Coenzyme Q10 Against Lead Acetate-Induced Neurotoxicity Is Mediated by Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Activities. Int J Environ Res Public Health 16(16): 2895. https://doi.org/10.3390/ijerph16162895
38. *Hargreaves I, Heaton RA, Mantle D* (2020) Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview. Int J Mol Sci 21(18): 6695. https://doi.org/10.3390/ijms21186695
39. *Горошко ОА, Красных ЛМ, Кукес ВГ, Зозина ВИ* (2019) Значение редокс-статуса коэнзима Q10 как биомаркера окислительного стресса. Ведомости Научн центра экспертизы средств мед применения № 3. [*Goroshko OA, Krasnykh LM, Kukes VG, Zozina VI* (2019) Significance of the redox status of coenzyme Q10 as a biomarker of oxidative stress. Bull Scientif Center for Expertise of Med Applicat № 3. (In Russ)].
40. *Pradedova EV, Nimaeva OD, Salyaev RK* (2014) Redox enzymes of Red Beetroot vacuoles (Beta vulgaris L.) J Stress Physiol Biochem 4.

Analysis of the Mechanisms of Lead Toxicity and Their Pathogenetic Correction

S. G. Dzugkoev[a], *, F. S. Dzugkoeva[a], and O. I. Margieva[a]

[a] *Institute of Biomedical Research – Branch of the Federal State Budgetary Institution of Science of the Federal Scientific Center "Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Vladikavkaz, Russia*

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

The review discusses the question of the mechanisms of development of the toxic effects of lead acetate on the vascular and nervous systems, as well as internal organs. Experimental and clinical studies conducted in recent years have shown an important pathogenetic role of oxidative stress in the dysfunction of the vascular endothelium in the development of pathology of internal organs, especially the kidneys and liver. Activation of free-radical processes, violation of cell bioenergetics are accompanied by a decrease in the level of production of nitric oxide – as the main vasodilator. Endothelial dysfunction develops, an increase in vascular tone occurs, which leads to systemic vasoconstriction. On the other hand, reactive oxygen species and lipid peroxidation products stimulate the formation of pro-inflammatory cytokines and pro-apoptotic proteins, which cause inflammation in the cells of internal organs, DNA damage, cell apoptosis, and persistent impairment of kidney and liver function. In connection with the above, researchers have developed and used various substances with antioxidant, anti-inflammatory properties, as well as those capable of improving the bioenergetics of organ cells. Among them are plant derivatives: Moringa oleifera extract, curcumin, vitamin C, a combination of vitamin C with curcumin, as well as analogues of endogenous antioxidants – L-carnitine and coenzyme Q10. All tissues contain a significant amount of ubiquinone, which is essential for cellular functions, including the transport of electrons and protons in the respiratory chain, and an antioxidant role.

Keywords: heavy metals, lead acetate, lipid peroxidation, endothelial dysfunction, antioxidant

EDN: KIIGUN
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 636–648

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИЗМЕНЕНИЕ ВКЛАДА IK_{Ca}-КАНАЛОВ В ПОДДЕРЖАНИЕ ТОНУСА И ДИЛАТАЦИЮ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИИЙ У СТАРЕЮЩИХ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

© 2022 г. О. П. Горшкова[1], *, И. Б. Соколова[1]

[1]*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
**E-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Поступила в редакцию 26.01.2022 г.
После доработки 24.02.2022 г.
Принята к публикации 15.03.2022 г.

В основе нарушения мозгового кровотока после ишемии/реперфузии (И/Р) может лежать эндотелиальная дисфункция, связанная с нарушением функциональной активности кальций-чувствительных калиевых каналов промежуточной проводимости (IK_{Ca}). Однако данные об изменениях функциональной активности IK_{Ca}-каналов в сосудах головного мозга после И/Р немногочисленны и противоречивы. Старение сопровождается изменением вклада IK_{Ca}-каналов в эндотелий-зависимую дилатацию мозговых сосудов, что может нарушать перфузию и ухудшать процессы восстановления мозгового кровотока после перенесенной ишемии. В работе исследовали изменение вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса и опосредованную ацетилхолином дилатацию пиальных артерий крыс Спрег–Доули в возрасте 18 месяцев после перенесенной однократной И/Р (пережатие обеих сонных артерий с одновременным снижением и строгим поддержанием среднего АД на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. на 12 мин). Исследование сосудов проводили через 7, 14 и 21 день после И/Р. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки оценивали реакции артерий у крыс, перенесших ишемию, и ложнооперированных животных. Об изменении вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса судили по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие блокатора IK_{Ca}-каналов (клотримазола, 10^{-7} М, 5 мин). Изменение вклада каналов в дилатацию сосудов оценивали путем сравнения числа и степени дилатации артерий в ответ на действие ацетилхолин хлорида (АХ, 10^{-7} М, 8 мин) до и после применения клотримазола. Установлено, что И/Р коры головного мозга у крыс в возрасте 18 месяцев приводит к уменьшению числа дилатаций пиальных артерий на воздействие АХ, которое сохраняется на протяжении первых 14 дней после ишемии. В этот отрезок постишемического периода вклад IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса пиальных артерий и АХ-опосредованную дилатацию также снижается. Снижение вклада IK_{Ca}-каналов в осуществление дилататорного ответа наблюдается уже через 7 дней после И/Р, а через 14 дней эти каналы практически не участвуют в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий. К 21-му дню после И/Р все исследованные процессы восстанавливаются.

Ключевые слова: IK_{Ca}-калиевые каналы, ишемия головного мозга, пиальные артерии, эндотелиальная дисфункция

DOI: 10.31857/S0869813922050065

Ишемическое поражение головного мозга – одно из наиболее распространенных патологических состояний, значительным фактором риска развития которого

является возраст. Временное прекращение кровоснабжения мозга вызывает дисбаланс метаболических процессов, приводящий к тканевой гипоксии. Последующая реперфузия не всегда сопровождается восстановлением нормального кровотока и часто приводит к дополнительным повреждениям. Вопросы взаимосвязи между первичным ишемическим поражением и последующими процессами, происходящими в церебральной сосудистой сети, к настоящему времени изучены недостаточно.

В изменениях мозгового кровотока после ишемии/реперфузии (И/Р) большая роль принадлежит развитию эндотелиальной дисфункции в стенке мозговых сосудов, обусловленной нарушениями NO-опосредованных механизмов сосудистой регуляции [1–3]. В качестве параллельного компенсаторного сосудорасширяющего пути в этих условиях может выступать эндотелиальная гиперполяризация (EDH) [1, 4, 5]. Механизм развития EDH в настоящее время до конца не выяснен. Считается, что возникновение EDH связано с действием некоторых веществ, продуцируемых эндотелием (так называемых факторов EDH), которые активируют расположенные в эндотелии сосудов кальций-чувствительные калиевые каналы. Усиление выхода ионов калия из клеток эндотелия через эти каналы приводит к гиперполяризации мембраны гладкомышечных клеток, их расслаблению и вазодилатации [3, 6]. Значительная роль в возникновении EDH отводится кальций-чувствительным калиевым каналам промежуточной проводимости (IK_{Ca}) [1, 4, 5]. В то же время многие исследователи утверждают, что источником EDH могут быть процессы, связанные с возникновением электрической связи между эндотелием и мышечной тканью через электрические щелевые каналы без участия генерации химических медиаторов [7]. Старение – это сложный процесс, в частности связанный с клеточными, метаболическими и структурными изменениями в сосудах головного мозга [8, 9], приводящими к развитию дисфункции сосудистых эндотелиальных клеток. Согласно данным, полученным нами в предыдущих экспериментах [10], а также результатам других авторов [6, 11], старение сопровождается изменением вклада IK_{Ca}-каналов в эндотелий-зависимую дилатацию сосудов головного мозга, что может приводить к нарушению перфузии мозга и способствовать ухудшению процессов восстановления мозгового кровотока после перенесенной И/Р.

После окклюзии крупных сосудов участок мозга, подвергшийся ишемии, остается жизнеспособным за счет коллатерального кровотока [12]. Церебральные коллатерали являются вспомогательными сосудистыми путями, которые могут частично поддерживать приток крови к ткани, подвергшейся ишемии, при блокировании первичных сосудистых путей [12, 13]. Пиальные коллатерали представляют собой анастамотические соединения на кортикальной поверхности, соединяющие дистальные ветви передней и задней мозговой артерии с дистальными ветвями средней мозговой артерии [12]. Кровоток через пиальные коллатерали определяет степень ишемического поражения коры головного мозга и влияет на процессы восстановления.

Таким образом, нарушение процессов регуляции тонуса пиальных артерий и старение являются критическими факторами в определении исхода и последствий острой ишемии головного мозга. Поэтому целью данной работы было изучение вклада IK_{Ca}-каналов в регуляцию тонуса пиальных артерий после перенесенной ишемии/реперфузии у стареющих животных. В задачи исследования входило изучение изменения вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса и осуществление опосредованной ацетилхолином (АХ) дилатации пиальных артерий у крыс в возрасте 18 месяцев на разных сроках постишемического периода (через 7, 14 и 21 день после перенесенной ишемии коры головного мозга).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 18-месячных самцах крыс Спрег–Доули (n = 41) массой 450–670 г из центра коллективного пользования “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Ишемия коры головного мозга воспроизводилась с использованием техники окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией, известной в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotention model”, с авторскими модификациями [14]. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс проводилась 12-минутная окклюзия обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови (0.8–1.2 мл/100 г массы тела) в гепаринизированный шприц). Измерение АД осуществлялось прямым способом через катетер в бедренной артерии, соединенным с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур, https://www.argonmedical.com), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США, https://www.st.com), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером в нашей лаборатории была разработана оригинальная программа визуализации значений АД. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{ср} = P_д + 1/3(P_с - P_д),$$

где $P_{ср}$ – среднее артериальное давление (мм рт. ст.), $P_с$ – систолическое давление (мм рт. ст.), $P_д$ – диастолическое давление (мм рт. ст.).

По окончании периода ишемии производилась полная реинфузия забранной крови и ушивание операционных ран. До выхода из наркоза крысы содержались на электрогрелках (S315, EcoSapiens, Россия) при температуре 38°С. После выхода из наркоза животные возвращались в клетки своего обычного содержания.

Постишемические изменения исследовались в отдельных группах крыс: на 7-, 14- и 21-й день после ишемии. Контролем служили ложнооперированные животные (ЛО). Эти крысы подвергались аналогичному оперативному вмешательству, но без проведения ишемии. Исследования на ЛО крысах проводились в отдельных группах через 7, 14 и 21 день после операции.

Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий крыс наркотизировали золетилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). В теменной области черепа животного высверливали отверстие ($S \approx 1$ см^2), твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; $NaHCO_3$ 15.5; $MgCl_2$ 1.2; $CaCl_2$ 2.5; NaH_2PO_4 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержали в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA “ELMI”, Латвия) при температуре 37°С. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого оставались примерно на одном уровне и составляли 127 ± 4 мм рт. ст. Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°С. Визуализацию пиальных ар-

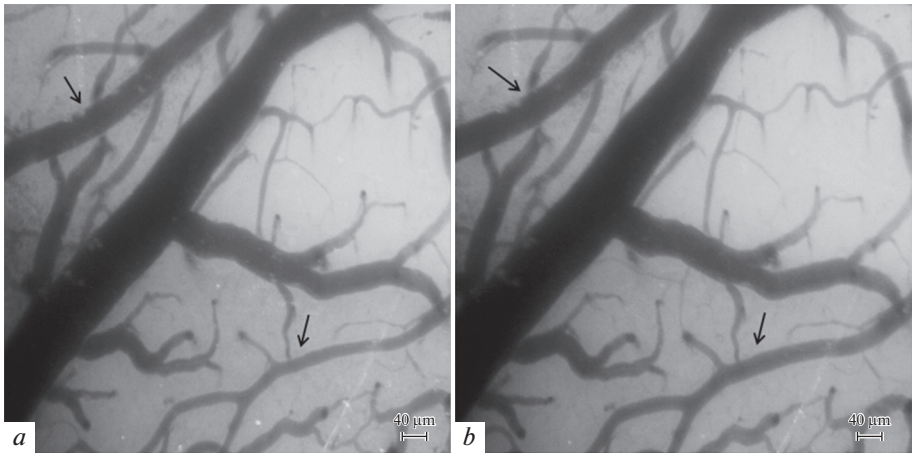

Рис. 1. Микрофотографии пиальных сосудов: *a* – исходное состояние; *b* – реакция на орошение поверхности головного мозга раствором АХ (10^{-7} М, 8 мин). Стрелками указаны артериальные участки пиальной сосудистой сети.

терий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (Микромед, Россия), цветную камеру-видеоокуляр для микроскопа Basler acA 4600–10uc (Германия) и персональный компьютер.

При проведении эксперимента крыс разделяли на 6 отдельных групп: крысы через 7 (n = 7), 14 (n = 7) и 21 (n = 8) день после перенесенной ишемии и ЛО крысы через 7 (n = 6), 14 (n = 7) и 21 (n = 6) день после оперативного вмешательства. Исследовали реакции сосудов на орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолин хлорида (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich, 10^{-7} М, 8 мин) в отсутствие и на фоне блокады IK_{Ca} – каналов раствором клотримазола (Акрихин, Польша) в концентрации 10^{-5} М (предварительное орошение поверхности головного мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие АХ в каждой группе анализировали по всему массиву сосудов и принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие АХ внутри каждой из исследованных групп. Общая продолжительность эксперимента составляла 60–90 мин, после чего животных усыпляли передозировкой раствора золетила (60 мг/кг).

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях (рис. 1) с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M 1.21” (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru). В программе предусмотрен режим увеличения изображения и калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы вручную измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса сосудов судили по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие блокатора IK_{Ca}-каналов клотримазола. Изменение вклада каналов в дилатации сосудов оценивали путем сравнения числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокатора.

Изменение количества расширившихся и сузившихся сосудов на воздействие выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔД %: рассчитывали по формуле:

$$\Delta Д = (Д2 - Д1)/Д1 \times 100,$$

где Д1 – диаметр сосуда до воздействия АХ, Д2 – после воздействия.

Изменения диаметра в покое не превышали 5.0 ± 0.5%, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

У каждой крысы было измерено от 40 до 70 участков сосудов. В литературе имеются сведения о том, что вклад EDH в эндотелий-зависимые релаксации неоднороден и варьируется в зависимости от размера сосудов [15–17]. Поэтому для последующего анализа измеренные сосуды были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие сосуды (диаметром от 9 до 20 мкм), сосуды среднего диаметра (от 20 до 40 мкм) и крупные сосуды (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усредняли для каждого животного и использовали для статистических сравнений.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. При сравнении 2 групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Сравнение средних данных независимых выборок при сравнении более 2 групп при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) проводили при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

И/Р изменяла выраженность АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов только в первые 14 дней после перенесенного воздействия. Через 7 дней у крыс, перенесших ишемию, по сравнению с ЛО животными, в группе артерий диаметром более 40 мкм отмечалось снижение числа дилататорных реакций на воздействие АХ (на 33.9 ± 2.4%; $p = 0.02$, $U = 54$, критерий Манна–Уитни), без изменения амплитуды дилатации. В остальных группах исследованных артерий число АХ-опосредованных дилатаций и амплитуда дилатации не отличались от аналогичных показателей в соответствующих группах сосудов ЛО животных (рис. 2). На 14-й день число и амплитуда дилататорных реакций на воздействие АХ сосудов крупных диаметров у крыс, перенесших ишемию, и ЛО животных достоверно не отличались. Число дилатаций мелких и средних артерий было достоверно ниже (в среднем на 25%; рис. 2). Через 21 день число и амплитуда вызванных АХ дилатаций у животных, перенесших ишемию, и ЛО крыс во всех группах исследованных сосудов достоверно не отличались.

Аппликация клотримазола у ЛО крыс через 7 дней после оперативного вмешательства вызывала констрикцию сосудов всех исследованных диаметров (рис. 3*a*). Наибольшее число констрикций отмечено в группе артерий диаметром менее 20 мкм (65.1 ± 2%). С увеличением диаметра сосудов число констрикций на воздействие клотримазола достоверно снижалось ($p < 0.0001$, критерий Краскела–Уоллиса). Блокада IK_{Ca}-каналов уменьшала число АХ-опосредованных дилатаций пиальных артерий всех диаметров в среднем на 80–85% (рис. 4*a*). Амплитуда дилатации во всех группах исследованных сосудов также достоверно уменьшалась (рис. 4*b*). У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после И/Р, по сравнению с ЛО живот-

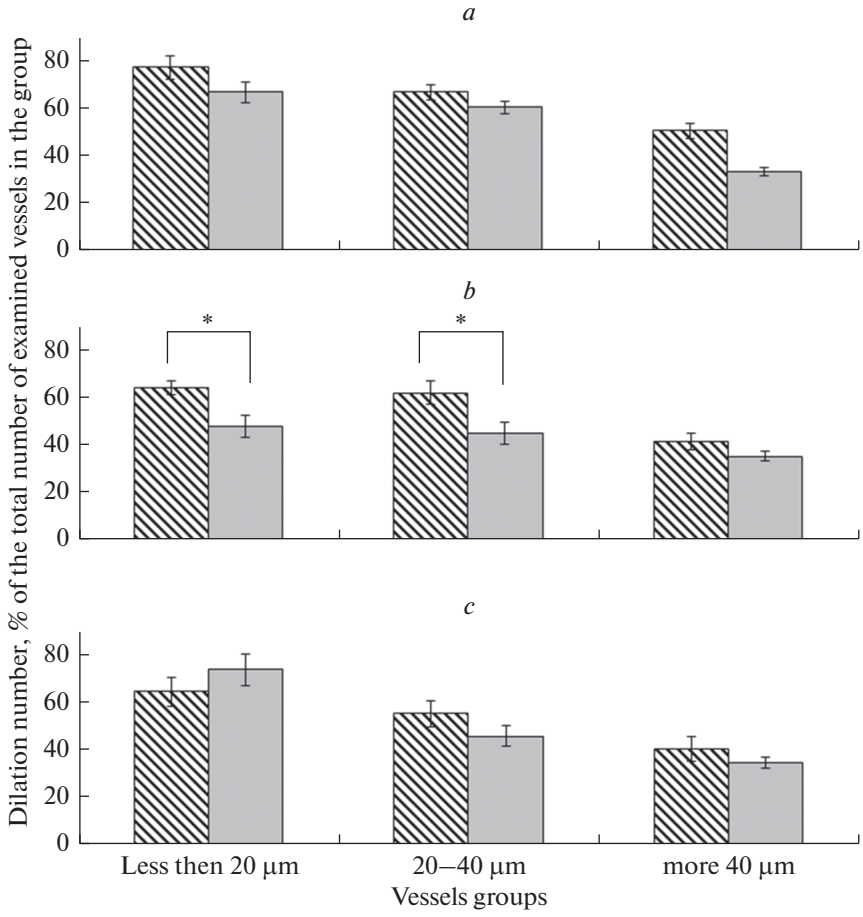

Рис. 2. Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие АХ. *Косая штриховка* – ЛО крысы; *темная заливка* – крысы после И/Р (*a* – 7 дней; *b* – 14 дней; *c* – 21 день). * – различия статистически значимы при $p < 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни).

ными, аппликация клотримазола вызывала достоверно меньшее число констрикций. Во всех исследованных группах артерий в ответ на воздействие клотримазола сужалось в среднем от 30 до 45% сосудов (рис. 3*a*). Число АХ-опосредованных дилатаций на фоне введения клотримазола во всех группах сосудов снижалось в среднем на 60–70%. В группе артерий мелких диаметров также уменьшалась амплитуда дилатаций (рис. 4).

Аппликация клотримазола у ЛО крыс через 14 дней после операции вызывала констрикцию 71.3 ± 4.4% мелких сосудов и около 50% артерий средних и крупных диаметров (рис. 3*b*). На фоне введения клотримазола во всех группах исследованных сосудов уменьшалось число дилатаций на воздействие АХ (в среднем на 70–80%). Также снижалась и амплитуда АХ-опосредованной дилататорной реакции (рис. 4). У крыс, перенесших ишемию, через 14 дней после И/Р орошение поверхности головного мозга раствором клотримазола приводило к констрикции около 60% сосудов всех исследованных групп (рис. 3*b*). Число дилатаций на воздействие АХ на

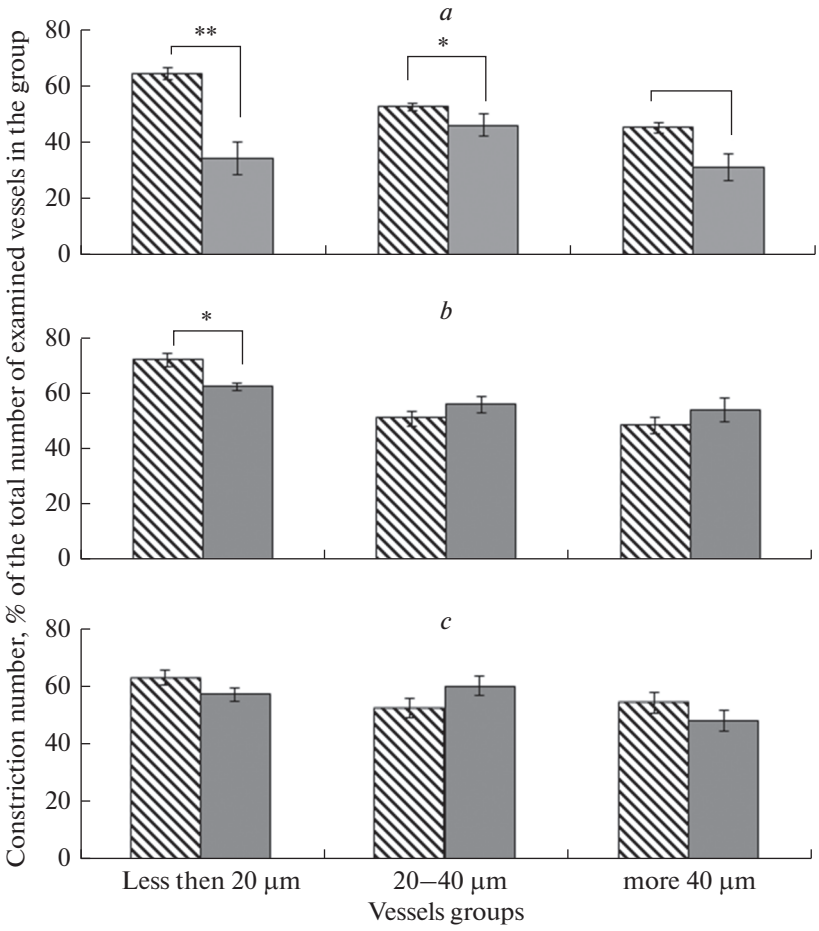

Рис. 3. Констрикторная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие блокатора IK_{Ca}-каналов (клотримазола). *Косая штриховка* — ЛО крысы; *темная заливка* – крысы после И/Р (*a* – 7 дней; *b* – 14 дней; *c* – 21 день). *– различия статистически значимы при $p < 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни).

фоне применения клотримазола в группах сосудов мелких сосудов уменьшалось на 58.3 ± 2.1% ($p = 0.01$, $U = 11$, критерий Манна–Уитни). В этой группе также уменьшалась и амплитуда дилататорной реакции (рис. 4). В группах артерий крупных и средних диаметров число и амплитуда АХ-опосредованных дилатаций на фоне применения клотримазола соответствовали значениям, полученным без применения блокатора (рис. 4).

Через 21 день применение клотримазола у ЛО крыс приводило к констрикции 55–60% сосудов всех исследованных диаметров (рис. 3*c*). Число дилататорных реакций на воздействие АХ на фоне применения клотримазола у сосудов мелких и средних диаметров уменьшалось в среднем на 65%. В этих группах сосудов также уменьшалась и амплитуда дилатации (рис. 4). Число АХ-опосредованных дилатаций в группе крупных сосудов на фоне блокады IK_{Ca}-каналов уменьшалось на 42.2 ± 3.2% ($p = 0.004$, $U = 9$, критерий Манна–Уитни). У животных, перенесших ишемию, во всех группах артерий в ответ на воздействие клотримазола сужалось в

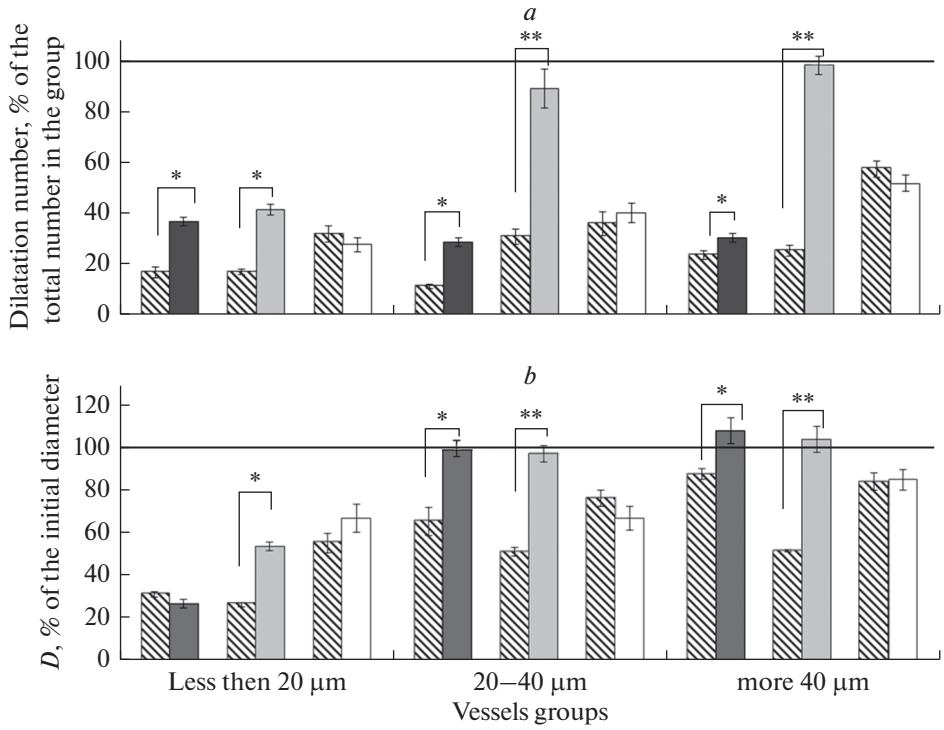

Рис. 4. Изменение дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca}-каналов: *a* – число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов); *b* – диаметр артерий после воздействия АХ (% относительно их диаметра до воздействия АХ). *Линия* – дилататорная реакция сосудов в группе на введение АХ без применения блокатора, принятая за 100%. *Косая штриховка* – ЛО крысы; *черная заливка* – крысы через 7 дней после И/Р; *серая заливка* – крысы через 14 дней после И/Р; *белая заливка* – крысы через 21 день после И/Р. Различия статистически значимы: $*p < 0.05$; $** p < 0.01$ (U-критерий Манна–Уитни).

среднем около 55% сосудов, что достоверно не отличалось от соответствующих реакций сосудов ЛО крыс (рис. 3*c*). Число и амплитуда АХ-опосредованных дилататорных реакций артерий всех исследованных диаметров на фоне предварительного введения клотримазола у крыс, перенесших ишемию, снижались, но эти изменения у животных после И/Р и у ЛО крыс были выражены в равной степени (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования было установлено, что И/Р коры головного мозга крыс, вызванная окклюзией обеих сонных артерий с управляемой гипотензией, у крыс в возрасте 18 месяцев приводит к угнетению АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении первых 14 дней после восстановления кровотока. Нами [18], а также другими исследователями [1–3], ранее было показано, что развитие сосудистой дисфункции после ишемии и последующей реперфузии может быть связано с возникновением эндотелиальной дисфункции, в основе которой лежит нарушение NO-опосредованных механизмов сосудистой регуляции, развивающееся вследствие снижения биодоступности и

синтеза NO. Уменьшение секреции и/или продукции NO может усиливать роль фактора эндотелиальной гиперполяризации (EDHF) в регуляции сосудистого тонуса [1, 3]. Структура EDHF к настоящему времени не установлена. Но известно, что важным начальным шагом в развитии эндотелий–зависимой гиперполяризации является активация расположенных в эндотелии сосудов IK_{Ca}-каналов (1, 4, 5). Во многих сигнальных событиях, развивающихся после И/Р, центральное место играет увеличение уровня внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках [19–22]. Высокие уровни кальция могут нарушать функцию эндотелия и изменять активность процессов, участвующих в регуляции сосудистого тонуса, в частности, влиять на активность IK_{Ca}-каналов [5, 20, 22].

В наших экспериментах у ЛО животных через 7 дней после операции клотримазол, являющийся ингибитором IK_{Ca}-каналов [23], вызывал сужение в среднем 45–65% пиальных артерий. Эти данные свидетельствуют о том, что у крыс в возрасте 18 мес. в физиологических условиях IK_{Ca}-каналы участвуют в поддержании тонуса пиальных артерий. У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после И/Р во всех группах исследованных сосудов отмечалось уменьшение числа констрикторных реакций на аппликацию клотримазола, по сравнению с реакциями сосудов в соответствующих группах у ЛО животных. Следовательно, можно утверждать, что И/Р вызывает снижение вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса пиальных артерий. Но эти данные противоречат результатам, полученным другими исследователями и свидетельствующим об отсутствии [22, 24] изменения или усилении [21] роли IK_{Ca}-каналов в поддержании тонуса мозговых сосудов после перенесенной И/Р. Различия в результатах могут быть обусловлены региональной и видовой изменчивостью в экспрессии IK_{Ca}-каналов [3]. Также причина появления противоречивых выводов может быть связана с методологическими подходами, приводящими к достижению различной степени ишемии и времени реперфузии [24, 25]. Немаловажным фактором, влияющим на результаты исследования, могут быть и отличия в строении исследованных сосудов. В сосудах, имеющих менее выраженный слой гладкомышечных клеток, в базальных условиях эндотелий может оказывать большее влияние на гладкую мускулатуру, так как такое структурное расположение допускает более полный перенос гиперполяризации, что невозможно в сосудах с более выраженным гладкомышечным слоем [16].

На протяжении последующего постишемического периода в наших экспериментах различия в реакциях артерий на воздействие клотримазола у крыс, перенесших И/Р, и ЛО животных уменьшались. Через 14 дней достоверные отличия наблюдались только в группе мелких сосудов. К 21-му дню реакции артерий всех исследованных диаметров на аппликацию клотримазола у животных, перенесших И/Р, не отличались от реакций артерий у ЛО крыс, что указывает на восстановление вклада IK_{Ca}-каналов в поддержании тонуса пиальных артерий в этот отрезок постишемического периода.

Число и амплитуда дилататорных реакций на воздействие АХ у артерий всех исследованных диаметров, предварительно подвергнутых воздействию клотримазола, у ЛО крыс во все временные отрезки послеоперацинного периода достоверно уменьшались. Это свидетельствует о том, что у ЛО животных IK_{Ca}-каналы играют значительную роль в осуществлении АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов. Согласно современным представлениям в основе механизма АХ-опосредованной активации IK_{Ca}-каналов лежит увеличение уровня внутриклеточного кальция посредством активации ваниллоидных каналов (TRPV4) в плазматической мембране и рецепторов инозитолтрисфосфата (IP3Rs) в эндоплазматическом ретикулуме [26]. У крыс, перенесших ишемию, характер АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артерий на фоне предваритель-

ной блокады IK_{Ca}-каналов также менялся. Через 7 дней после И/Р на фоне введения клотримазола число дилатаций пиальных артерий всех диаметров достоверно снижалось. Но это снижение было выражено в меньшей степени, чем у ЛО крыс. Наши данные отличаются от результатов, полученных другими исследователями, свидетельствующих об усилении EDHF-опосредованных ответов после перенесенной ишемии [1, 3, 21, 22, 24]. Мы полагаем, что различия могут быть обусловлены возрастными особенностями экспериментальных животных. В большинстве исследований, описанных в литературе, использовались молодые животные в возрасте 3–4 месяцев. В наших же экспериментах возраст крыс составлял 18 месяцев. Основной механизм, приводящий к изменениям EDHF-опосредованных вазодилататорных ответов, связывают с увеличением внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках, что может повышать активность IK_{Ca}-каналов, вызывая отток K^+ и гиперполяризацию мембраны [22, 27, 28]. В литературе имеются сведения о том, что в условиях покоя у старых животных по сравнению с молодыми особями открыто больше IK_{Ca}-каналов [29], что способствует гиперполяризации эндотелия. Связанное с перенесенной И/Р увеличение внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках может способствовать дополнительной активации IK_{Ca}-каналов. Известно, что гиперактивация IK_{Ca}-каналов уменьшает сопротивление клеточных мембран и снижает способность эндотелия артерий проводить электрические сигналы [15]. Вероятно, именно эти процессы и являются одной из причин снижения вклада IK_{Ca}-опосредованных дилататорных ответов пиальных артерий на воздействие АХ у стареющих крыс после перенесенной И/Р.

Через 14 дней после И/Р снижение вклада IK_{Ca}-каналов промежуточной проводимости в АХ-опосредованную дилатацию отмечалось только на сосудах диаметром менее 20 мкм. В остальных группах артерий клотримазол не изменял характер дилататорных ответов на АХ. Следовательно, в этот отрезок постишемического периода IK_{Ca}-каналы практически не участвовали в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий средних и крупных диаметров. Через 21 день после И/Р снижение числа и амплитуды дилататорных реакций на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca}-каналов у ЛО крыс и крыс, перенесших ишемию, достоверно не отличались.

Таким образом, нами было установлено, что И/Р коры головного мозга у крыс в возрасте 18 месяцев приводит к снижению вклада IK_{Ca}-каналов в поддержание тонуса пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении первых 14 дней после ишемического воздействия. Также снижается вклад IK_{Ca}-каналов в осуществление АХ-опосредованных дилататорных реакций. Это явление наблюдается уже через 7 дней после И/Р, а через 14 дней IK_{Ca}-каналы практически не участвуют в дилататорном ответе пиальных артерий на АХ. Обнаруженные нами постишемические изменения IK_{Ca}-сигнализации у стареющих животных могут являться причиной нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации и возникновения вазоспастических реакций, а также фактором риска развития повторных ишемических повреждений головного мозга.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской федерации” (2019-2030), тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.П.Г.), сбор данных (И.Б.С.), обработка данных (О.П.Г., И.Б.С.), написание и редактирование статьи (О.П.Г., И.Б.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Davis CM, Siler DA, Alkayed NJ* (2011) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: influence of sex, vessel size and disease state. Womens Health (Lond) 7(3): 293–303. https://doi.org/10.2217/whe.11.26
2. *Ma J, Ma Y, Shuaib A, Winship IR* (2020) Impaired collateral flow in pial arterioles of aged rats during ischemic stroke. Transl Stroke Res 11(2): 243–253. https://doi.org/10.1007/s12975-019-00710-1
3. *Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM* (2016) Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. Am J Transl Res 8(2): 765–777.
4. *Goto K, Ohtsubo T, Kitazono T* (2018) Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. Int J Mol Sci 19(1): 315. https://doi.org/10.3390/ijms19010315
5. *Tano JY, Gollasch M* (2014) Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update. Front Physiol 5: 381. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00381
6. *Hakim MA, Chum PP, Buchholz JN, Behringer EJ* (2020) Aging alters cerebrovascular endothelial GPCR and K+ channel function: divergent role of biological sex. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 75(11): 2064–2073. https://doi.org/10.1093/gerona/glz275
7. *Garland CJ, Bagher P, Powell C, Ye X, Lemmey HAL, Borysova L, Dora KA* (2017) Voltage-dependent Ca^{2+} entry into smooth muscle during contraction promotes endothelium-mediated feedback vasodilationin arterioles. Sci Signal 10: eall3806. https://doi.org/10.1126/scisignal.aal3806
8. *Dong P, Zhao J, Zhang Y, Dong J, Zhang L, Li D, Li L, Zhang X, Yang B, Lei W* (2014) Aging causes exacerbated ischemic brain injury and failure of sevoflurane post-conditioning: role of B-cell lymphoma-2. Neuroscience 275: 2–11. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.064
9. *Tang Y, Wang L, Wang J, Lin X, Wang Y, Jin K, Yang GY* (2016) Ischemia-induced angiogenesis is attenuated in aged rats. Aging Dis 7: 326–335. https://doi.org/10.14336/AD.2015.1125
10. *Gorshkova OP, Shuvaeva VN* (2020) Age1related changes in the role of calcium1activated potassium channels in acetylcholine mediated dilatation of pial arterial vessels in rats. J Evol Biochem Physiol 56(2): 145–152. https://doi.org/10.1134/S0022093020020064
11. *Izzo C, Carrizzo A, Alfano A, Virtuoso N, Capunzo M, Calabrese M, De Simone E, Sciarretta S, Frati G, Oliveti M, Damato A, Ambrosio M, De Caro F, Remondelli P, Vecchione C* (2018) The impact of aging on cardio and cerebrovascular diseases. Int J Mol Sci 19(2): 481. https://doi.org/10.3390/ijms19020481
12. *Winship IR* (2015) Cerebral collaterals and collateral therapeutics for acute ischemic stroke. Microcirculation 22(3): 228–236. https://doi.org/10.1111/micc.12177
13. *Van der Worp HB, Van Gijn J* (2007) Acute ischemic stroke. New England J Med 357(6): 572–579. https://doi.org/10.1056/NEJMcp072057
14. *Lensman M, Korzhevskii D, Mourovets VO, Kostkin V, Izyarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin V, Polenov S, Balestrino M* (2006) Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. Brain Res 1114 (1): 187–194. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.103
15. *Behringer EJ, Hakim MA* (2019) Functional interaction among K_{Ca} and TRP channels for cardiovascular physiology: modern perspectives on aging and chronic disease. Int J Mol Sci 20(6): 1380. https://doi.org/10.3390/ijms20061380
16. *Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA* (2009) SK_{Ca} and IK_{Ca} channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. Stroke 40(4): 1451–1457. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.535435
17. *Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A* (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric

circulation. J Cardiovasc Pharmacol 28(5): 703–711.
https://doi.org/10.1097/00005344-199611000-00014
18. *Горшкова ОП, Шуваева ВН, Ленцман МВ, Артемьева АИ* (2016) Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. Совр пробл науки и образов 5. URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=25270 (дата обращения: 09.01.2022). [*Gorshkova OP, Shuvaeva VN, Lentsman MV, Artemyeva AI* (2016) Postischemic changes in the vasomotor function of the endothelium. Modern Probl Sci and Educat 5. URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=25270 (accessed: 09.01.2022). (In Russ)].
19. *Dabertrand F, Nelson MT, Brayden JE* (2012) Acidosis dilates brain parenchymal arterioles by conversion of calcium waves to sparks to activate BK channels. Circ Res 110(2): 285–294
https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258145
20. *Li Y, Lapina N, Weinzierl N, Schilling L* (2018) Enhancement of bradykinin-induced relaxation by focal brain ischemia in the rat middle cerebral artery: receptor expression upregulation and activation of multiple pathways. PLoS One 13(6): e0198553.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198553
21. *Marrelli SP* (2002) Altered endothelial Ca^{2+} regulation after ischemia/reperfusion produces potentiated endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations. Stroke 33(9): 2285–2291.
https://doi.org/10.1161/01.str.0000027439.61501.39
22. *Palomares SM, Cipolla MJ* (2011) Vascular protection following cerebral ischemia and reperfusion. J Neurol Neurophysiol 2011: S1-004.
https://doi.org/10.4172/2155-9562.s1-004
23. *Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG* (2001) Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. J Biol Chem 276: 32040-5.
https://doi.org/10.1074/jbc.M105231200
24. *Cipolla MJ, Bullinger LV* (2008) Reactivity of brain parenchymal arterioles after ischemia and reperfusion. Microcirculation 15(6): 495–501.
https://doi.org/10.1080/10739680801986742
25. *Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ* (2016) Ischemia/reperfusion. Compr Physiol 7(1): 113–170.
https://doi.org/10.1002/cphy.c160006
26. *Sonkusare SK, Dalsgaard T, Bonev AD, Nelson MT* (2016) Inward rectifier potassium (Kir2.1) channels as end-stage boosters of endothelium-dependent vasodilators. J Physiol 594(12): 3271–3285.
https://doi.org/10.1113/JP271652
27. *Dora KA, Gallagher NT, McNeish A, Garland CJ* (2008) Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. Circ Res 102: 1247–1255.
https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.172379
28. *Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, Baban B* (2013) Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. Am J Cardiovasc Dis 3(4): 180–196.
29. *Behringer EJ, Shaw R.L, Westcott EB, Socha MJ, Segal SS* (2013) Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced Ca^{2+}-activated K^+ channel activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33(8): 1892–1901.
https:|//doi.org/
https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301514

Changes in the Contribution of IK_{Ca}-Channels to the Maintenanse of Tone and Dilation of the Pial Arteries in Aging Rats after Ischemia/Reperfusion

O. P. Gorshkova[a], *, and I. B. Sokolova[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*
**e-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

The changes in the contribution of calcium – sensitive potassium channels of intermediate conductivity (IK_{Ca}) in basal tone and acetylcholine (ACh) mediated dilation of pial arteries after global cerebral ischemia (2VO + hypo model) was studied in Sprague-Dawley 18-month-old rats. Vascular examination was performed 7, 14 and 21 days after ischemia. Sham-operated rats served as a control. The change in the contribution of IK_{Ca} – channels in basal tone was assessed using intravital microphotography. The number of vessels that constricted in response to the effect of the IK_{Ca} – channels blocker (clotrimazole,

10^{-5} M, 5 min) was assessed. The change in the contribution of channels in vascular dilatation was assessed by comparing the number and degree of arterial dilatation in response to ACh (10^{-7} M, 8 min) before and after the use of a IK_{Ca} – channels blocker. It was found that ischemia/reperfusion (I/R) in 18-month-old rats leads to a decrease in the number of the pial arteries dilatations to the effect of ACh, which persists for the first 14 days after ischemic exposure. During this post-ischemic period the contribution of IK_{Ca} – channels to the pial arteries tone and ACh–mediated dilatory response is also reduced. This phenomenon is observed already 7 days after I/R, and after 14 days, the IK_{Ca}-channels practically do not participate in the dilatory response of the pial arteries to ACh. By 21 days after I/R, all the studied processes are restored.

Keywords: IK_{Ca} potassium channels, aging, ACh–dependent vasodilatation, pial arteries, endothelial dysfunction

EDN: ONJSTA
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 649–666

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ КАРОТИДНОГО СИНУСА НА ПОЗДНИХ СТАДИЯ РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА

© 2022 г.
А. Н. Евдокименко[1, *], К. Н. Куличенкова[1], Т. С. Гулевская[1], М. М. Танашян[1]

[1]*Научный центр неврологии, Москва, Россия*

**E-mail: evdokimenko@neurology.ru*

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.
После доработки 07.04.2022 г.
Принята к публикации 07.04.2022 г.

Повышение неоваскуляризации атеросклеротической бляшки способствует дестабилизации ее структуры, прогрессированию атеросклероза и повышению риска осложнений, включая инфаркт миокарда и ишемический инсульт. Целью исследования стала комплексная оценка экспрессии разнонаправленных регуляторных факторов ангиогенеза в атеросклеротической бляшке каротидного синуса. В исследование включено 33 пациента с атеросклеротическим стенозом каротидного синуса ≥ 60%, которым была выполнена каротидная эндартерэктомия с последующим патоморфологическим исследованием удаленных атеросклеротических бляшек на всем их протяжении. Оценена структура бляшки, плотность расположения микрососудов в 1 см^2 бляшки, а также экспрессия сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGFA, VEGFB, VEGFC и VEGFD) и их рецепторов (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), FGF2, PDGF-B и TSP-1 с последующим корреляционным анализом полученных результатов. По результатам гистологического исследования 13 бляшек отнесены к атероматозным (тип Va), 12 – к осложненным (с изъязвлением покрышки и/или массивным кровоизлиянием в бляшку, тип VI), 6 – к кальцинозным (тип Vb) и 2 – к фиброзным (тип Vc). Новообразованные сосуды выявлены во всех бляшках (267.5 сосудов/1 см^2 [Q1 – 140.9; Q3 – 534.8]). Большинство новообразованных сосудов имели высокопроницаемый фенотип – нарушенная целостность эндотелия; отсутствие слоя перицитов; периваскулярные кровоизлияния. Обнаружена гиперэкспрессия VEGFD, значимо преобладавшая над прочими оцененными факторами ($p < 0.001$), и выраженная экспрессия VEGFA, VEGFR2, VEGFR3, FGF2 и PDGF-B. Иммунореактивность к VEGFB, VEGFC и TSP-1 была выражена в наименьшей степени, VEGFR1 выявлялся в следовых количествах. Количество микрососудов в бляшке значимо коррелировало с экспрессией VEGFA, VEGFD, FGF2, PDGF-B и VEGFR2 ($p < 0.01$). Связь прочих структурных компонентов бляшки с содержанием в ней ангиогенных факторов отсутствовала. Таким образом, в атеросклеротических бляшках каротидного синуса на поздних стадиях развития атеросклероза продемонстрирован резко выраженный проангиогенный профиль экспрессии различных регуляторных факторов ангиогенеза с несостоятельностью механизма стабилизации новообразованной сосудистой сети.

Ключевые слова: атеросклеротическая бляшка каротидного синуса, регуляция ангиогенеза, VEGF, VEGFR, FGF2, PDGF-B, TSP-1

DOI: 10.31857/S0869813922050041

Атеросклероз – хроническое, медленно прогрессирующее заболевание, ассоциированное с дисфункцией эндотелия; адгезией, активацией и миграцией моноцитов/макрофагов; окислительным стрессом; накоплением липидов в интиме; синтезом внеклеточного матрикса; миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток (ГМК) с формированием их секреторного фенотипа и пр. [1]. В процессе атерогенеза в бляшке создаются локальные условия (гипоксия, воспаление, окислительный стресс и др.), которые активируют ангиогенные факторы, запускающие образование сосудов преимущественно из предсуществующих vasa vasorum адвентиции [2]. Впервые новообразованные сосуды в атеросклеротической бляшке были обнаружены в 1936 г. [3], и в настоящее время повышение неоваскуляризации ассоциируется с ускорением прогрессирования атеросклероза, дестабилизацией структуры бляшки и повышением риска кардиальных и цереброваскулярных осложнений, включая инфаркт миокарда и ишемический инсульт [4–6].

Ангиогенез в бляшке исходно развивается как компенсаторная реакция, направленная на восстановление оксигенации и регенерацию интимы [3] и наблюдается уже на самых ранних его стадиях (стадия жировых пятен и полосок и ранее), что было продемонстрировано в ряде морфологических исследований [7]. Тем не менее, различные стимулы, в том числе гипоксия, воспаление, липопротеины низкой плотности и окислительный стресс, могут поддерживать длительный ангиогенный ответ, который приобретает патологический характер в связи с отсутствием фазы разрешения и стабилизации новообразованных сосудов и приводит к разрастанию “незрелой”, высокопроницаемой сосудистой сети [1].

Высокопроницаемый фенотип новообразованных сосудов в бляшках связан с многочисленными очагами нарушения целостности эндотелия, неполноценными плотными контактами между эндотелиальными клетками и отсутствием слоя перицитов [4]. В недавно проведенных морфологических исследованиях продемонстрировано, что тонкостенные сосуды являются не только причиной кровоизлияний в бляшку, дополнительным источником поступления в бляшку липопротеидов, белков плазмы и воспалительных клеток, но также и источником эндотелиальных клеток-предшественников, принимающих активное участие в увеличении площади новообразованной “незрелой” сосудистой сети [8].

Ангиогенез – это динамический процесс, регулируемый неустойчивым равновесием между ангиогенными и ангиостатическими факторами, который в конечном итоге приводит к увеличению площади, стабилизации или регрессу сосудистой сети [1]. В многочисленных исследованиях определен широкий спектр регуляторов ангиогенеза, включая его стимуляторы, ингибиторы и стабилизаторы сосудистой сети [3], среди которых наиболее изученными являются сосудистый эндотелиальный фактор роста A (VEGFA), основной фактор роста фибробластов (FGF2), фактор роста тромбоцитов бета (PDGF-B) и тромбоспондин-1 (TSP-1). Большинство работ по изучению ангиогенеза посвящено ключевому, по общепринятому мнению, регуляторному пути VEGFA/VEGFR2, тогда как прочим членам семейства сосудистых эндотелиальных факторов роста (в частности, VEGFB, VEGFC и VEGFD) и их рецепторам (VEGFR1 и VEGFR3) до недавнего времени отводилась незначительная роль в регуляции ангиогенеза. Тем не менее, в последние годы стало появляться все больше работ, свидетельствующих об их активном участии в ангиогенезе, а также о сложной, во многом слабо изученной системе взаимодействий как между сосудистыми эндотелиальными факторами роста и их рецепторами, так и между ними и прочими регуляторами ангиогенеза, а именно FGF2, PDGF-B и TSP-1 [6, 9–11]. Кроме того, описан ряд компенсаторных механизмов, направленных на восстановление ангиогенеза в случае блокады одного из регуляторных путей [12], вследствие чего многие авторы указывают на необходимость комплексного изучения разнонаправленных регуляторных путей.

Несмотря на то, что пусковые факторы и механизмы регуляции ангиогенеза в целом являются универсальными вне зависимости от запустившего его патологического процесса, значительная роль в координации разнонаправленных путей принадлежит комплексу локальных, специфичных для каждого заболевания/состояния, факторов [1]. Большинство проведенных исследований касалось роли и регуляции ангиогенеза при онкологических заболеваниях и включало оценку одного, значительно реже двух из наиболее широко изученных регуляторных факторов. В то же время проблеме регуляции ангиогенеза в атеросклеротической бляшке посвящено значительно меньше работ. Исследования проводились преимущественно на клеточных и животных моделях атеросклероза, не способных в полной мере воспроизвести сложный и многокомпонентный процесс. В особенности это касается поздних стадий развития атеросклероза, а также изъязвления покрышки и неоваскуляризации бляшки, которые до недавнего времени были слабо воспроизводимы. У животных неоваскуляризация бляшки оценивалась преимущественно косвенно, в адвентиции, в связи с редкой встречаемостью сосудов в самой бляшке в большинстве классических животных моделей атеросклероза (ApoE$^{-/-}$ и LDLR$^{-/-}$) [13]. Кроме того, комплексные исследования с одновременной оценкой разнонаправленных звеньев регуляции ангиогенеза в атеросклеротической бляшке человека отсутствуют, что в совокупности и определило цель данного исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 33 пациента (22 мужчины и 11 женщин; средний возраст 65 ± 8.6 лет) с атеростенозом каротидного синуса (КС) ≥ 60% (84% ± 9%) по данным дооперационного дуплексного сканирования ветвей дуги аорты, которым была выполнена операция каротидной эндартерэктомии с последующим патоморфологическим исследованием удаленных атеросклеротических бляшек на всем их протяжении. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Бляшки в зависимости от длины разрезали на 4–9 поперечных блоков толщиной 0.3 см, которые фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. С каждого парафинового блока делали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методам ван Гизона и Вейгерта для оценки структуры бляшки и выявления коллагеновых и эластических волокон соответственно, а также иммуногистохимически с использованием антител к CD34 (выявление кровеносных сосудов), CD68 (оценка общей макрофагальной реакции), сосудистым эндотелиальным факторам роста (VEGFA, VEGFB, VEGFC и VEGFD) и их рецепторам (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), FGF2, PDGF-B и TSP-1.

Для визуализации иммунопероксидазной реакции использовали систему детекции Ultravision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией следующим образом. Срезы депарафинировали, дегидратировали в ряду спиртов нисходящей концентрации, промывали в дистиллированной воде, обрабатывали раствором UltraVision Peroxide Block (Thermo Fisher Scientific, США) для инактивации тканевых пероксидаз, после чего демаскировали антиген в цитратном буфере с pH 6 (Abcam, США) на водяной бане при температуре 80°C в течение 20 мин. После остывания раствора (около 30 мин) препараты выдерживали в трис-буферном солевом растворе (TBS) с добавлением 0.1%-ного раствора Triton x100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин, блокировали неспецифи-

Таблица 1. Подробная информация об использованных первичных антителах и условиях иммуногистохимической реакции

Антиген	Первичное антитело				
	Клон	Вид-хозяин	Производитель/ каталожный номер	Разведение	Время и условия инкубации
VEGF-A	VG-1	Мышь	Abcam, США/ab1316	1 : 200	4°C, в течение ночи
VEGF-B	J14-I	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-80442	1 : 50	4°C, в течение ночи
VEGF-C	MM0006-2 E65	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-101583	1 : 50	4°C, в течение ночи
VEGF-D	EPR8457	Кролик	Abcam, США/ab 155288	1 : 300	25°C, 20 мин
VEGFR1	D-2	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-271789	1 : 200	4°C, в течение ночи
VEGFR2	A-3	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-6251	1 : 50	4°C, в течение ночи
VEGFR3	D-6	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-28297	1 : 200	4°C, в течение ночи
FGF2	3D9	Мышь	GeneTex, США/GTX84502	1 : 50	25°C, на шейкере, 60 мин
TSP-1	3F357	Мышь	Santa Cruz Biotechnology, США/sc-73158	1 : 100	4°C, в течение ночи
PDGF-B	–	Кролик	GeneTex, США/GTX54575	1 : 200	25°C, на шейкере, 60 мин
CD34	QBEnd/10	Мышь	ThermoScientific, США/MS-363-P	1 : 200	4°C, в течение ночи
CD68	Kp-1	Мышь	CellMarque, США/188M-96	1 : 200	25°C, 30 мин

ческое связывание раствором UltraVision Protein Block (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали срезы с раствором антител во влажной камере. Разведения антител, время и условия инкубации представлены в табл. 1.

После инкубации с антителами препараты промывали раствором TBST (трис-буфер с NaCl и Твин 20), помещали в раствор усилителя первичных антител Primary Antibody Amplifier Quanto (Thermo Fisher Scientific, США) на 10 мин, повторно промывали TBST, выдерживали 10 мин в конъюгированной с полимером пероксидазе хрена HRP polymer Quanto (Thermo Fisher Scientific, США), промывали в дистиллированной воде, окрашивали в течение 5 мин 3-3-диаминобензидином (DAB) в составе приготовленной согласно инструкции смеси DAB Quanto Substrate и DAB Quanto Chromogen (Thermo Fisher Scientific, США), после чего докрашивали гематоксилином. В качестве отрицательного контроля проводилась иммуногистохимическая реакция без первичных антител.

Окрашенные срезы переводили в цифровую форму с помощью сканера гистологических препаратов Pannoramic MIDI II (3DHISTECH Ltd., Венгрия) при 400-кратном увеличении изображения и анализировали в программе CaseViewer (3DHISTECH Ltd., Венгрия). Оценивали объемную долю атероматоза (%), объемную долю кальцификатов (%), степень выраженности в бляшке пылевидного обызвествления (включая мелкие кальцификаты), свежих и организованных кровоизлияний, а также макрофагальной реакции.

Степень выраженности пылевидного обызвествления и кровоизлияний оценивали полуколичественно по 5-бальной шкале: 0 – компонент отсутствует, 1 – компонент присутствует в следовых количествах, 2 – компонент занимает до 25% площади среза, 3 – от 25 до 50% площади среза, 4 – более 50% площади среза.

Макрофагальную реакцию, а также экспрессию ангиогенных факторов и их рецепторов в бляшке также оценивали полуколичественно по 5-бальной шкале: 0 – отсутствие экспрессии или отдельные иммунореактивные клетки; 1 – единичные небольшие скопления иммунореактивных клеток; 2 – скопления иммунореактив-

Таблица 2. Характеристика структурных компонентов атеросклеротических бляшек каротидного синуса ($n = 33$)

№	Наименование компонента	n бляшек, в которых компонент выявлен	% бляшек, в которых компонент выявлен	Me [Q1; Q3]
1	Атероматоз, % площади бляшки	31	94	27.6 [8.3; 38.5]
2	Очаги пылевидного обызвествления	30	91	НП
3	Кальцификаты различного размера, % площади бляшки	28	85	5.6 [2.5; 13.1]
4	Свежее/организующееся кровоизлияние	17	52	НП
5	Организованные кровоизлияния (скопления гемосидерина, сидерофагов)	19	58	НП
6	Изъязвление покрышки	7	21	НП
7	Неоваскуляризация, количество $CD34^+$ сосудов в 1 см^2 бляшки	33	100	267.5 [140.9; 534.8]

НП – не применимо.

ных клеток занимают в совокупности до 15% площади среза; 3 – скопления иммунореактивных клеток занимают в совокупности от 15 до 30% площади среза; 4 – скопления иммунореактивных клеток занимают в совокупности более 30% площади среза. Интенсивность экспрессии маркеров оценивали полуколичественно: + слабая экспрессия; ++ умеренная экспрессия; +++ выраженная экспрессия.

С учетом крайне неравномерного расположения сосудов в бляшке, количество новообразованных сосудов ($CD34^+$) анализировали во всех поперечных срезах бляшки и рассчитывали усредненную величину “количество сосудов в 1 см^2 бляшки” (сумма всех сосудов во всех срезах, разделенная на сумму площадей всех срезов в см^2).

Статистическую обработку проводили в программе Statistica (StatSoft Inc., США) версии 13.3. Для выявления различий между независимыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, анализа парных измерений – критерий Вилкоксона, зависимости – коэффициент корреляции Спирмена. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0.05$. Результаты представлены в виде медианы [квартиль 1; квартиль 3] (Me [Q1; Q3]).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализирована структура 33 атеросклеротических бляшек. Результаты гистологического исследования бляшек представлены в табл. 2. В соответствии с международной классификацией [14], 13 бляшек отнесено к типу V (атероматозные бляшки), 12 – к типу VI (осложненные атеросклеротические поражения с изъязвлением покрышки и/или массивным кровоизлиянием в бляшку), 6 – к типу Vb или VII (кальцинозные бляшки) и 2 – к типу Vc или VIII (фиброзные бляшки).

Новообразованные сосуды обнаружены во всех бляшках. Количество сосудов варьировало в широких пределах, составив от 15 до 1320 в 1см^2. Большинство из них имели незрелую структуру – тонкую стенку, представленную только слоем эндотелиальных клеток (ЭК), при этом слой перицитов, как правило, отсутствовал; целостность эндотелиального слоя во многих случаях была нарушена, между эндотелиоцитами наблюдались щели; отмечались признаки нарушения проницаемости – в 73% бляшек выявлены периваскулярные скопления эритроцитов, сидерофагов и/или глыбок гемосидерина (рис. 1).

Оценена экспрессия 4-х классических стимуляторов ангиогенеза – сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD) и рецепторов к ним (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), альтернативного активатора ангиоге-

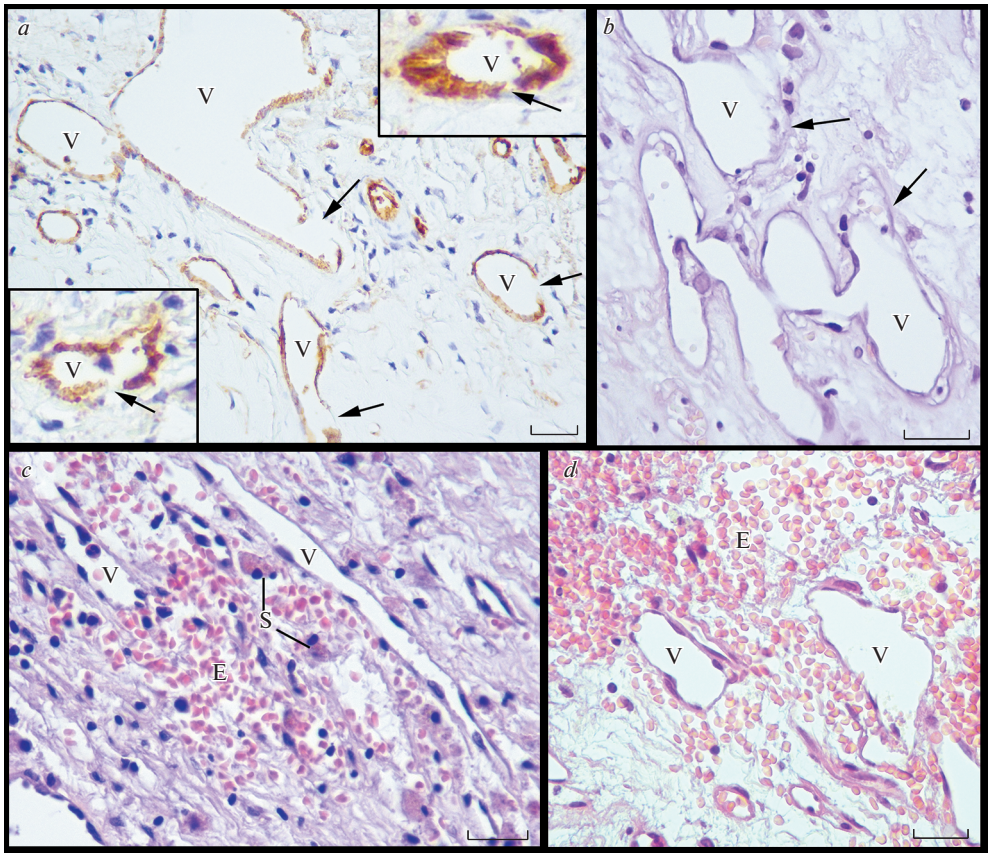

Рис. 1. Новообразованные сосуды (V) бляшки каротидного синуса человека с участками нарушения целостности эндотелиального слоя (указаны стрелками) и периваскулярными кровоизлияниями (скопления эритроцитов (E) и сидерофагов (S)). *a* – иммуногистохимическая реакция с антителами к CD34; *b*–*d* – окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок соответствует 25 мкм.

неза (FGF2), ингибитора ангиогенеза (TSP-1) и стабилизатора новообразованной сосудистой сети (PDGF-B). Сводные данные по интенсивности и распространенности экспрессии ангиогенных факторов представлены в табл. 3 и 4.

Анализ экспрессии ангиогенных факторов продемонстрировал отчетливое преобладание экспрессии VEGFD над прочими оцененными факторами роста ($p < 0.001$). Выраженная иммунореактивность к VEGFD наблюдалась во всех типах клеток, включая макрофаги и гигантские многоядерные клетки, ГМК/миофибробласты бляшки и ГМК средней оболочки, ЭК каротидного синуса и новообразованных сосудов бляшки (табл. 3). Следует также подчеркнуть распространенный характер иммунореактивности – в подавляющем большинстве бляшек наблюдалась субтотальная экспрессия маркера клеточными популяциями бляшки (табл. 4, рис. 2*d*).

В меньшей по сравнению с VEGFD, но также в значительной степени была выражена экспрессия VEGFA, FGF2 и PDGF-B (рис. 2*a*, 2*e* и 2*f* соответственно). Распространенность и интенсивность экспрессии данных факторов роста значимо между собой не различались ($p < 0.05$). Положительная цитоплазматическая иммунореактивность, как и в случае VEGFD, наблюдалась в макрофагах и гигантских

Таблица 3. Экспрессия регуляторов ангиогенеза и их рецепторов в различных структурных компонентах атеросклеротической бляшки каротидного синуса человека

Фактор роста/ рецептор	Эндотелиоциты	Миофибробласты/ гладкомышечные клетки	Макрофаги	Внеклеточный матрикс
VEGFA (n = 32)	++	++	+++	+
VEGFB (n = 32)	+	+	++	–
VEGFC (n = 27)	++	++	++	–
VEGFD (n = 33)	+++	+++	+++	–
VEGFR1 (n = 5)	–	–	+	–
VEGFR2 (n = 32)	++	+++	++	++
VEGFR3 (n = 33)	+	+	+++	–
FGF2 (n = 32)	++	++	+++	+++
TSP-1 (n = 17)	+	+	++	++
PDGF-B (n = 33)	++	++	+++	+++

+ слабая экспрессия; ++ умеренная экспрессия; +++ выраженная экспрессия.

Таблица 4. Распространенность экспрессии регуляторов ангиогенеза и их рецепторов в клетках атеросклеротических бляшек каротидного синуса человека

Фактор роста/рецептор	Степень выраженности экспрессии*				
	0	1	2	3	4
VEGFA (n = 32)	0	1 (3%)	14 (44%)	13 (41%)	4 (12%)
VEGFB (n = 32)	6 (18%)	13 (41%)	13 (41%)	0	0
VEGFC (n = 27)	1 (4%)	11 (40%)	14 (52%)	1 (4%)	0
VEGFD (n = 33)	0	0	3 (9%)	12 (36%)	18 (55%)
VEGFR2 (n = 32)	0	6 (19%)	17 (53%)	8 (25%)	1 (3%)
VEGFR3 (n = 33)	1 (3%)	5 (15%)	12 (36%)	13 (40%)	2 (6%)
FGF2 (n = 33)	0	4 (12%)	15 (46%)	13 (39%)	1 (3%)
TSP-1 (n = 17)	3 (18%)	7 (41%)	7 (41%)	0	0
PDGF-B (n = 33)	0	0	18 (55%)	11 (33%)	4 (12%)

0 – отсутствие экспрессии или отдельные иммунореактивные клетки; 1 – единичные небольшие скопления иммунореактивных клеток; 2 – иммунореактивные клетки занимают в совокупности до 15% площади среза; 3 – иммунореактивные клетки занимают в совокупности от 15 до 30% площади среза; 4 – иммунореактивные клетки занимают в совокупности более 30% площади среза.

многоядерных клетках, ГМК/миофибробластах бляшки и средней оболочки, ЭК новообразованных сосудов бляшки и каротидного синуса. При этом экспрессия маркеров наиболее стабильно выявлялась в макрофагах, тогда как в ГМК и ЭК значительно варьировала в разных бляшках – от отдельных иммунореактивных клеток и небольших их очаговых скоплений до субтотальной экспрессии клеточными популяциями бляшки. Наиболее выраженная экспрессия VEGFA, FGF2 и PDGF-B в ГМК и ЭК отмечалась в бляшках с многочисленными крупными скоплениями макрофагов, также экспрессирующих данные маркеры. Кроме того, при иммуногистохимической реакции наблюдалось окрашивание волокнистого компонента бляшки – преимущественно слабое очаговое в случае VEGFA, выраженное и распространенное в случае FGF2, а также выраженное и распространенное, но ассоциированное в наибольшей степени с эластическими волокнами, в случае PDGF-B.

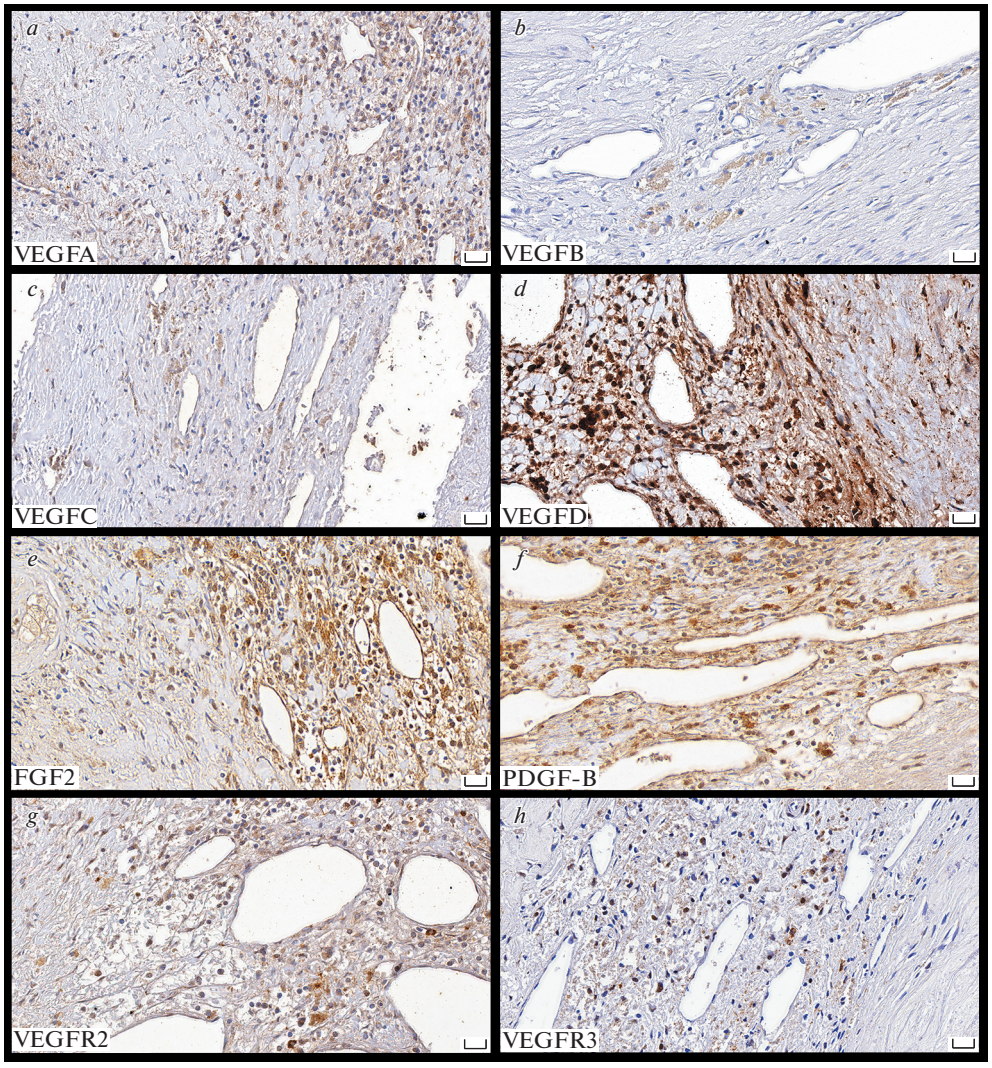

Рис. 2. Экспрессия ангиогенных факторов и их рецепторов в кальцинозной атеросклеротической бляшке каротидного синуса (тип VII). Масштабный отрезок соответствует 20 мкм.

Содержание в бляшке VEGFA, VEGFD и FGF2 прямо коррелировало между собой ($p < 0.05$), в особенности VEGFA с двумя другими факторами ($p < 0.01$). Кроме того, экспрессия PDGF-B слабо коррелировала с экспрессией FGF2 ($p < 0.05$), при этом в бляшках с многочисленными скоплениями PDGF-B$^+$ клеток было значимо больше FGF2 иммунопозитивных клеток ($p < 0.05$). Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 5.

В наименьшей степени среди активаторов ангиогенеза в бляшке экспрессировались VEGFB и VEGFC ($p < 0.001$). Слабая или умеренная иммунореактивность к VEGFB (рис. 2*b*) отмечалась главным образом в макрофагах и отдельных ЭК или ГМК. Среди иммунореактивных к VEGFC клеток также преобладали макрофаги,

Таблица 5. Корреляционная матрица степени выраженности неоваскуляризации и экспрессии регуляторов ангиогенеза и их рецепторов в атеросклеротической бляшке каротидного синуса человека

	Коэффициент корреляции, *R*									
	VEGFA	VEGFB	VEGFC	VEGFD	FGF2	TSP-1	PDGF-B	VEGFR2	VEGFR3	Количество $CD34^+$ сосудов в 1 см^2 бляшки
VEGFA	1.00	0.26	0.18	**0.62****	**0.51****	0.43	0.29	**0.39***	**0.56****	**0.48****
VEGFB	0.26	1.00	**0.42***	0.17	**0.35***	0.46	–0.07	0.32	**0.41***	0.34
VEGFC	0.18	**0.42***	1.00	0.20	0.21	**0.79****	0.34	0.13	0.13	0.24
VEGFD	**0.62****	0.17	0.20	1.00	**0.42***	0.31	**0.37***	0.33	**0.42***	**0.51****
FGF2	**0.51****	**0.35***	0.21	**0.42***	1.00	0.20	**0.37***	**0.72****	**0.58****	**0.51****
TSP-1	0.43	0.46	**0.79****	0.31	0.20	1.00	**0.56***	0.00	0.45	0.19
PDGF-B	0.29	–0.07	0.34	**0.37***	**0.37***	**0.56***	1.00	0.32	0.24	**0.45****
VEGFR2	**0.39***	0.32	0.13	0.33	**0.72****	0.00	0.32	1.00	**0.60****	**0.59****
VEGFR3	**0.56****	**0.41***	0.13	**0.42***	**0.58****	0.45	0.24	**0.60****	1.00	**0.38***
Количество $CD34^+$ сосудов в 1 см^2 бляшки	**0.48****	0.34	0.24	**0.51****	**0.51****	0.19	**0.45****	**0.59****	**0.38***	1.00

* $p < 0.05$, **$p < 0.01$.

однако экспрессия в ЭК и ГМК встречалась чаще и имела более выраженную интенсивность (табл. 3, рис. 2*c*), а доля иммунореактивных клеток больше, хотя различие в выраженности экспрессии данных факторов не достигало статистической значимости.

Экспрессия TSP-1 оценена только в 17 бляшках. Среди иммунореактивных клеток преобладали макрофаги, как правило формирующие немногочисленные небольшие скопления (табл. 4). Слабая экспрессия также наблюдалась в единичных ГМК и ЭК (табл. 3). Количество TSP-1 в бляшках было значимо ниже, чем прочих проанализированных регуляторов ангиогенеза ($p < 0.001$ в случае VEGFA, VEGFD, FGF2 и PDGF-B; $p < 0.05$ в случае VEGFC), за исключением VEGFB ($p = 0.5$), и коррелировала с уровнем VEGFC ($p < 0.001$) и PDGF-B ($p < 0.05$) (табл. 5).

Помимо ангиогенных факторов была оценена экспрессия рецепторов к сосудистым эндотелиальным факторам роста. VEGFR1 выявлялся в бляшке в следовых количествах в макрофагах, поэтому было исследовано только 5 бляшек. В бляшках преобладала экспрессия VEGFR2 и VEGFR3, коррелировавшая между собой ($p < 0.001$, табл. 5). Иммунореактивность к обоим рецепторам наблюдалась в макрофагах, ГМК бляшки и средней оболочки, а также ЭК (рис. 1*g*, 1*h*), однако характер и интенсивность экспрессии различались (табл. 3). В то время как VEGFR2 активно экспрессировался во всех типах клеток, причем наиболее выражена экспрессия была в ГМК/миофибробластах, иммунореактивность к VEGFR3 главным образом отмечалась в макрофагах, значительно реже в ГМК и в отдельных бляшках в ЭК, причем экспрессия наблюдалась в отдельных клетках эндотелиальной выстилки новообразованного сосуда. С экспрессией обоих рецепторов в бляшках прямо коррелировало содержание в ней FGF2 ($p < 0.001$), причем с VEGFR2 в большей степени, чем с VEGFR3 (табл. 5). Также отмечена прямая зависимость между экспрессией VEGFA и VEGFR3 ($p < 0.001$, табл. 5).

Содержание проанализированных факторов роста и их рецепторов значимо не различалось в бляшках разного типа, в зависимости от объема атероматоза, кальцификатов, степени выраженности воспаления (размера скоплений $CD68^+$ макрофагов). В то же время отмечена прямая зависимость между плотностью расположения новообразованных сосудов в бляшке (количеством сосудов в 1 см^2 бляшки) и со-

держанием в ней VEGFA, VEGFD, FGF2, PDGF-B, VEGFR2 ($p < 0.01$) и VEGFR3 ($p < 0.05$, табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ангиогенез представляет собой сложный процесс, регулируемый про- и антиангиогенными факторами, которые включают динамическое взаимодействие между многочисленными клетками, факторами роста и внеклеточным матриксом [15]. Ключевым фактором запуска ангиогенеза считается VEGFA, который при взаимодействии с VEGFR2 вызывает пролиферацию, миграцию и инвазию ЭК в окружающие ткани, способствует привлечению воспалительных клеток, а также стимулирует синтез матриксных металлопротеиназ, необходимых для деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса, обязательного этапа ангиогенеза [16]. VEGFA является наиболее изученным ангиогенным фактором в семействе сосудистых эндотелиальных факторов роста [3]. Связывание VEGFA с VEGFR2 также приводит к выраженному повышению проницаемости эндотелия [16], вследствие чего он также известен как фактор сосудистой проницаемости.

VEGFA в норме экспрессируется преимущественно в ЭК и перицитах, однако в условиях гипоксии и воспаления также отмечена его продукция моноцитами/макрофагами и ГМК [17]. Согласно ранее проведенным исследованиям, VEGFA в большом количестве представлен в бляшках сонных артерий на поздних стадиях развития атеросклероза, где он выявлялся в ЭК, ГМК и макрофагах [18]. Мы также отметили выраженную экспрессию VEGFA в бляшках каротидного синуса, при этом иммунореактивность наиболее стабильно наблюдалась в макрофагах, тогда как в ГМК и ЭК варьировала в широких пределах, но увеличивалась с повышением количества иммунореактивных макрофагов.

Прямая зависимость между уровнем VEGFA и выраженностью неоваскуляризации продемонстрирована в многочисленных работах при широком спектре различных заболеваний, включая атеросклероз [17]. Кроме того, применение моноклональных антител к VEGFA приводило к уменьшению неоваскуляризации и размера бляшки [13], подчеркивая значимость фактора в ангиогенезе при атеросклерозе. Полученные нами данные подтверждают описанную закономерность – выраженность экспрессии VEGFA коррелировала с количеством микрососудов в бляшке. Активация VEGFA в бляшках приводит к формированию высокопроницаемых, структурно неполноценных микрососудов, которые способствуют усилению воспаления, окислительного стресса и, в целом, прогрессированию атеросклероза [16]. В этой связи неудивительно, что VEGFA рассматривался как многообещающая мишень терапевтического воздействия для блокады ангиогенеза в бляшке. Тем не менее, спектр побочных эффектов, выявленных в клинических исследованиях при онкологических и офтальмологических заболеваниях [17], исключает использование блокаторов VEGFA/VEGFR2 для длительного лечения атеросклероза.

Экспрессия VEGFR2 в проанализированных бляшках также была выражена в значительной степени, наблюдалась в ЭК, макрофагах и особенно ГМК, а также коррелировала с количеством микрососудов. По данным литературы, VEGFR2 преимущественно выявляется в ЭК, но не в макрофагах или ГМК, опосредуя передачу сигнала VEGFA [16]. Тем не менее, экспрессия VEGFR2 в ГМК была отмечена в немногочисленных исследованиях. В частности, в одном исследовании на культуре ГМК продемонстрировано резкое повышение экспрессии VEGFR2 под действием гипоксии, что в сочетании с повышенным уровнем VEGFA приводило к активации пролиферации ГМК [19]. Кроме того, экспрессия рецептора была зафиксирована в ГМК аорты кроликов WHHL (генетически гиперлипемичные кролики Ватанаба) [20]. Таким образом, персистирующая резко выраженная гипоксия

в бляшке каротидного синуса на поздних стадиях развития атеросклероза может стимулировать экспрессию VEGFR2 в ГМК с последующей их пролиферацией, что, возможно, объясняет выявленную нами экспрессию рецептора в ГМК и требует дополнительного подтверждения.

В моноцитах/макрофагах и ГМК наряду с ЭК чаще описывается экспрессия другого рецептора VEGFA – VEGFR1 [16]. VEGFR1 имеет в 10 раз более высокое сродство к VEGFA, чем VEGFR2, однако результирующий сигнал является слабым [17]. Растворимая форма рецептора связывает VEGFA, предотвращая его связывание с полноразмерной формой VEGFR1 и VEGFR2 [21]. Кроме того, гетеродимеры VEGFR1/VEGFR2 блокируют передачу сигнала VEGFA, предотвращая VEGFR2 гомодимерную активность [12]. В этой связи VEGFR1 известен своей негативной регуляторной ролью в ангиогенезе. В проведенном исследовании VEGFR1 выявлялся в бляшках в следовых количествах, что могло дополнительно стимулировать ангиогенез и ускорить прогрессирование атеросклероза вследствие усиления сигнала VEGFA/VEGFR2. Имеются данные о деградации рецептора при связывании с липопротеинами низкой плотности [15], широко представленными в бляшках, что может отчасти объяснить отмеченный в нашем исследовании столь низкий уровень VEGFR1.

Мы также проанализировали содержание в бляшках других членов семейства VEGF, а именно VEGFB, VEGFC и VEGFD, с неожиданным результатом – из всех проанализированных сосудистых эндотелиальных факторов роста, включая VEGFA, отмечено ранее не описанное отчетливое преобладание VEGFD с субтотальной выраженной экспрессией маркера всеми типами клеточных популяций в большинстве исследованных бляшек.

VEGFD очень близок по структуре и рецепторной специфичности к VEGFC, и основным его биологическим эффектом при взаимодействии с VEGFR3 ранее считался лимфангиогенез [17]. Тем не менее, было продемонстрировано, что VEGFD является эффективным ангиогенным фактором, реализующим свое действие через посредство VEGFR2 или гетеродимеров VEGFR2/VEGFR3 либо опосредованно, повышая экспрессию других факторов роста, включая VEGFA [16]. Полученные нами данные о наличии корреляции между уровнями VEGFD и VEGFA в бляшке могут косвенно подтверждать ранее отмеченную другими авторами взаимосвязь двух факторов. Прямая зависимость степени выраженности неоваскуляризации в бляшке и экспрессии в ней VEGFD также может указывать на активное участие VEGFD в регуляции ангиогенеза при атеросклерозе.

Большинство опубликованных результатов исследований по механизму действия VEGFD посвящено его роли в канцерогенезе, в том числе в аспекте патологического ангио- и лимфангиогенеза, а также в патогенезе других заболеваний, включая сердечно-сосудистые [16, 22]. Данные о роли VEGFD в атерогенезе и прогрессировании атеросклероза, в том числе в неоваскуляризации бляшки, единичны. В частности, на кроличьей модели сахарного диабета в атеросклеротических бляшках каротидного синуса продемонстрировано, что экспрессия VEGFD в атеросклеротических бляшках была повышена и наблюдалась в ЭК, ГМК и макрофагах [20, 23], это согласуется с полученными нами данными по характеру экспрессии маркера. Проатерогенное действие VEGFD также показано на модели каротидной гиперплазии у кроликов, у которых введение в адвентицию аденовируса, кодирующего VEGFD, приводило к утолщению интимы [1]. Помимо ангио- и лимфангиогенного действия, сигнальный путь VEGFD/VEGFR3 вовлечен в стимуляцию миграции и пролиферации миофибробластов, а также стимуляцию синтеза коллагена 1-го типа в культуре миофибробластов сердца, способствуя фиброзу [24]. VEGFD также обладает антиоксидантной активностью и регулирует липидный обмен [16].

В целом, имеющиеся в литературе данные свидетельствует о потенциально значительной роли VEGFD в атерогенезе и неоваскуляризации, что требует дополнительного изучения и делает его привлекательной мишенью терапевтического воздействия при атеросклерозе, в особенности с учетом широкого спектра уже разработанных препаратов, направленных на активацию или подавление VEGFD/VEGFR3 сигнального пути. Препараты данного типа успешно прошли доклинические исследования и применяются в клинических исследованиях I/IIa фазы при онкологических, офтальмологических (влажная возрастная макулярная дегенерация) и сердечно-сосудистых заболеваниях (рефрактерная стенокардия) [22].

По нашим данным, содержание VEGFC в бляшках было значимо ниже, чем VEGFD и VEGFA. VEGFC считается ключевым фактором лимфангиогенеза, реализующим свое действие через взаимодействие с VEGFR3 [16]. Тем не менее, VEGFC может связываться с VEGFR2, хотя и с более низкой афинностью, чем с VEGFR3, и запускать ангиогенез [16]. Отмечена обратная связь между ангиогенезом и лимфангиогенезом, а именно значимое снижение ангиогенеза при активном развитии лимфатической сети и наоборот. Поэтому ангиогенез, опосредуемый VEGFC, преимущественно происходил вдали от очагов лимфангиогенеза [16]. Кроме того, получены данные о возможности запуска ангиогенеза при связывании VEGFC с VEGFR3 за счет стимуляции экспрессии PDGF-B, вовлеченного в активацию ЭК [25], или под действием атерогенной микроРНК MiR-27b, которая усиливала экспрессию VEGFC с последующей стимуляцией пролиферации и миграции клеток и ангиогенеза в культуре HMEC-1 [26]. В дополнение к регуляции ангио-/лимфангиогенеза и воспаления, VEGFC, как и VEGFD, обладает фиброгенной активностью – непосредственно способствует пролиферации, миграции и синтезу коллагена фибробластами [16].

Обнаруженное нами высокое содержание в бляшках каротидного синуса VEGFR3 – основного рецептора VEGFC и VEGFD, сопоставимое с уровнем VEGFR2, указывало на его потенциально значимую роль в ангиогенезе и атерогенезе. VEGFR3 преимущественно экспрессируется в лимфатических ЭК, стимулируя их дифференцировку, пролиферацию, миграцию и выживаемость при связывании с VEGFC и VEGFD, тем самым стимулируя лимфангиогенез [16]. Маркер также отмечен в макрофагах [16]. Мы получили сходные данные по экспрессии рецептора – в атеросклеротической бляшке VEGFR3 главным образом выявлялся в макрофагах, значительно реже в ГМК и лишь в единичных ЭК, которые также экспрессировали CD34 (сосудистые ЭК). При этом экспрессия VEGFR3, согласно полученным нами результатам, коррелировала с содержанием в бляшке VEGFR2 и VEGFA. О наличии модулирующей роли VEGFR3 в передаче сигнала VEGFA/VEGFR2, а также тесной связи VEGFR2 и VEGFR3 свидетельствовали результаты ряда ранее проведенных исследований [27, 28]. В частности, отмечено взаимодействие VEGFR2 и VEGFR3 по системе обратной связи – VEGFR2 стимулировал экспрессию VEGFR3, который затем подавлял экспрессию VEGFR2 [27]. VEGFA, VEGFC и VEGFD стимулировали образование гетеродимеров VEGFR2/VEGFR3, которые активируют пролиферацию ЭК, способствуя новообразованию сосудов [28]. При этом гетеродимеры могут активировать ангиогенез даже при блокаде VEGFR2, вероятно, вследствие усиления тирозинкиназной активности VEGFR3 при связывании с VEGFR2 [27].

В наименьшей степени среди сосудистых эндотелиальных факторов роста в бляшках был представлен VEGFB, который выявлялся главным образом в макрофагах и единичных ГМК и ЭК. Тем не менее, экспрессия VEGFB значимо не отличалась от экспрессии VEGFC. VEGFB является гомологом VEGFA и реализует свое действие только через взаимодействие с VEGFR1 [16]. Он широко экспрессируется в различных типах клеток, включая ГМК сосудов и ЭК, и обладает слабой

ангиогенной активностью [16]. Проангиогенный эффект VEGFB может быть связан с подавлением апоптоза/стимуляцией выживаемости клеток или с вытеснением VEGFA из комплекса с VEGFR1, что может усилить передачу сигнала VEGFA/VEGFR2 [29]. Наиболее значимая роль VEGFB в атерогенезе и неоваскуляризации бляшки может быть связана с недавно выявленными его антиатерогенными эффектами – сильным антиоксидантным действием и регуляцией метаболизма клеток [29]. Тем не менее, VEGFR1, необходимый для реализации эффекта VEGFB, выявлялся в бляшках в следовых количествах.

Помимо классических (семейство VEGF) был оценен уровень альтернативного ангиогенного фактора – FGF2, который является сильным активатором ангиогенеза [11]. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что FGF2 является сильным митогеном для различных клеток, включая ЭК [10]; стимулирует пролиферацию и структурную организацию ЭК в тубулярные структуры, а также рост, дифференцировку и выживание ассоциированных с кровеносными сосудами клеток [30]; оказывает антифиброзное действие [31]. При этом FGF2 регулирует ангиогенез опосредованно, в том числе за счет активации высвобождения других ангиогенных факторов, и относится к “непрямым” ангиогенным факторам [6, 10, 32].

Нами выявлена выраженная экспрессия FGF2 в исследованных бляшках каротидного синуса, которая по степени и характеру значимо не отличалась от экспрессии VEGFA и коррелировала с ней, а также с экспрессией VEGFR2 и VEGFR3. Полученные данные согласуются с результатами опубликованных работ, в которых указан синергетический эффект FGF2 и VEGFA, обусловливающий стимуляцию миграции ЭК, перицитов и ГМК [32], а также корреляция экспрессии VEGFA/VEGFR2 и FGF2/FGFR1 [6]. В ряде исследований также продемонстрирована сложная и тесная взаимосвязь между сигнальными путями FGF2 и VEGFA в ходе ангиогенеза. В частности, для поддержания экспрессии VEGFR2 необходима стимуляция ЭК FGF2 [10]; FGF2 регулирует сплайсинг VEGFR1 с активацией образования растворимых форм рецептора, которые поддерживают градиент VEGFA для навигации образующихся сосудов [10]; FGF2 стимулирует синтез VEGFA [32].

Исследования членов семейства FGF при атеросклерозе немногочисленны, а полученные результаты зачастую противоречивы, хотя исследователи сходятся во мнении относительно повышенного содержания и критической роли членов FGF в атеросклеротических бляшках [33]. К примеру, имеются данные о ключевой роли FGF2 в неоваскуляризации бляшки [3, 6] и об отсутствии экспрессии FGF2 в бляшках [3].

PDGF-B – наиболее хорошо охарактеризованный фактор роста для привлечения периваскулярных клеток и стабилизации новообразованной сосудистой сети [11, 30]. ЭК в составе развивающегося сосуда секретируют PDGF-B, который связывается с гепарансульфат-протеогликанами внеклеточного матрикса и поверхности клеток, тем самым создавая градиент, необходимый для навигации перицитов в направлении развивающегося сосуда [34], нарушение которого приводило к образованию высокопроницаемых сосудов. Также показано, что VEGFA стимулирует экспрессию рецептора PDGF, тем самым регулируя миграцию и пролиферацию фибробластов и ГМК, а также образование внеклеточного матрикса [35].

Описанное в литературе связывание PDGF-B, FGF2 и VEGFA с внеклеточным матриксом создает депо данных факторов роста в межклеточном веществе [34, 36], что может объяснить иммунореактивность волокнистого компонента бляшки к вышеуказанным факторам, обнаруженное в проведенном нами исследовании, и подчеркивает возможность резкого повышения ангиогенного сигнала при их высвобождении из депо под действием протеаз. Экспрессия PDGF-B описана в многочисленных клетках, включая ЭК, ГМК и макрофаги [37], что также было отмечено и нами. Дисфункция сигнального пути PDGF-B выявляется при широком спектре заболеваний, включая

атеросклероз, при котором отмечено повышение экспрессии фактора [38]. Ряд авторов также указывает на сходный характер экспрессии PDGF-B и VEGFA [18], что также подтверждали результаты нашего исследования.

PDGF-B, как и FGF2, считается “непрямым” ангиогенным фактором [6]. Показано, что он может стимулировать экспрессию VEGFA и FGF2 [35], при этом на кроличьей модели атеросклероза недавно был продемонстрирован синергетический эффект PDGF-B и FGF2 в части привлечения перицитов, стабилизации новообразованной сосудистой сети и уменьшении площади сосудистой сети [11]. Несмотря на то, что FGF2 и PDGF-B считаются важными регуляторами ангиогенеза в бляшке, их точная роль в регуляции и координации этого сложного процесса остается во многом слабо изученной [1, 6]. В последние годы получены данные о том, что в бляшках на поздних стадиях развития атеросклероза была снижена экспрессия рецептора PDGF-B, несмотря на относительно высокий уровень экспрессии самого фактора [6]. Кроме того, описана возможность образования нефункциональных гетеродимеров VEGFR2/PDGFR-бета в перицитах под действием VEGFA [39]. Окисленные липопротеины низкой плотности при краткосрочной инкубации с ГМК индуцировали активацию PDGFR-бета, тогда как длительная инкубация приводила к подавлению фосфорилирования рецептора [6].

Мы оценивали экспрессию рецепторов только сосудистых эндотелиальных факторов роста, что ограничивает возможности интерпретации результатов активации сигнальных путей других факторов. При высоком уровне PDGF-B и FGF2 (с учетом их синергетического эффекта) мы зачастую наблюдали в бляшках многочисленные тонкостенные сосуды с нарушенной целостностью эндотелиальной выстилки без слоя перицитов и периваскулярными кровоизлияниями разной давности. В совокупности это свидетельствует о незрелой структуре новообразованных сосудов с повышением проницаемости их стенки, что может быть связано с нарушением передачи сигнала PDGF-B вследствие снижения экспрессии, стимуляции деградации его рецептора или подавления фосфорилирования рецептора под действием VEGFA/VEGFR2, липопротеинов низкой плотности и других возможных факторов на поздних стадиях развития атеросклероза.

TSP-1 считается сильным ингибитором ангиогенеза, действие которого может быть реализовано различными путями при атеросклерозе: подавление экспрессии VEGFA, снижение уровня липопротеинов низкой плотности, клиренс матриксных металлопротеиназ, индукция апоптоза ЭК, подавление их миграции и пролиферации [40]. Экспрессия TSP-1 выявляется в клетках различных типов, включая ЭК, макрофаги и ГМК [9], что подтверждалось в проведенном исследовании. TSP-1 модулирует клеточный ответ на факторы внешней среды, конкурентно связываясь с клеточными рецепторами, компонентами внеклеточного матрикса, протеолитическими ферментами и растворимыми факторами [36]. Данные по экспрессии и значимости TSP-1 при атеросклерозе и неоваскуляризации бляшки немногочисленны. Ряд авторов указывает на повышение экспрессии маркера в атеросклеротической бляшке [41], что может быть связано с его активацией в ответ на действие факторов роста (PDGF-B, FGF2) и гипоксии [9]. Тем не менее, содержание в бляшках TSP-1 по нашим данным было низким, а интенсивность экспрессии слабой. Значимость TSP-1 в ангиогенезе в бляшке неоднозначна, поскольку помимо антиангиогенного действия фактор также позиционируется как проатерогенный, стимулирующий миграцию и пролиферацию ГМК с формированием секреторного фенотипа, в особенности под влиянием глюкозы [41]. Неоднозначная роль TSP-1 в атерогенезе и неоваскуляризации бляшки, а также его тесная связь с ключевыми регуляторными сигнальными путями ангиогенеза при атеросклерозе свидетельствует о необходимости дополнительного изучения механизмов его действия в комплексе с другими ангиогенными факторами.

Нами также была оценена взаимосвязь различных ангиогенных факторов со структурными компонентами бляшки, однако выявить какую-либо зависимость (за исключением неоваскуляризации), в том числе с выраженностью воспалительной реакции (содержание $CD68^+$ макрофагов) нам не удалось. Возможной причиной такого результата может быть небольшой объем выборки, в особенности малое количество стабильных бляшек. Кроме того, мы не выделяли различные подтипы макрофагов и не оценивали содержание в бляшке провоспалительных цитокинов, которые играют значимую роль в ангиогенезе.

Таким образом, в проведенном исследовании продемонстрирован резко выраженный проангиогенный профиль экспрессии различных регуляторных факторов ангиогенеза в атеросклеротических бляшках каротидного синуса на поздних стадиях развития атеросклероза со значимым преобладанием VEGFD иммунореактивности на фоне резкого дефицита антиангиогенного фактора TSP-1. Высокое содержание в бляшках VEGFA, VEGFR2/3, FGF2 и PDGF-B, а также относительно низкий уровень VEGFC/VEGFB и следовые количества VEGFR1 на фоне высокопроницаемой новообразованной сосудистой сети свидетельствует о резком смещении равновесия в сторону стимуляторов ангиогенеза и неполноценности механизма стабилизации новообразованной сосудистой сети.

С учетом сложной системы взаимодействия между различными ангиогенными факторами и их рецепторами, а также наличием многочисленных локальных модуляторов процесса при атеросклерозе, необходимо дальнейшее изучение регуляции неоваскуляризации атеросклеротических бляшек с обязательным комплексным анализом разнонаправленных звеньев регуляции ангиогенеза, в том числе на клеточных и животных моделях атеросклероза. В этой связи стоит обратить особое внимание на механизм действия VEGFD, гиперэкспрессия которого была впервые нами продемонстрирована в бляшках каротидного синуса наряду с выраженной экспрессией его рецепторов (VEGFR2/VEGFR3). Широкий спектр эффектов VEGFD, отмеченный при различных патологиях, указывает на его возможно значимую роль как в ангиогенезе, так и атерогенезе, что делает его многообещающей мишенью терапевтического воздействия при атеросклерозе.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работы выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ НЦН на проведение фундаментальных научных исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Н.Е. – идея работы и планирование исследования, сбор и обработка данных, написание манускрипта; К.Н.К. – сбор и обработка данных, написание манускрипта; Т.С.Г. – идея работы и планирование исследования, написание и редактирование манускрипта; М.М.Т. – идея работы и планирование исследования, написание и редактирование манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R* (2017) Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. Redox Biol 12: 18–34. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007
2. *Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A, Bauersachs J* (2018) Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis

and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. Front Immunol 9: 706. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00706

3. *Van der Veken B, De Meyer GR, Martinet W* (2016) Intraplaque neovascularization as a novel therapeutic target in advanced atherosclerosis. Expert Opin Ther Targets 20: 1247–1257. https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1186650
4. *Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens APJJ, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, Duimel H, Frederik PM, van Hinsbergh VWM, Virmani R, Daemen MJAP* (2009) Thin-Walled Microvessels in Human Coronary Atherosclerotic Plaques Show Incomplete Endothelial Junctions. J Am Coll Cardiol 53: 1517–1527. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.056
5. *Parma L, Baganha F, Quax PHA, de Vries MR* (2017) Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis. Eur J Pharmacol 816: 107–115. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.04.028
6. *Mao Y, Liu X, Song Y, Zhai C, Zhang L* (2018) VEGF-A/VEGFR-2 and FGF-2/FGFR-1 but not PDGF-BB/PDGFR-β play important roles in promoting immature and inflammatory intraplaque angiogenesis. PLoS One 13: e0201395. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201395
7. *Jeziorska M, Woolley DE* (1999) Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: Its potential contribution to plaque development. Hum Pathol 188: 189–196. https://doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90245-9
8. *Kashiwazaki D, Koh M, Uchino H, Akioka N, Kuwayama N, Noguchi K, Kuroda S* (2018) Hypoxia accelerates intraplaque neovascularization derived from endothelial progenitor cells in carotid stenosis. J Neurosurg 131: 884–891. https://doi.org/10.3171/2018.4.JNS172876
9. *Adams JC, Lawler J* (2004) The thrombospondins. Int J Biochem Cell Biol 36: 961–968. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.004
10. *Jia T, Jacquet T, Dalonneau F, Coudert P, Vaganay E, Exbrayat-Héritier C, Vollaire J, Josserand V, Ruggiero F, Coll J-L, Eymin B* (2021) FGF-2 promotes angiogenesis through a SRSF1/SRSF3/SRPK1-dependent axis that controls VEGFR1 splicing in endothelial cells. BMC Biol 19: 173. https://doi.org/10.1186/s12915-021-01103-3
11. *Mao Y, Liu XQ, Song Y, Zhai CG, Xu XL, Zhang L, Zhang Y* (2020) Fibroblast growth factor-2/platelet-derived growth factor enhances atherosclerotic plaque stability. J Cell Mol Med 24: 1128–1140. https://doi.org/10.1111/jcmm.14850
12. *Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L* (2016) Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 17: 611–625. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87
13. *Perrotta P, Emini Veseli B, Van der Veken B, Roth L, Martinet W, De Meyer GRY* (2019) Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis. Vascul Pharmacol 112: 72–78. https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.06.014
14. *Stary HC* (2000) Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 1177–1178. https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1177
15. *Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R* (2017) Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. Redox Biol 12: 18–34. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.007
16. *Zhou Y, Zhu X, Cui H, Shi J, Yuan G, Shi S, Hu Y* (2021) The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. Front Cardiovasc Med 8: 738325. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.738325
17. *Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mihu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mihu CM* (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. Rom J Morphol Embryol 59: 455–467. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30173249
18. *Pelisek J, Well G, Reeps C, Rudelius M, Kuehnl A, Culmes M, Poppert H, Zimmermann A, Berger H, Eckstein H-H* (2012) Neovascularization and angiogenic factors in advanced human carotid artery stenosis. Circ J 76: 1274–1282. https://doi.org/10.1253/circj.cj-11-0768
19. *Chanakira A, Dutta R, Charboneau R, Barke R, Santilli SM, Roy S* (2012) Hypoxia differentially regulates arterial and venous smooth muscle cell proliferation via PDGFR-β and VEGFR-2 expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol 302: H1173–H1184. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00411.2011
20. *Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Kokina I, Uotila S, Ahtialansaari T, Laitinen T, Hakumaki J, Laakso M, Herzig K-H, Ylä-Herttuala S* (2006) VEGF-A, VEGF-D, VEGF receptor-1, VEGF receptor-2, NF-kappaB, and RAGE in atherosclerotic lesions of diabetic Watanabe heritable hyperlipid-

emic rabbits. FASEB J 20: 2159–2161.
https://doi.org/10.1096/fj.05-5029fje

21. *Claesson-Welsh L* (2016) VEGF receptor signal transduction – A brief update. Vascul Pharmacol 2001: re21.
https://doi.org/10.1126/stke.2001.112.re21
22. *Stacker SA, Achen MG* (2018) Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease. Biomolecules 8: 1.
https://doi.org/10.3390/biom8010001
23. *Rutanen J, Leppänen P, Tuomisto TT, Rissanen TT, Hiltunen MO, Vajanto I, Niemi M, Häkkinen T, Karkola K, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K, Ylä-Herttuala S* (2003) Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. Cardiovasc Res 59: 971–979.
https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00518-2
24. *Zhao T, Zhao W, Meng W, Liu C, Chen Y, Bhattacharya SK, Sun Y* (2016) Vascular endothelial growth factor-D mediates fibrogenic response in myofibroblasts. Mol Cell Biochem 413: 127–135.
https://doi.org/10.1007/s11010-015-2646-1
25. *Engelmann D, Mayoli-Nüssle D, Mayrhofer C, Fürst K, Alla V, Stoll A, Spitschak A, Abshagen K, Vollmar B, Ran S, Pützer BM* (2013) E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B. J Mol Cell Biol 5: 391–403.
https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt035
26. *Liu J, Sun F, Wang X, Bi Q* (2020) miR-27b promotes angiogenesis and skin repair in scalded rats through regulating VEGF-C expression. Lasers Med Sci 35: 1577–1588.
https://doi.org/10.1007/s10103-020-02991-7
27. *Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K* (2015) VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 761–766.
https://doi.org/10.1073/pnas.1423278112
28. *Nilsson I, Bahram F, Li X, Gualandi L, Koch S, Jarvius M, Söderberg O, Anisimov A, Kholová I, Pytowski B, Baldwin M, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Kreuger J, Claesson-Welsh L* (2010) VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. EMBO J 29: 1377–1388.
https://doi.org/10.1038/emboj.2010.30
29. *Chen R, Lee C, Lin X, Zhao C, Li X* (2019) Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. Pharmacol Res 143: 33–39.
https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.002
30. *Fallah A, Sadeghinia A, Kahroba H, Samadi A, Heidari HR, Bradaran B, Zeinali S, Molavi O* (2019) Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. Biomed Pharmacother 110: 775–785.
https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022
31. *Dolivo DM, Larson SA, Dominko T* (2017) Fibroblast Growth Factor 2 as an Antifibrotic: Antagonism of Myofibroblast Differentiation and Suppression of Pro-Fibrotic Gene Expression. Cytokine Growth Factor Rev 38: 49–58.
https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.09.003
32. *Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M* (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 16: 159–178.
https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004
33. *Chen P, Qin L, Li G, Tellides G, Simons M* (2016) Smooth muscle FGF/TGFβ cross talk regulates atherosclerosis progression. EMBO Mol Med 8: 712–728.
https://doi.org/10.15252/emmm.201506181
34. *Tillie RJHA, Theelen TL, van Kuijk K, Temmerman L, de Bruijn J, Gijbels M, Betsholtz C, Biessen EAL, Sluimer JC* (2021) A Switch from Cell-Associated to Soluble PDGF-B Protects against Atherosclerosis, despite Driving Extramedullary Hematopoiesis. Cells 10: 1746.
https://doi.org/10.3390/cells10071746
35. *Laddha AP, Kulkarni YA* (2019) VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders. Respir Med 156: 33–46.
https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.08.003
36. *Margosio B, Marchetti D, Vergani V, Giavazzi R, Rusnati M, Presta M, Taraboletti G* (2003) Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. Blood 102: 4399–4406.
https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0893
37. *Heldin CH, Westermark B* (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev 79: 1283–1316.
https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1283
38. *Papadopoulos N, Lennartsson J* (2018) The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. Mol Aspects Med 62: 75–88.
https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.007

39. *Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Scheppke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresh DA* (2008) A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. Nature 456: 809–813. https://doi.org/10.1038/nature07424
40. *Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J* (2007) Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). J Cell Physiol 210: 807–818. https://doi.org/10.1002/jcp.20904
41. *Ganguly R, Sahu S, Ohanyan V, Haney R, Chavez RJ, Shah S, Yalamanchili S, Raman P* (2017) Oral chromium picolinate impedes hyperglycemia-induced atherosclerosis and inhibits proatherogenic protein TSP-1 expression in STZ-induced type 1 diabetic ApoE-/- mice. Sci Rep 7: 45279. https://doi.org/10.1038/srep45279

Defining Characteristics of Angiogenesis Regulation in Advanced Human Carotid Plaques

A. N. Evdokimenko[a], *, K. N. Kulichenkova[a], T. S. Gulevskaya[a], and M. M. Tanashyan[a]

[a] *Research Center of Neurology, Moscow, Russia*
**e-mail: evdokimenko@neurology.ru*

Increased neovascularization of atherosclerotic plaque contributes to plaque vulnerability, atherosclerosis progression and enhance complications risk including myocardial infarction and ischaemic stroke. However, studies of angiogenesis dynamics in atherosclerosis are scarce, and the data obtained require clarification. The aim of our study was a comprehensive assessment of the expression of multidirectional regulatory factors of angiogenesis in carotid atherosclerotic plaque. The study included 33 patients with carotid atherosclerotic stenosis exceeding 60%, who were subjected to carotid endarterectomy followed by pathomorphological examination of removed atherosclerotic plaques throughout their length. The structure of plaques, the number of microvessels per 1 cm^2 of the plaque, as well as the expression of vascular endothelial growth factors (VEGFA, VEGFB, VEGFC, and VEGFD) and their receptors (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), FGF2, PDGF-B, and TSP-1 were assessed. Correlation analysis of the obtained data was performed. Histological examination demonstrated that there were 13 atheromatous plaques (type Va), 12 complicated plaques with either fibrous cap ulceration or massive intraplaque haemorrhage (type VI), 6 calcified plaques (type Vb), and 2 fibrous plaques (type Vc). Neovessels were found in all plaques (267.5 сосудов/1 $см^2$ [140.9; 534.8]). Most of the neovessels possessed a highly permeable phenotype with such features as loss of integrity of endothelium; lack of pericyte layer and perivascular hemorrhage. VEGFD was overexpressed and prevailed over the other assessed factors ($p < 0.001$). Pronounced expression of VEGFA, VEGFR2, VEGFR3, FGF2 and PDGF-B was also found in plaques. Immunoreactivity to VEGFB, VEGFC and TSP-1 was the weakest, VEGFR1 was detected in trace amounts. The number of microvessels in the plaque significantly correlated with the expression of VEGFA, VEGFD, FGF2, PDGF-B and VEGFR2 ($p < 0.01$). Other structural components of plaques were not related to the level of angiogenic factors in plaques. Conclusion. We demonstrated a pronounced proangiogenic expression profile of various angiogenic factors in association with failure of the neovessel stabilization mechanism in advanced human carotid atherosclerotic plaques.

Keywords: carotid plaque, regulation of angiogenesis, VEGF, VEGFR, FGF2, PDGF-B, TSP-1

EDN: NOANZF
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 667–676

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПРОГНОЗИРУЕМЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ПОДТВЕРЖДЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛАКТАТА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМОМ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ

© 2022 г. Ф. Н. Гильмиярова[1], Н. А. Колотьева[1, *], О. А. Гусякова[1]

[1]*Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, Самара, Россия*
**E-mail: kaf_biohim@samsmu.ru*

Поступила в редакцию 02.03.2022 г.
После доработки 03.03.2022 г.
Принята к публикации 25.03.2022 г.

С развитием науки и техники, с учетом накопленных знаний в области геномики, протеомики, метаболомики возникает новый интерес к изучению малых молекул и наступает период, посвященный изучению функциональной активности, роли метаболитов, а также выяснению путей биологических процессов, каскадных реакций в норме и патологии. Мы обратили наше внимание на лактат, который больше не рассматривается как “тупик” анаэробного метаболизма, образующийся в тканях с ускоренным гликолизом. В последние годы доминирует точка зрения о том, что лактат – метаболит, играющий важную роль в регуляции функции многих клеток (адипоциты, клетки эндотелия, нейроны), участвующий в процессах ремоделирования тканей, ангиогенеза, пролиферации и дифференцировки. Изучение влияния лактата на изолированные каталитические белки способно выявить важные и еще не изученные роли малых молекул в межмолекулярных процессах. В качестве белка – потенциальной “мишени” его действия наш выбор остановился на ферменте глицерол-3-фосфатдегидрогеназе, осуществляющем переключение углеводно-липидного и липидно-углеводного обменов. Цель исследования: оценить аффинитет лактата к глицерол-3-фосфатдегидрогеназе с целью выяснения функциональной способности интермедиата. Методами компьютерного моделирования был раскрыт спектр биологической активности для лактата, а также охарактеризованы белки-партнеры по взаимодействию. Методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и микрокапиллярного термофореза нами был установлен факт взаимодействия глицерол-3-фосфатдегидрогеназы с лактатом и показаны изменения конформационной стабильности фермента.

Ключевые слова: лактат, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, компьютерное моделирование, дифференциальная сканирующая флуориметрия, микрокапиллярный термофорез

DOI: 10.31857/S0869813922050053

Малые молекулы – промежуточные продукты метаболизма, точки пересечения путей обмена углеводов, белков, липидов – выполняют координационную роль в функционировании и модуляции медиаторного, гормонального, рецепторного ответов, иммунологических, воспалительных, защитных реакций. Взаимодействия “белок–малая молекула” могут регулировать и контролировать различные клеточные процессы, играя главную роль в поддержании клеточного гомеостаза [1]. Наши знания о метаболит-белковых взаимодействиях пока недостаточны, однако на-

капливается все больше данных о влиянии метаболитов на многие клеточные события, причем реализовывать свои эффекты эти метаболиты могут за счет связывания со специфическими рецепторами или в результате трансфера между клетками. Изменение механизмов продукции и утилизации метаболитов клеток влияет на метаболизм в целом, на содержание промежуточных соединений, на окислительно-восстановительные процессы. Было изучено несколько платформ с высокой пропускной способностью, позволяющие выявить многие "неожиданные" взаимодействия белка с метаболитами, которые могут оказать влияние на наше понимание передачи сигналов клетками. В последние годы были построены обширные сети, которые описывают связь ДНК, РНК с белками [2, 3]. Использование компьютерного моделирования и методов *in silico* может в десятки раз сократить объем необходимого экспериментального тестирования по сравнению со слепым поиском [4].

Мы обратили наше внимание на лактат, который больше не рассматривается как "тупик" анаэробного метаболизма, образующийся в тканях с ускоренным гликолизом, а как на молекулярный инструмент, который оказывает влияние на функциональную активность клеток различных тканей (эндотелий, клетки жировой ткани, нейроны), действуя через лактатные рецепторы HCAR1/GPR81 или будучи транспортируемым монокарбоксилатными транспортерами MCT через мембрану клеток, что имеет своим результатом изменения пролиферации, дифференцировки, метаболизма [5]. В частности, интересны эффекты лактата как проангиогенного фактора, действующего за счет увеличения экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). В некоторых тканях лактат поглощается и окисляется макрофагами, а лактат-опосредованная поляризация макрофагов способствует реваскуляризации и регенерации мышц. Была установлена способность лактата модулировать морфогенез и перфузию сосудов опухоли, тем самым выявлена сигнальная роль в эндотелиальных клетках и определена связь между метаболизмом в опухолевых тканях и ангиогенезом [5]. Обсуждается применение лактата в клинических исследованиях при лечении ишемии и нейродегенеративных заболеваний [6], что имеет в своей основе стимулирующее действие лактата на процессы пластичности мозга. В частности, интересна роль лактата в качестве нейропротекторного фактора при болезни Альцгеймера, что определяется его способностью обеспечивать метаболическое сопряжение между астроцитами и нейронами в активных регионах мозга и участвовать в регуляции церебрального ангиогенеза [7]. Кроме того, лактилирование гистонов является эпигенетической модификацией, которая стимулирует транскрипцию генов и может определять тесную функциональную взаимосвязь метаболического статуса и экспрессионного профиля клеток [8].

Помимо транспортеров и рецепторов лактата, определяющих многие из эффектов этого метаболита, вполне вероятно присутствие в клетках иных белков, выступающих в качестве "мишеней" действия лактата при повышении концентрации этого метаболита в цитозоле или в органеллах. Возможным кандидатом является фермент глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (EC 1.1.1.8, ГФД), осуществляющий переключение углеводно-липидного и липидно-углеводного обменов. Было показано, что митохондриальная глицерол-3-фосфатдегидрогеназа ускоряет окисление глюкозы, стимулируя выработку ацетил-кофермента А, ацетилирование гистонов и индукцию генов, кодирующих медиаторы воспаления в макрофагах, способствует онкогенезу в клетках глиомы [9, 10]. С учетом высокого содержания митохондрий в клетках церебрального эндотелия, вклад модуляции активности этого фермента в реализацию эффектов лактата в клетках сосудов головного мозга может быть весьма существенным.

Коль скоро особый интерес при изучении взаимодействий “метаболит–белок” представляют фермент-субстратные взаимоотношения и случаи индуцированного метаболитами ремоделирования белковых комплексов [11, 12], анализ влияния лактата на изолированные каталитические белки способно выявить важные и еще не изученные роли малых молекул в регуляции функциональной активности клеток. Поэтому целью работы стала оценка аффинитета лактата к глицерол-3-фосфатдегидрогеназе с определением возможных физиологически значимых эффектов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование прогнозируемой биологической активности *in silico* лактата проводили с использованием программы Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул выполняли в системе Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH) версии 5.0. Результат прогноза биологической активности в программе PASS представляется в виде вероятностей Pa “быть активным” (“to be active”) и Pi “быть неактивным” (“to be inactive”) имеющие значения от 0 до 1, мы приняли Pa более 0.5 за оптимальное значение вероятности наличия активности. В STITCH результат отображается в виде построения сети взаимодействия исследуемого соединения с партнерами и рассчитывается параметр p – вероятность взаимодействия малой молекулы и белка. Мы использовали в своей работе настройку по аффинитету связи и средний порог достоверности $p > 0.4$.

Эксперименты проводили в лаборатории молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ НИЦ “Курчатовского института”. В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich, США: глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, лактат, буфер Трис-HCl 50 мМ, pH 7.5. Контроль значения pH проводили до и после внесения раствора лактата в пробы с помощью pH-метра Mettler Toledo (США). Изменение pH среды имело колебания в пределах 0.01–0.02. Применение микрокапиллярного термофореза позволяет определить наличие комплексов белок–малая молекула и силу взаимодействия между ними благодаря изменению их подвижности в температурном градиенте. Для оценки использовали стехиометрический параметр – константу диссоциации (Kd), численно равный концентрации лиганда, при которой содержание свободной и связанной молекулы-партнера равны. Эксперименты проводились на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Германия). Мечение каталитических белков глицерол-3-фосфатдегидрогеназы проводили с использованием коммерческого набора Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies, Германия). С целью определения константы диссоциации методом микротермофореза делали серию постановок с лактатом в конечной концентрации от 0.0012 до 40 мкМ (16 разведений), а конечная концентрация меченого белка глицерол-3-фосфатдегидрогеназы была постоянной, подбиралась эмпирически и составила 0.8 мкМ. Определение изменения конформационной структуры глицерол-3-фосфатдегидрогеназы под влиянием лактата проводили с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии, основанной на оценке собственной флуоресценции триптофана и тирозина белков при длине волны 330 и 350 нм на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия). Конформационную стабильность белка описывали его средней температурой денатурации Tm (°C), которая является точкой, где разворачивается половина белка. Готовили шесть разведений, в которых конечная концентрация глицерол-3-фосфатдегидрогеназы была неизмененной – 1 мкМ, а конечная концентрация раствора лактата изменялась в диапазоне от 0.5 до 16 мкМ, сканировали капилляры при интенсивности лазера 30%, диапазон нагрева от 20 до 95°C, шаг 1°C/мин. Математическое моделирование кривых соотношения флуоресценций в зависимости от

Таблица 1. Вероятные молекулярные механизмы действия лактата

Молекулярный механизм действия	Шифр фермента	Pa лактата	Pi лактата
Ингибирование D-лактатдегидрогеназы	EC 1.1.2.4	0.783	0.002
Ингибирование глицерол-3-фосфатдегидрогеназы	EC 1.1.1.8	0.698	0.003
Ингибирование глицерол-3-фосфатоксидазы	EC 1.1.3.21	0.616	0.004
Ингибирование малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0.705	0.004
Ингибирование лактат-малат трансгидрогеназы	EC 1.1.99.7	0.808	0.001
Ингибирование малатоксидазы	EC 1.1.3.3	0.522	0.016
Ингибирование оксалоацетат таутомеразы	EC 5.3.2.2	0.881	0.001
Ингибирование оксалоацетат декарбоксилазы	EC 4.1.1.3.	0.742	0.003
Ингибирование пируватдекарбоксилазы	EC 4.1.1.1	0.938	0.001
Ингибирование пируватдегидрогеназы	EC 1.2.4.1.	0.856	0.002
Ингибирование акцептора малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0.594	0.018
Ингибирование фенилпируватдекарбоксилазы	EC 4.1.1.43	0.614	0.004
Ингибирование глутамин-фенилпируваттрансаминазы	EC 2.6.1.64	0.807	0.005
Ингибирование аспартат-фенилпируваттрансаминазы	EC 2.6.1.70	0.816	0.004

Pa – вероятность наличия; Pi – вероятность отсутствия.

температуры и концентрации лактата, статистический анализ полученных параметров регрессионных уравнений выполняли в среде пакета SPSS 25.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В более ранних работах в компьютерном обеспечении PASS нами была смоделирована и оценена биологическая активность, молекулярные механизмы и оказываемые фармакологические эффекты лактата [13, 14]. Изучен прогнозируемый спектр биологической активности лактата в отношении ряда каталитических белков (табл. 1).

Далее мы обратились к поисковому инструменту – программе STITCH, в которой можно произвести моделирование потенциальных белковых партнеров для лактата. При использовании среднего порога достоверности $p > 0.4$ количество взаимодействий для лактата составило 384.

Интересными являются данные о взаимосвязи лактата со многими рецепторами, в числе которых рецепторы гидроксикарбоновой кислоты HCAR1 (p 0.986), HCAR2 (p 0.908), HCAR3 (p 0.900), альфа-2 адренергическими рецепторами ADRA2A (p 0.922), ADRA2B (p 0.914), ADRA2C (p 0.914), опиоидными (p 0.917), дофаминовыми (p 0.907), мускариновыми холинэргическими (p 0.900), брадикининовыми (p 0.900), глутаматными (p 0.900), рецепторами лизофосфатидной кислоты (p 0.900), G-белок-связанным рецептором (p 0.900), что говорит об участии лактата в передаче нервного импульса и выполнении неметаболических функций в центральной нервной системе, связанных с семейством гетеромерных G-белков, роли трансмиттера и медиатора разнообразных клеточных процессов [15].

Было установлено взаимодействие лактата с нейропротективным белком MT-RNR2L2 (p 0.900). Предполагается, что, связываясь с белком, метаболит уменьшает образование бета-амилоидного пептида, тем самым снижая активность нейродегенеративных процессов [7]. Стоит отметить спрогнозированную функцию лактата вы-

ступать лигандом для таких нейромедиаторов как глутамат (p 0.985), дофамин (p 0.954), ацетилхолин (p 0.948), гистамин (p 0.946), простагландин E2 (p 0.944).

Нами была отмечена высокая вероятность взаимодействия лактата с такими гормонами, как адреналин (p 0.985), соматостатин (p 0.936), мелатонин (p 0.929), полипептид поджелудочной железы (p 0.927), промеланин-концентрирующий гормон (p 0.915), который может действовать как нейротрансмиттер в широком спектре нейрональных функций.

Обращает на себя внимание высокая способность лактата воздействовать на иммунологические и воспалительные процессы: связываться с интерлейкином-8 (p 0.924), интерлейкином-6 (p 0.865) – мощным индуктором острой фазы, участвующим в окончательной дифференцировке B-клеток, лимфоцитов и моноцитов; интерлейкином-10 (p 0.851), ингибирующим синтез цитокинов (гамма-интерферон, IL-2, IL-3, TNF и GM-CSF); интерлейкином-1 альфа (p 0.748), участвующим в воспалительном ответе и стимулирующим высвобождение простагландина и коллагеназы из синовиальных клеток.

Отмечена вероятность лактата являться партнером взаимодействия для различных групп хемокинов. Так, хемокин CCL5 (p 0.911) является хемоатрактантом для моноцитов крови, T-хелперов памяти и эозинофилов, вызывает выброс гистамина из базофилов и активирует эозинофилы. Хемокин CXCL1 (p 0.908) обладает хемотаксической активностью для нейтрофилов и может играть роль в воспалении, оказывая свое влияние на эндотелиальные клетки аутокринным способом.

Полученные в программе STITCH данные согласуются с предсказанными системой PASS различными молекулярными механизмами действия и фармакологическими эффектами лактата. Проведенный анализ большого массива данных компьютерного моделирования с использованием таких платформ как PASS и STITCH позволило сформировать общее представление о разнообразных и разнонаправленных эффектах, межмолекулярных и регуляторных механизмах действия изучаемой малой молекулы.

Установление факта взаимодействия лактата с белком стало более доступно с применением методов флуоресценции (эндогенной, и с использованием флуорофоров), сканирующей флуориметрии, микротермофореза [16]. С использованием метода капиллярного термофореза была вычислена константа диссоциации для глицерол-3-фосфатдегидрогеназы с лактатом, которая составила 1.0 мкМ, что свидетельствуют о достаточно сильном сродстве интермедиата к молекуле белка.

Далее проведен эксперимент по оценке процесса формирования пространственной структуры ГФД под влиянием лактата с использованием метода дифференциальной сканирующей флуориметрии. Предварительный визуальный анализ кривых плавления ГФД без лиганда и в присутствии лактата (рис. 1) позволяет выделить несколько различающихся по структуре участков. Так, в физиологическом диапазоне температур (до 45–50°C) отмечается линейный рост отношения флуоресценций, при температуре порядка 50–55°C – плавление, и при более высоких температурах – последующий рост отношения флуоресценций.

Нами был выделен температурный диапазон, соответствующий физиологической норме от 20 до 40°C (рис. 2), далее сопоставили средние значения соотношения флуоресценций в присутствии разных концентраций лактата и скорости их роста. Для этого мы использовали парный линейный регрессионный анализ, который определяет углы наклона линейного роста соотношения флуоресценций, и ковариационный анализ (ANCOVA), который позволяет сравнить эти углы наклона у разных лигандов и сравнить средние значения соотношения флуоресценций.

Сводка параметров построенных уравнений парной линейной регрессии, параметры качества моделей: коэффициенты детерминации и стандартные ошибки регрессий приведены в табл. 2. Все построенные модели статистически значимы и

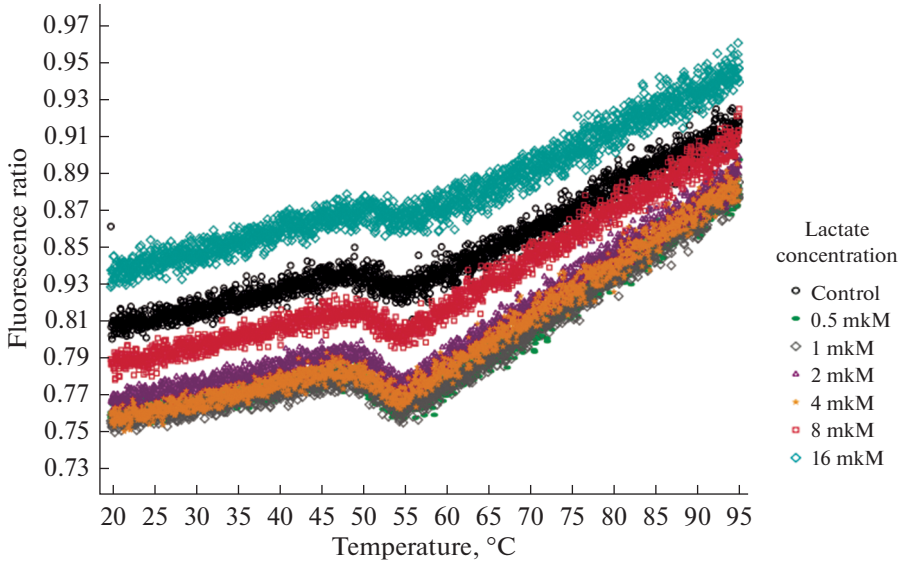

Рис. 1. Соотношение флуоресценций при разных концентрациях лактата в процессе нагревания ГФД в диапазоне температур 20–95°C.

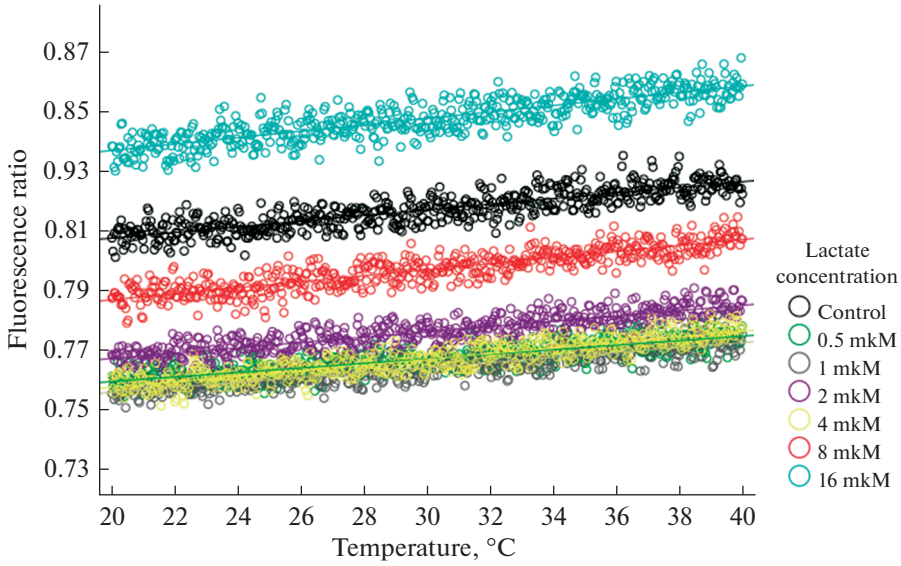

Рис. 2. Соотношение флуоресценций при разных концентрациях лактата в процессе нагревания ГФД в диапазоне температур 20–40°C.

имеют приемлемое качество: коэффициенты детерминации в диапазоне от 0.70 до 0.77. Стандартные ошибки регрессий не превышают 4.06×10^{-3}.

Несмотря на то, что при визуальном анализе скаттерограмм линии регрессии кажутся параллельными, при статистическом анализе выявлены отличия в углах наклона

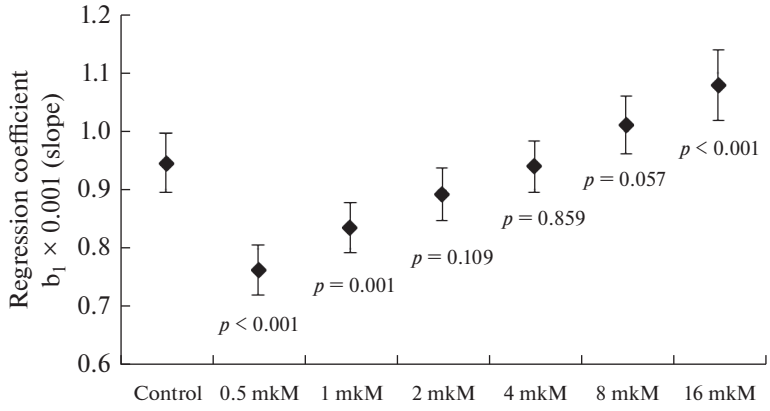

Рис. 3. Углы наклона регрессионных уравнений роста соотношений флуоресценций при нагревании ГФД в диапазоне температуры от 20 до 40°C при добавлении лактата в разных концентрациях. Приведены регрессионные коэффициенты b_1 и их 95% ДИ.

по сравнению с контролем (рис. 3). Так, при концентрациях лактата 0.5 и 1 мкМ скорости нарастания соотношения флуоресценций (параметр регрессии b_1) меньше, чем в контроле ($0.76 \pm 0.021 \times 10^{-3}$ и $0.84 \pm 0.022 \times 10^{-3}$ по сравнению с $0.95 \pm 0.025 \times 10^{-3}$ ($p <= 0.001$), а при концентрации лактата 16 мкМ – наоборот, выше ($b_1 = 1.08 \pm 0.030 \times 10^{-3}$ ($p < 0.001$).

Проведенный эксперимент демонстрирует, что изменялась общая амплитуда сигнала флуоресценции в процессе нагревания фермента. Влияние лактата на соотношение флуоресценций различается в области низких (0.5 и 1 мкМ) и высоких (16 мкМ) концентраций. В физиологическом диапазоне температур при нагревании от 20 до 40°C происходит линейное повышение соотношения флуоресценций в среднем на $0.95 \pm 0.024 \times 10^{-3}$ на каждый градус нагрева ($p < 0.001$). Концентрации лактата 0.5 и 1 мкМ вызывают уменьшение соотношения флуоресценций и

Таблица 2. Сводная характеристика линейных моделей зависимости соотношения флуоресценций ГФД от температуры в диапазоне от 20 до 40°C при добавлении лактата в разных концентрациях

Концентрация лактата	Константа, $\times 10^{-3}$		Коэффициент регрессии, $\times 10^{-3}$		Оценка качества моделей	
	b_0	SEb_0	b_1	SEb_1	R^2	$SE_{regr} \times 0.001$
Контроль	789.1	0.77	0.95	0.025	0.72	3.43
0.5 мкМ	744.7	0.65	0.76	0.021	0.70	2.88
1 мкМ	739.7	0.66	0.84	0.022	0.73	2.93
2 мкМ	749.9	0.69	0.89	0.022	0.74	3.04
4 мкМ	739.3	0.67	0.94	0.022	0.77	2.95
8 мкМ	767.2	0.75	1.01	0.025	0.76	3.32
16 мкМ	815.8	0.92	1.08	0.030	0.70	4.06

b_0 – константа, SEb_0 – стандартная ошибка константы, b_1 – коэффициент регрессии, SEb_1 – стандартная ошибка коэффициента регрессии, R^2 – коэффициент детерминации, SE_{regr} – стандартная ошибка регрессии.

скорости его роста по сравнению с контролем, проявляя протекторное действие и формируя наиболее выгодное каталитически активное – свернутое состояние белка. Лактат (16 мкМ) вызывает увеличение соотношения флуоресценций и скорости его роста, что свидетельствует о развернутой конформации молекулы фермента и снижении термостабильности ГФД.

Методами компьютерного моделирования был раскрыт спектр биологической активности для лактата, а также охарактеризованы белки-партнеры по взаимодействию. Показано, что естественные интермедиаты являются промежуточными соединениями метаболизма, точками пересечения многих метаболических путей обмена углеводов, белков, липидов, выполняют вместе с тем координационную роль в функционировании и модуляции медиаторного, гормонального, рецепторного ответов, иммунологических, воспалительных, антибактериальных, противовирусных реакций. Методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и микрокапиллярного термофореза нами был установлен факт взаимодействия ГФД с лактатом и показано наличие изменения конформационной стабильности фермента.

Мы считаем, что документирование и интерпретация взаимодействий между метаболитами и белками в биологическом контексте будут важны для оценки новых механизмов влияния лактата и иных метаболитов, образующихся в нейроваскулярной единице головного мозга, в норме и при патологии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет средств госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментальной работы (Ф.Н.Г.), проведение экспериментов, обработка данных (Н.А.К.), написание и редактирование манускрипта (Н.А.К., Ф.Н.Г., О.А.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Li X, Wang X, Snyder M* (2013) Systematic investigation of protein-small molecule interactions. IUBMB Life 65(1): 2–8.
https://doi.org/10.1002/iub.1111Epub 2012 Dec 7
2. *Gylmiyarova FN, Radomskaya VM, Gusyakova OA, Ryskina EA, Kolotyeva NA, Shahnovich EA, Nefedova NS, Baisheva GM, Pervova YY, Pleten AP* (2015) Modeling role of pyruvate in the processes of protein-protein interaction. Biomed Chem 61(1): 132–140.
https://doi.org/10.18097/pbmc20156101132
3. *Xu Q, Dunbrack RL Jr* (2020) ProtCID: a data resource for structural information on protein interactions. Nat Commun 5;11(1): 711.
https://doi.org/10.1038/s41467-020-14301-4
4. *Filimonov DA, Rudik AV, Dmitriev AV, Poroikov VV* (2020) Computer-Aided Estimation of Biological Activity Profiles of Drug-Like Compounds Taking into Account Their Metabolism in Human Body. Int J Mol Sci 11; 21(20): 7492.
https://doi.org/10.3390/ijms21207492
5. *Zhang L, Gui X, Zhang X, Dai Y, Wang X, Tong X, Li S* (2021) Endothelial Cell: Lactate Metabolic Player in Organ Regeneration. Front Cell Dev Biol 9: 701672.
https://doi.org/10.3389/fcell.2021.701672
6. *Zhang J, Muri J, Fitzgerald G, Gorski T, Gianni-Barrera R, Masschelein E, D'Hulst G, Gilardoni P, Turiel G, Fan Z, Wang T, Planque M, Carmeliet P, Pellerin L, Wolfrum C, Fendt SM, Banfi A, Stockmann C, Soro-Arnáiz I, Kopf M, De Bock K* (2020) Endothelial Lactate Controls Muscle Regen-

eration from Ischemia by Inducing M2-like Macrophage Polarization. Cell Metab 2 31(6): 1136–1153.
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.05.004

7. *Zhang M, Cheng X, Dang R, Zhang W, Zhang J, Yao Z* (2018) Lactate Deficit in an Alzheimer Disease Mouse Model: The Relationship With Neuronal Damage. J Neuropathol Exp Neurol 1 77(12): 1163–1176.
https://doi.org/10.1093/jnen/nly102
8. *Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, Liu W, Kim S, Lee S, Perez-Neut M, Ding J, Czyz D, Hu R, Ye Z, He M, Zheng YG, Shuman HA, Dai L, Ren B, Roeder RG, Becker L, Zhao Y* (2019) Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. Nature 574(7779): 575–580.
https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1
9. *Langston PK, Nambu A, Jung J, Shibata M, Aksoylar HI, Lei J, Xu P, Doan MT, Jiang H, MacArthur MR, Gao X, Kong Y, Chouchani ET, Locasale JW, Snyder NW, Horng T* (2019) Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses. Nat Immunol 20(9): 1186–1195.
https://doi.org/10.1038/s41590-019-0453-7
10. *Lu J, Xu Z, Duan H, Ji H, Zhen Z, Li B, Wang H, Tang H, Zhou J, Guo T, Wu B, Wang D, Liu Y, Niu Y, Zhang R* (2020) Tumor-associated macrophage interleukin-β promotes glycerol-3-phosphate dehydrogenase activation, glycolysis and tumorigenesis in glioma cells. Cancer Sci 111(6): 1979–1990.
https://doi.org/10.1111/cas.14408
11. *Solier S, Müller S, Rodriguez R* (2020) Whole-genome mapping of small-molecule targets for cancer medicine. Curr Opin Chem Biol 56: 42–50.
https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.12.005
12. *Kuusk A, Boyd H, Chen H, Ottmann C* (2020) Small-molecule modulation of p53 protein-protein interactions. Biol Chem 28; 401(8): 921–931.
https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0405
13. *Колотьева НА, Потехина ВИ, Горбачева ИВ, Козлов АВ* (2016) Лактат: есть ли тупик метаболизма? Наука молодых – Eruditio Juvenium 1: 28–32. [*Kolotyeva NA, Potekhina VI, Gorbacheva IV, Kozlov AV* (2016) Lactate: Is There A Stalemate Of Metabolism? Eruditio Juvenium 1: 28–32. (In Russ)].
14. *Gilmiyarova F, Kolotyeva N, Radomskaya V, Gusyakova O, Gorbacheva I, Potekhina V* (2016) Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction. J Biosci Med 4: 28–35.
https://doi.org/10.4236/jbm.2016.47004
15. *Tang F, Lane S, Korsak A, Paton JF, Gourine AV, Kasparov S, Teschemacher AG* (2014) Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. Nat Commun 5: 3284.
https://doi.org/10.1038/ncomms4284
16. *Jin L, Wang W, Fang G* (2014) Targeting protein-protein interaction by small molecules. Annu Rev Pharmacol Toxicol 54: 435–456.
https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-140028

Predicted and Experimentally Confirmed Lactate Characteristics: New Possibilities for the Management of Endothelial Cell Metabolism

F. N. Gilmiyarova[a], N. A. Kolotyeva[a, *], and O. A. Gusyakova[a]

[a] *Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Samara, Russia*
**e-mail: kaf_biohim@samsmu.ru*

A new interest in the study of small molecules arises with the development of science and technology, given the accumulated knowledge in genomics, proteomics and metabolomics. Since a modern period has come, dedicated to the study of functional activity, the role of metabolites, as well as the elucidation of biological processes, signal cascade reactions in norm and pathology. We turned our attention to lactate, which is not considered anymore as a “dead end” of anaerobic metabolism, formed in tissues with accelerated glycolysis. In recent years, the dominant view has been that lactate is a metabolite that plays an important role in regulating the function of many cells (adipocytes, endothelial cells, neurons), participating in the processes of tissue remodeling, angiogenesis, proliferation and differentiation. Studying the effect of lactate on isolated catalytic proteins can reveal important and yet unexplored roles of small molecules in intermolecular processes. As an individual protein, we chose the enzyme glycerol-3-phosphate dehydroge-

nase that switches carbohydrate-lipid and lipid-carbohydrate metabolism. Studying the effect of lactate on isolated catalytic proteins may reveal important and unexplored roles of small molecules in intermolecular processes. The aim of the study was to evaluate the affinity of lactate to glycerol-3-phosphate dehydrogenase in order to clarify the functional ability of the intermediate. The spectrum of biological activity of lactate was revealed by computer modelling and the interaction partner proteins were characterized. By differential scanning fluorimetry and microcapillary thermophoresis we established the interaction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase with lactate and showed the presence of changes in conformational stability of the enzyme.

Keywords: lactate, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, computer modeling, differential scanning fluorimetry, microcapillary thermophoresis

EDN: MNKABP
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 677–685

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МЕТИЛ-БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИН ИЗМЕНЯЕТ УРОВЕНЬ БЕЛКОВ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ В ЭНДОТЕЛИИ СОСУДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2022 г. А. Г. Марков[1, *], А. Е. Бикмурзина[1], А. А. Федорова[1], И. И. Кривой[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
**E-mail: a.markov@spbu.ru*

Поступила в редакцию 08.02.2022 г.
После доработки 05.04.2022 г.
Принята к публикации 07.04.2022 г.

Гематоэнцефалический барьер обеспечивает оптимальные условия для функционирования нейронов головного мозга. Барьерные свойства эндотелия кровеносных сосудов мозга определяются белками семейства клаудина и окклюдином, которые являются ключевыми молекулярными детерминантами избирательного межклеточного транспорта. В формировании структуры плотных контактов важная роль принадлежит липидам плазматической мембраны, объединенные в липидный рафт вместе с белками плотных контактов. Развитие нейродегенеративных заболеваний и психиатрических расстройств коррелирует с изменением клаудинов в эндотелии сосудов головного мозга. Исследовали влияние метил-бета-циклодекстрина (МбЦД), который вызывает дестабилизацию липид-упорядоченной фазы плазматической мембраны, на уровень клаудина-1, -5 и окклюдина в ткани мозга крысы. Самцам крыс внутривенно вводился МбЦД в дозе 5 мг/кг массы тела животного, через 30 мин ткань мозга бралась для проведения Вестерн-блота и иммуногистохимии. МбЦД вызывал значительное снижение уровня клаудина-5 в ткани лобных долей мозга крысы. Уровень клаудина-1 и окклюдина оставался без изменений. Иммуногистохимия и анализ изображений на конфокальном лазерном микроскопе подтверждают, что изменение уровня клаудина-5 локализовано в эндотелии кровеносных сосудов. Клаудин-5 вносит основной вклад в непроницаемость эндотелия кровеносных сосудов, поэтому можно предположить, что изменение упорядоченности липидной фазы рафтов может привести к увеличению межклеточной проницаемости. Полученные результаты свидетельствуют о том, что липидное окружение является важным молекулярным компонентом плотных контактов эндотелия кровеносных сосудов головного мозга крысы и может принимать участие в поддержании и регуляции барьерных свойств гематоэнцефалического барьера.

Ключевые слова: эндотелий, кровеносные сосуды, мозг, гематоэнцефалический барьер, метил-бета-циклодекстрин, клаудины, липидные рафты

DOI: 10.31857/S0869813922050089

Эндотелий кровеносных сосудов головного мозга является одной из ключевых структур гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который обеспечивает регулируемый транспорт ионов, воды и различных веществ между плазмой крови и паренхимой головного мозга [1, 2]. Функционирование эндотелия сосудов приводит к стабилизации и поддержанию функций нейронов [3, 4], а нарушение целостности ГЭБ вовлечено в патогенез различных нейродегенеративных заболеваний [5, 6]. Плотные контакты представляют собой апикальный комплекс белков, располо-

женных в плазматических мембранах соседних эндотелиоцитов и взаимодействующих между собой в межклеточном пространстве. Разнообразие белков, составляющих этот комплекс, в первую очередь белков семейства клаудина, обеспечивает селективную парацеллюлярную проницаемость [7, 8]. Молекулярная архитектоника плотных контактов представляется в виде кластеров взаимосвязанных белков [9], образующих с помощью адаптерных белков и протеинкиназ сигнальную платформу [10]. В кластеризации белков плотных контактов плазматической мембраны клеток важную роль играют липиды, объединенные в липидный рафт вместе с клаудинами [11]. Изучение роли липидного окружения в регуляции функций кластеров белков плазматической мембраны проводят с помощью производных циклического олигосахарида – циклодекстрина. Эти соединения вызывают дестабилизацию липид-упорядоченной фазы плазматической мембраны, что приводит к увеличению текучести и проницаемости этих мембран клеток в модельных условиях [12, 13]. В исследованиях *in vivo* на животных моделях нейродегенеративных заболеваний преимущественно используют 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин [14]. Для анализа роли липидного окружения в плотных контактах используют метил-бета-циклодекстрин (МбЦД) [15, 16].

Данные о роли липидного окружения в формировании эндотелиального барьера кровеносных сосудов мозга на животных ограничены. Известно, что основной вклад в непроницаемость эндотелия сосудов головного мозга вносит клаудин-5 [17]. Развитие психиатрических расстройств коррелирует с изменением клаудина-5 в эндотелии сосудов головного мозга [18, 19]. Данные о влиянии МбЦД на эндотелий сосудов головного мозга ограничиваются единичной статьей, в которой иммуногистохимическим методом показано уменьшение сигнала клаудина-5 в эндотелиоцитах при действии этого соединения [15]. Эти данные требуют подтверждения с помощью других методов, оценивающих уровень белка в эндотелиоцитах. Стоит отметить, что в плотных контактах эндотелия кровеносных сосудов головного мозга представлены различные клаудины. В первичных культурах эндотелиоцитов сосудов мозга мышей и крыс продемонстрировано наличие клаудина-1 [20, 21]. Удаление холестерина с помощью МбЦД из липидных рафтов в линии клеток Caco-2 свидетельствует о том, что этот белок, в отличие от других клаудинов, не реагирует на дестабилизацию липидного окружения [16]. Этот факт позволяет предположить дифференцированную реакцию белков плотных контактов в эндотелии сосудов головного мозга на МбЦД, что может быть принципиально важно при прогнозировании изменения проницаемости эндотелиального барьера кровеносных сосудов. В то время как клаудины влияют на проницаемость эпителия для ионов, окклюдин востребован для ограничения парацеллюлярного транспорта органических молекул [22]. Окклюдин представлен в плотных контактах эндотелиальных клеток сосудов мозга человека и включен в регуляцию проницаемости этих клеток при действии различных факторов [23, 24]. Цель данного исследования состояла в изучении уровня клаудина-1, -5 и окклюдина в эндотелии сосудов головного мозга крыс при внутривенном введении метил-бета-циклодекстрина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и схема эксперимента. В экспериментах использовали самцов крыс Вистар (масса тела 180–200 г, $n = 5$). Животных содержали в клетках по пять особей при стабилизированной температуре и фиксированном стандартном освещении (12 ч свет/12 ч темнота). Животных содержали на стандартном рационе питания при свободном доступе к пище и воде. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декла-

рации и рекомендациям Этического комитета по работе с животными Санкт-Петербургского государственного университета.

Для исследования влияния действия МбЦД крысам его вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг массы тела животного. Ранее было установлено, что эта доза при внутривенном введении оказывает влияние на структуру плотных контактов кровеносных сосудов мозга [15]. Через 30 мин проводили декапитацию животных на гильотине (OpenScience, Россия). Животным из группы контроля внутривенно вводили такой же объем физиологического раствора. Ткань лобных долей головного мозга замораживали при –80°C для последующего проведения Вестерн-блот анализа, а также фиксировали в 10%-ном забуференном формалине для иммуногистохимии. Пробы для Вестерн-блота и иммуногистохимии брали у всех животных из одной и той же области мозга. Иссекали участок головного мозга перед центральной извилиной, который соответствует моторной зоне коры крысы.

Вестерн-блот. Для проведения Вестерн-блот анализа ткань мозга была гомогенизирована при помощи механического гомогенизатора Retsch MM 400 (Retsch, Германия) с добавлением лизирующего буфера RIPA (25 мМ HEPES (pH 7.6); 2 мМ EDTA; 25 мМ NaF; 1% SDS), содержавшего ингибиторы протеаз cOmplete mini EDTA tablets (Roche, Германия). Вестерн-блот проводили, как описано нами ранее [25]. Применяли первичные антитела против: клаудина-1 (1 : 1000, Invitrogen, США), клаудина-5 (1 : 500, Invitrogen, США), окклюдина (1 : 1000, Invitrogen, США), вторичные антитела goat-anti-rabbit и goat-anti-mouse (1 : 1000, Abcam, США). Содержание клаудинов было нормализовано на общий белок того же образца. Уровень белков в контрольных группах был принят за 100%.

Иммуногистохимия. После предварительной фиксации в 10%-ном забуференном формалине перед нарезкой ткань мозга помещали в 15%-ный раствор сахарозы на 24 ч. Затем ткань отмывали в растворе PBS и погружали в криопротектор (Frozen Section Compound, Leica Biosystems, США) на 30 мин. Получение серийных срезов замороженной ткани мозга (15 мкм) осуществляли на криостат-микротоме CM1850UV (Leica Microsystems, Австрия). Срезы в течение 45 мин подвергали тепловой демаскировке в цитратном буфере (T 80°C, 0.01 M, pH 6.0). После серии промывок в PBS срезы инкубировали в блокирующем растворе (0.2%-ный Triton, 10%-ный BSA, PBS pH 7.4) в течение 2 ч при 37°C, а затем с первичными крысиными поликлональными антителами к клаудину-1 и окклюдину (1 : 100, Thermo Fisher Scientific, США, # 71-7800, 71-1500), а также с первичными мышиными моноклональными антителами к клаудину-5 (1 : 100, Thermo Fisher Scientific, США, # 32-2500) в течение суток при 4°C. После промывания в растворе PBS использовали соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor-488 (1 : 800, Invitrogen, США), в течение 120 мин при 37°C. Протокол завершали промыванием срезов в PBS и нанесением заливочной среды с ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, 0.1 мкг/мл). Визуализация полученных срезов проводилась с использованием микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для дополнительного подтверждения локализации белков плотных контактов именно в кровеносных сосудах мозга использовали метод двойного иммуномечения с применением первичных мышиных моноклональных антител к PECAM-1 (M-20, 1 : 200, SantaCruz, США) и клаудину-5 (1 : 200, Thermo Fisher Scientific, США), а также вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor-488 (1 : 800, Invitrogen, США) и CF-633 (1 : 800, Sigma Aldrich, США). Для исключения неспецифического свечения вторичных антител был проведен негативный контроль, который показал отсутствие фоновой флуоресценции.

Состав растворов и концентрации физиологически активных веществ. Использовали МбЦД и реактивы для приготовления растворов фирмы Sigma Aldrich (США).

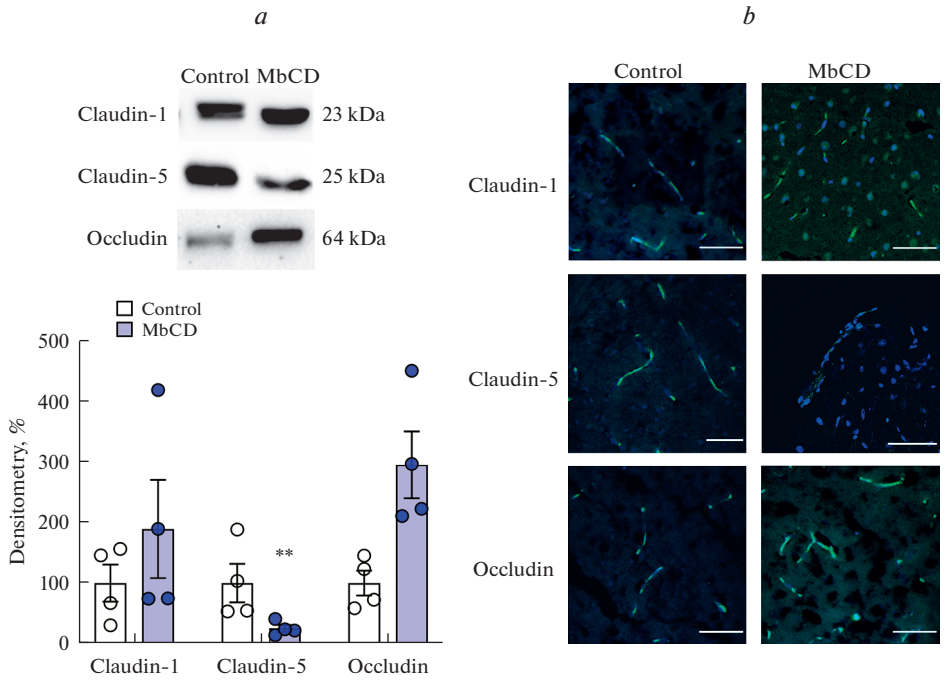

Рис. 1. Содержание и локализация белков плотных контактов в ткани лобных долей головного мозга крысы в контроле и после внутривенного введения метил-бета-циклодекстрина (MbCD) в дозе 5 мг/кг на 30 мин. *a* – примеры иммуноблотов (верхняя панель) и денситометрия (нижняя панель) блотов белков плотных контактов ($n = 4$ в обеих группах), $^{**}p < 0.01$ по сравнению с контролем, односторонний дисперсионный анализ с поправкой Даннета. *b* – локализация белков плотных контактов в области кровеносных сосудов лобных долей головного мозга крысы. Распределение клаудинов (зеленый канал) и овальная форма ядер эндотелиальных клеток (DAPI, синий канал) совпадает с характерным расположением кровеносных сосудов в ткани мозга (шкала – 50 мкм).

Статистическая обработка результатов исследований. Статистическая обработка результатов проводилась общепринятыми методами с использованием компьютерной статистической программы GraphPad Prism 8 (GraphPad; San Diego, CA, США). Для обработки данных использовали тест OneWay ANOVA с поправкой Даннета. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Уровень достоверности $p < 0.05$ был принят как статистически значимый. Данные представлены в виде средней арифметической ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздействие МбЦД в течение 30 мин в дозе 5 мг/кг массы тела (в/в введение) привело к изменению уровня клаудинов и окклюдина в ткани лобных долей головного мозга крысы. Установлено достоверное снижение уровня клаудина-5 на 75% по сравнению с контрольной группой. Уровень клаудина-1 и окклюдина остался без изменений (рис. 1*a*).

Молекула PECAM-1 является одним из основных белков межклеточных контактов эндотелиальных клеток, поэтому данный белок относят к маркерам этих кле-

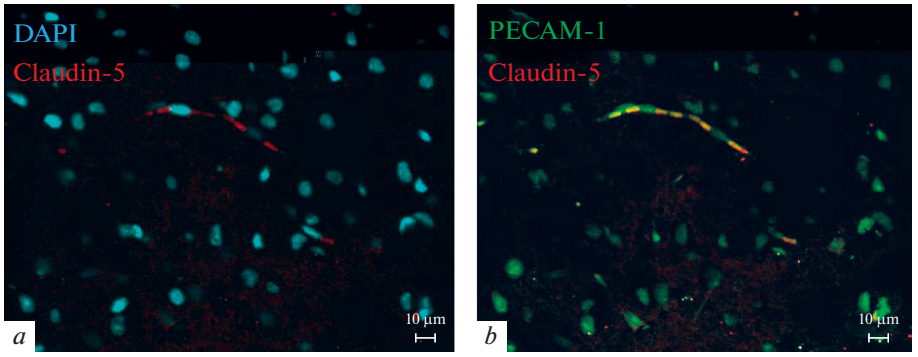

Рис. 2. Локализация маркеров эндотелия кровеносных сосудов мозга клаудина-5 и PECAM-1 в ткани головного мозга крысы. а – синий канал сигнал от ядер (DAPI); красный канал – клаудин-5; *b* – зеленый канал – PECAM-1, красный канал – клаудин-5. Масштабная линейка – 10 мкм.

ток с самых ранних исследований [26]. Другим маркером эндотелия кровеносных сосудов различных областей головного мозга является клаудин-5 [27]. Использование метода двойной иммуногистохимической метки на контрольных образцах продемонстрировало идентичный характер распределения сигналов в ткани мозга от PECAM-1 и клаудина-5, что указывает на их локализацию в кровеносном сосуде (рис. 2). Кроме этого, протяженный характер распределения сигнала и овальная форма ядер свидетельствуют, что иммуноокрашивание дает свечение в области эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Сигналы от клаудина-1, -5 и окклюдина были выявлены на всех образцах. Анализ изображений показывает, что воздействие МбЦД не привело к распределению этих молекул в ткани мозга. Уменьшение и увеличение их уровня было специфичным для эндотелия, так как локализовано в пределах кровеносных сосудов (рис. 1*b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показывают, что дестабилизация липидного состава плазматической мембраны эндотелия кровеносных сосудов лобных долей головного мозга крысы оказывает влияние на структуру плотных контактов этих клеток. Внутривенное введение МбЦД в дозе 5 мг/кг через 30 мин приводит к изменению уровня белков плотных контактов. МбЦД снижает экспрессию основного белка плотных контактов эндотелия кровеносных сосудов клаудина-5 оставляя без изменения уровень клаудина-1 и окклюдина. Поскольку известно, что клаудин-5 является основным барьерообразующим белком плотных контактов в эндотелиоцитах головного мозга [17], можно предположить, что изменение упорядоченности липидной фазы рафтов может привести к увеличению проницаемости ГЭБ.

МбЦД является для организма млекопитающих ксенобиотиком. Однако в плазме крови существуют метаболиты, которые также могут влиять на липиды мембран. Снижение барьерных свойств эпителия при действии капрата натрия (жирная кислота, C10) может происходить за счет разрушения липидного рафта [28], что свидетельствует о возможном изменении состояния ГЭБ при метаболических изменениях биохимического профиля плазмы крови.

Иммуногистохимическим методом ранее было показано снижение клаудина-5 при действии МбЦД в эндотелии сосудов мозга [15]. В наших опытах методом Ве-

стерн-блота было подтверждено снижение клаудина-5 при применении той же дозы МбЦД и отсутствие изменений в уровне клаудина-1 и окклюдина. Стоит отметить согласование результатов экспериментов на животных с опытами по распределению клаудинов в липидных рафтах при инкубации клеток линии MDCK с капратом натрия. Применение капрата натрия приводит к вытеснению клаудина-5 из липидных рафтов, но не влияет на распределение клаудина-1 [28]. Возможно, это связано с тем, что рафты имеют различный липидный состав [5]. Циклодекстрины обладают селективной избирательной активностью относительно экстракции липидов. МбЦД удаляет из плазматической мембраны клеток преимущественно фосфолипиды и холестерин [29]. Эти наблюдения могут свидетельствовать об избирательности взаимодействия отдельных клаудинов, которые имеют различный аминокислотный состав, с липидами рафтов и об их гетерогенном распределении в структуре плотных контактов.

Отсутствие изменения содержания окклюдина, который важен для стабилизации плотных контактов в эпителиальных тканях [30], также подтверждает разнообразие эффектов МбЦД на структуру плотных контактов эндотелия сосудов.

Изменение уровня различных белков плотных контактов при действии МбЦД может происходить при активации различных сигнальных систем клетки. Интегральные белки плазматической мембраны, к которым относятся клаудины и окклюдин, взаимодействуют через адаптерные белки с апикальным актомиозиновым комплексом и различными сигнальными белками [10]. Воздействие МбЦД приводит к дестабилизации холестерина в плазматической мембране, изменению ее механических свойств и, как следствие, происходит перестройка цитоскелета и полимеризация актина, что вызывает запуск внутриклеточного сигналинга [31]. Ремоделирование апикального актомиозинового кольца приводит к молекулярной реорганизации состава и структуры плотных контактов, изменению проницаемости эпителия, в том числе для ионов натрия [32]. В опытах на клеточных линиях было показано, что уменьшение холестерина в плазматической мембране ведет к уменьшению экспрессии альфа-1 субъединицы Na,K-АТФазы при включении Src-зависимого сигнального пути [33]. Использование специфического лиганда Na,K-АТФазы уабаина подтверждает функциональное взаимодействие через Src-сигналинг между Na,K-АТФазой и модуляцией экспрессии клаудинов в плотных контактах [25]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что липидное окружение является важным молекулярным компонентом плотных контактов эндотелия кровеносных сосудов головного мозга крысы и может принимать участие в поддержании и регуляции барьерных свойств ГЭБ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ) № 18-15-00043. Исследования были проведены с использованием Ресурсного центра “Центр молекулярных и клеточных технологий” (проект № 109-14629), а также Центра коллективного пользования оборудованием “Хромас” (проект № 101-14625) Санкт-Петербургского государственного университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Автор А.Г.М. – член редколлегии Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (А.Г.М., И.И.К.), получение экспериментальных данных (А.Е.Б., А.А.Ф.), обработка результатов (А.Е.Б., А.А.Ф.), написание и редактирование рукописи статьи (А.Г.М., А.Е.Б., А.А.Ф., И.И.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sheikov N, McDannold N, Sharma S, Hynynen K* (2008) Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. Ultrasound Med Biol 34: 1093–1104. https://doi.org/10.1016/j. ultrasmedbio.2007.12.015
2. *Ahishali B, Kaya M* (2021) Evaluation of Blood-Brain Barrier Integrity Using Vascular Permeability Markers: Evans Blue, Sodium Fluorescein, Albumin-Alexa Fluor Conjugates, and Horseradish Peroxidase. Methods Mol Biol 2367: 87–103. https://doi.org/10.1007/7651_2020_316
3. *Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ* (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis 37: 13–25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030
4. *Nico B, Ribatti D* (2012) Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. Curr Drug Metab 13: 50–60. https://doi.org/10.2174/138920012798356970
5. *Petrov AM, Kasimov MR, Zefirov AL* (2016) Brain Cholesterol Metabolism and Its Defects: Linkage to Neurodegenerative Diseases and Synaptic Dysfunction. Acta Naturae 8(1): 58–73. https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-58-73
6. *Anchisi L, Dessì S, Pani A, Mandas A* (2013) Cholesterol homeostasis: A key to prevent or slow down neurodegeneration. Front Physiol 3: 486. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00486
7. *Günzel D, Yu AS* (2013) Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev 93: 525–569. https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012
8. *Tsukita S, Tanaka H, Tamura A* (2019) The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. Trends Biochem Sci 44: 141–152. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.008
9. *Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S* (2015) Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. IUBMB Life 67: 29–35. https://doi.org/10.1002/iub.1347
10. *Zahraoui A, Louvard D, Galli T* (2000) Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. J Cell Biol 151: F31–F36. https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.F31
11. *Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, Abeles MB, Ward HJ* (2008) A lipid-protein hybrid model for tight junction. Am J Physiol Renal Physiol 295: F1601–F1612. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00097.2008
12. *Martín Del Valle EM* (2004) Cyclodextrins and their uses: A review. Process Biochem 39: 1033–1046. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9
13. *Dos Santos AG, Bayiha JC, Dufour G, Cataldo D, Evrard B, Silva LC, Deleu M, Mingeot-Leclercq MP* (2017) Changes in membrane biophysical properties induced by the Budesonide/Hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex. Biochim Biophys Acta Biomembr 1859: 1930–1940. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.010
14. *Du J, Liu X, Zhang Y, Han X, Ma C, Liu Y, Guan L, Qiao L, Lin J* (2022) The Effects of Combined Therapy With Metformin and Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin in a Mouse Model of Niemann-Pick Disease Type C1. Front Pharmacol 12: 825425. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.825425
15. *Atışa M, Akcana U, Yılmazb CU, Orhanc N, Düzgüna P, Ceylana UD, Arıcand N, Karahüseyinoğlue S, Şahine GN, Ahıshalıf B, Kaya M* (2019) Effects of methyl-beta-cyclodextrin on blood-brain barrier permeability in angiotensin II-induced hypertensive rats. Brain Res 1715: 148–155. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.024
16. *Lambert D, O'Neill CA, Padfield PJ* (2007) Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. Cell Physiol Biochem 20: 495–506. https://doi.org/10.1159/000107533
17. *Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S* (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. J Cell Biol 161: 653–660. https://doi.org/10.1083/jcb.200302070

18. *Greene C, Hanley N, Campbell M* (2020) Blood-brain barrier associated tight junction disruption is a hallmark feature of major psychiatric disorders. Transl Psychiatry 10: 373. https://doi.org/10.1038/s41398-020-01054-3
19. *Dudek KA, Dion-Albert L, Lebel M, LeClair K, Labrecque S, Tuck E, Ferrer Perez C, Golden SA, Tamminga C, Turecki G, Mechawar N* (2020) Molecular adaptations of the blood–brain barrier promote stress resilience vs. depression. Proc Natl Acad Sci U S A 117: 3326–3336. https://doi.org/10.1073/pnas.1914655117
20. *Díaz-Coránguez M, Segovia J, López-Ornelas A, Puerta-Guardo H, Ludert J, Chávez B, Meraz-Cruz N, González-Mariscal L* (2013) Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. PLoS One 8: e60655. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060655
21. *Velandia-Romero ML, Calderón-Peláez MA, Castellanos JE* (2016) In Vitro Infection with Dengue Virus Induces Changes in the Structure and Function of the Mouse Brain Endothelium. PLoS One 11: e0157786. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157786
22. *Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, Lingaraju A, Zha J, Abbott E, McAuley EM, Breskin LA, Wu L, Anderson K, Turner JR, Weber CR* (2013) Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. Mol Biol Cell 24: 3056–3068. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0688
23. *Zhang Y, Ding X, Miao C, Chen J* (2019). Propofol attenuated TNF-α-modulated occludin expression by inhibiting Hif-1α/VEGF/VEGFR-2/ ERK signaling pathway in hCMEC/D3 cells. BMC Anesthesiol 19: 127. https://doi.org/10.1186/s12871-019-0788-5
24. *Tian J, Shi R, Liu T, She R, Wu Q, An J, Hao W, Soomro MH* (2019) Brain Infection by Hepatitis E Virus Probably via Damage of the Blood-Brain Barrier Due to Alterations of Tight Junction Proteins. Front Cell Infect Microbiol 9: 52. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00052
25. *Markov AG, Fedorova AA, Kravtsova VV, Bikmurzina AE, Okorokova LS, Matchkov VV, Cornelius V, Amasheh S, Krivoi II* (2020) Circulating Ouabain Modulates Expression of Claudins in Rat Intestine and Cerebral Blood Vessels. Int J Mol Sci 21: 5067. https://doi.org/10.3390/ijms21145067
26. *Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newmanll PJ* (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. J Cell Biol 114(5): 1059–1068. https://doi.org/10.1083/jcb.114.5.1059
27. *Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S* (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. J Cell Biol 147: 185–194. https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.185
28. *Sugibayashi K, Onuki Y, Takayama K* (2009) Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate. Eur J Pharm Sci 36: 246–253. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.09.011
29. *Monnaert V, Tilloy S, Bricout H, Fenart L, Cecchelli R, Monflier E* (2004) Behavior of α-, β-, and γ-Cyclodextrins and Their Derivatives on an in Vitro Model of Blood-Brain Barrier. J Pharm Exp Ther 310: 745–751. https://doi.org/10.1124/jpet.104.067512
30. *Saito AC, Higashi T, Fukazawa Y, Otani T, Tauchi M, Higashi AY, Furuse M, Chiba H* (2021) Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function. Mol Biol Cell 32(8): 722–738. https://doi.org/10.1091/mbc.E20-07-0464
31. *Hissa B, Pontes B, Roma PM, Alves AP, Rocha CD, Valverde TM, Aguiar PH, Almeida FP, Guimarães AJ, Guatimosim C, Silva AM, Fernandes MC, Andrews NW, Viana NB, Mesquita ON, Agero U, Andrade LO* (2013) Membrane Cholesterol Removal Changes Mechanical Properties of Cells and Induces Secretion of a Specific Pool of Lysosomes. PLoS One 8: e82988. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082988
32. *He WQ, Wang J, Sheng JY, Zha JM, Graham WV, Turner JR* (2020) Contributions of Myosin Light Chain Kinase to Regulation of Epithelial Paracellular Permeability and Mucosal Homeostasis. Int J Mol Sci 21: 993. https://doi.org/10.3390/ijms21030993
33. *Zhang J, Li X, Yu H, Larre I, Dube PR, Kennedy DJ, Tang WHW, Westfall K, Pierre SV, Xie Z, Chen Y* (2020) Regulation of Na/K-ATPase expression by cholesterol: isoform specificity and the molecular mechanism. Am J Physiol Cell Physiol 319: C1107–C1119. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00083.2020

Methyl-Beta-Cyclodextrin Changes the Level of Tight Junction Protein in the Endothelium of the Cerebral Vessels

A. G. Markov[a], *, A. E. Bikmurzina[a], A. A. Fedorova[a], and I. I. Krivoi[a]

[a] *St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*
**e-mail: a.markov@spbu.ru*

The blood-brain barrier provides optimal conditions for the functioning of brain neurons. The barrier properties of the endothelium of brain blood vessels are determined by proteins of the claudin and occludin families, which are major molecular determinants of selective intercellular transport. Lipids of the plasma membrane play an important role in forming the structure of tight junction, which are combined into a lipid raft together with tight junction proteins. The development of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders correlates changes in claudins in the cerebral vascular endothelium. We studied the effect of methyl-beta-cyclodextrin (MbCD), which causes destabilization of the lipid phase of the plasma membrane, on claudin-1, -5, and occludin levels in rat brain tissue. Male rats were injected intravenously with MbCD at a dose of 5 mg/kg of animal body weight, and 30 min later brain tissue was taken for Western blot and immunocytochemistry. MbCD caused a significant decrease in the level of claudin-5 in the tissue of the frontal lobes of the rat brain. The level of claudin-1 and occludin remains unchanged. Immunohistochemistry and confocal laser microscope image analysis confirm that the change in claudin-5 is localized in the endothelium of blood vessels. Claudin-5 is a major contributor to the impermeability of the endothelium of blood vessels, so we can assume that a change in the orderliness of the lipid phase of the rafts may lead to an increase in intercellular permeability. The results suggest that the lipid environment is an important molecular component of the tight junction blood vessel endothelium in the rat brain and may participate in the maintenance and regulation of the barrier properties of the blood-brain barrier.

Keywords: endothelium, blood vessels, brain, blood-brain barrier, methyl-beta-cyclodextrin, claudins, lipid rafts

EDN: MVDJJT
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 5, с. 686–696

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРА НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ НА КОМПОНЕНТЫ НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ЕДИНИЦЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА *IN VITRO*

© 2022 г. Е. В. Стельмашук[1], М. Р. Капкаева[1], Н. А. Розанова[1], О. П. Александрова[1], Е. Е. Генрихс[1], В. В. Обмолов[1, 2], С. В. Новикова[1], Н. К. Исаев[1, 2, *]

[1]*Научный центр неврологии, Москва, Россия*
[2]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
**E-mail: nisaev61@mail.ru*

Поступила в редакцию 15.02.2022 г.
После доработки 05.04.2022 г.
Принята к публикации 06.04.2022 г.

Существует тесная связь капилляров мозга с функциональной нагрузкой нейронов и глиальных клеток, что позволяет рассматривать их как единый структурно-функциональный комплекс – нейроваскулярную единицу. Изучено влияние липополисахарида (ЛПС, 5–30 мкг/мл, 24 ч) на продукцию оксида азота и действие менадиона (5–50 мкМ, 24 ч) на жизнеспособность клеток в культурах зернистых нейронов, клеток эндотелия коры головного мозга и астроцитов, оценен митохондрион в разных типах клеток. Найдено, что применение 5 мкг/мл ЛПС вызывало интенсивную продукцию оксида азота в клеточных культурах. Наибольший эффект был показан для астроцитов, в которых ЛПС вызывал достоверное увеличение продукции оксида азота более, чем в 8 раз. В культурах зернистых нейронов данное воздействие вызывало увеличение продукции оксида азота почти в 5 раз. Самый слабый ответ на стимуляцию продукции оксида азота был показан для клеток эндотелия – в 1.7 раза. Для индукции окислительного повреждения в среду культивирования вносили менадион. 10 мкМ менадиона было достаточно для полной гибели зернистых нейронов. Повреждение клеток эндотелия и астроцитов наблюдалось только при повышении концентрации менадиона до 50 мкМ. Так как окислительный стресс при действии менадиона опосредован митохондриями, была выполнена оценка митохондриона в интактных клетках. Показано, что в астроцитах и эндотелии митохондрии многочисленны и представляют собой длинные изогнутые тяжи, тогда как в зернистых нейронах эти органеллы гораздо мельче по размеру, округлой формы. Таким образом, в нейроваскулярной единице головного мозга при развитии нейровоспаления главными продуцентами оксида азота являются астроциты, а наиболее чувствительными к окислительному стрессу, несмотря на относительно слабое развитие митохондриона, являются нейроны, при этом клетки церебрального эндотелия демонстрируют минимальный вклад в продукцию оксида азота.

Ключевые слова: эндотелиоцит, астроцит, зернистый нейрон, липополисахарид, менадион, митохондрии

DOI: 10.31857/S0869813922050107

Головной мозг обладает высокой интенсивностью потребления кислорода и глюкозы по сравнению с другими органами, и его функционирование очень зависимо от притока глюкозы из крови. Это связано прежде всего с тем, что собствен-

ные запасы данного углевода в ткани мозга незначительны. Следовательно, нормальная деятельность головного мозга невозможна без эффективной работы систем, обеспечивающих этот орган кислородом и глюкозой, что выполняется капиллярным звеном сосудистой системы, находящейся в тесном взаимодействии с различными клетками нервной системы. То есть существует тесная связь капилляров мозга с функциональной нагрузкой нейронов и глиальных клеток, что позволяет рассматривать их как единый структурно-функциональный комплекс – нейроваскулярную единицу [1]. Современные фактические данные подтверждают концепцию “сосудисто-нервного комплекса”, состоящего из сегментарно разнообразных функциональных модулей, которые реализуют скоординированные сосудистые реакции в ответ на центральные и периферические сигналы для поддержания гомеостаза мозга [2]. Сложная связь между нервными и сосудистыми структурами необходима для быстрого и точного соответствия кровотока метаболизму нейронов в центральной нервной системе.

Поддержание сохранности нейроваскулярной единицы и корректное взаимодействие ее составляющих является основой функционирования головного мозга. Исключительность нейроваскулярной единицы в поддержании метаболизма всех церебральных процессов обосновывает облигатность ее участия в патофизиологии обширной группы неврологических заболеваний и патологических состояний головного мозга. В настоящее время показано сходство структурных изменений в нейроваскулярной единице на ранних стадиях старения и гипертензивной церебральной микроангиопатии, что позволяет предполагать единство патогенетических механизмов повреждения нейроваскулярной единицы при разных типах патологических процессов [3]. Поэтому изучение структуры, клеточных и молекулярных механизмов физиологического и патофизиологического функционирования нейроваскулярной единицы является крайне важным и необходимым для понимания возможностей здорового, стареющего и измененного при заболеваниях головного мозга.

Нарушение сосудисто-нервной координации наблюдается при различных заболеваниях головного мозга, связанных с воспалением и окислительным стрессом, таких как инфекционные заболевания, инсульт, сосудистая деменция и рассеянный склероз. Воспалительные реакции, возникающие в результате инфекций или повреждений головного мозга, а также при нейродегенерации, активируют эндотелий и глиальные клетки в различной степени в зависимости от типа, титра или силы и продолжительности воздействия агентов [4]. В физиологических и патологических условиях один из газовых трансмиттеров – оксид азота – выступает в качестве медиатора межклеточных взаимодействий в нейроваскулярной единице головного мозга. Известно, что различные клетки, входящие в состав нейроваскулярной единицы, способны продуцировать оксид азота, что показано для нейронов [5], астроцитов [6], клеток церебрального эндотелия [7]. Продукция оксида азота существенно меняется при нейродегенерации и нейровоспалении, что определяет не только изменения микроциркуляции, но и вносит вклад в развитие нитрозативного и окислительного стресса и образование нитрозилированных по тирозину белков, запускающих механизмы аберрантной сигнальной трансдукции и мисфолдинга [8, 9]. Однако остается неясным, какой вклад клетки нейроваскулярной единицы вносят в такие эффекты, что не позволяет идентифицировать потенциальные клетки-мишени для фармакологической коррекции. Для исследования этого вопроса были использованы первичные культуры, так как исследование NO-сигналинга в нейроваскулярной единице на отдельных культурах изолированных клеток является необходимым этапом изучения этого процесса в нейроваскулярной единице.

Задачей настоящей работы было исследование уровня продукции оксида азота основными клеточными компонентами нейроваскулярной единицы при модели-

ровании воспаления с помощью липополисахарида *in vitro*, а также определение и сравнение их чувствительности к окислительному стрессу.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям локального этического комитета ФГБНУ НЦН (протокол № 12-16/19 от 25.12.2019 г.).

В работе использованы монослойные диссоциированные культуры эндотелия, астроцитов и зернистых нейронов головного мозга крыс линии Wistar.

Эндотелиальные культуры получали по описанному ранее методу [10]. У анестезированных и стерилизованных 14-дневных крыс извлекали головной мозг и перекатывали по стерильной фильтровальной бумаге для удаления оболочек. После удаления крупных кровеносных сосудов и белого вещества кору больших полушарий промывали несколько раз холодным раствором Хенкса (HBSS, Gibco Life Technologies, Великобритания), измельчали и центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин. К осадку доливали 25%-ный бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma, США) в объеме, в 2 раза превышающим объем осадка, и пипетировали 25–30 раз движениями вверх и вниз с помощью пастеровской пипетки. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 2000 об./мин. Надосадок пипетировали повторно 25–30 раз и центрифугировали. К осадку добавляли 0.1%-ный раствор коллагеназы (Sigma-Aldrich, США) на фосфатном буфере (Gibco Life Technologies, США) на 40 мин при 37°C. Ферментированные микрососуды центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин. Осадок ресуспендировали в среде культивирования, содержащей 80% модифицированной среды Игла (DMEM-F12, GIBCO Invitrogen Corporation, США), 20% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Австрия), 2 мМ глутамина (glutaMAX, Gibco, Великобритания), 16.6 мМ глюкозы, и высаживали на пластиковую чашку Петри диаметром 40 мм (Медполимер, Россия). Дважды в неделю производили смену среды культивирования. В методе применяется длительное пипетирование и центрифугирование, что приводит к гибели большей части клеток глии, поэтому нет необходимости в химическом подавлении роста астроцитов.

Диссоциированную культуру астроцитов получали из 1-дневных, а нейронов мозжечка – из 7-дневных крыс, методом ферментно-механической диссоциации по ранее описанной методике [11, 12]. Выделенные структуры промывали фосфатным буфером (Gibco Life Technologies, США), лишенным ионов кальция и магния, измельчали скальпелем и инкубировали 15 мин при 37°C в 0.05%-ном растворе трипсина и 0.02%-ном растворе ЭДТА (Gibco Life Technologies, США), промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой и диссоциировали механически ступенчатым пипетированием в среде культивирования. Суспензию клеток центрифугировали 3 мин при 1000 об./мин, осадок ресуспендировали в питательной среде и высаживали на культуральный пластик, покрытый полилизином (Sigma, США). Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла (MEM Gibco, Великобритания), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hy Clone, Великобритания), 2 мМ глутамакса (Gibco, Великобритания), 10 мМ буфера HEPES (Sigma, США). После образования монослоя эндотелиальные и астроцитарные культуры пересаживали в 96-луночные пластиковые планшеты (Eppendorf, Германия) и работали на 1 пассаже после образования монослоя. Культивированные нейроны мозжечка высаживали сразу в 96-луночные пластиковые планшеты (Eppendorf, Германия): в каждую лунку добавляли по 0.1 мл суспензии клеток, создавая конечную плотность 3–5 × 10^3 клеток на мм^2. На 2-е сутки *in vitro* концентрацию KCl в среде доводили до 25 мМ, что является трофическим фактором для данного вида

культур [13]. Для предотвращения пролиферации клеток глии в среду добавляли 0.001 мМ цитозин-арабинозида.

Временной паттерн экспериментов в работе обусловлен временем развития культур – достижения монослоя астроцитами или эндотелиальными клетками, созревания рецепторов нейронов. Эксперименты на культивированных нейронах проводили на 7-й день. Культуры развивались в CO_2-инкубаторе (“Nuaire”, 5% CO_2, 95% воздуха), при температуре 35.5°С и относительной влажности 98%.

Культуры подвергали окислительному стрессу, который индуцировали добавлением в питательную среду менадиона (витамин К3, 2.5–50 мкМ, 24 ч, Sigma, США), а воспаление вызывали липополисахаридом (5–30 мкМ, 24 ч, ЛПС, Sigma, США). Прижизненные наблюдения за состоянием культур проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии, используя инвертированный микроскоп “Olympus CKX41” (Япония) или систему визуализации изображения “EVOS M7000” (Termo Fisher Scientific, США). Уровень оксида азота определяли методом Грисса (Sigma-Aldrich, США), основанном на получении диазосоединений, которые в результате реакции с альфа-нафтиламином окрашивают раствор в красный цвет. Фотометрию выполняли с помощью микропланшетного сканера (SpectraMax M2, Molecular Devices, США) при 540 нм. Выявление морфологии митохондрий проводили при окраске эфиром тетраметилродамина (ТМРЭ, 250 нМ, 15 мин, Sigma, США) с помощью конфокального микроскопа Olympus IX71 (Япония) со встроенными спиннинг-диском, объективом ×100 и лазером OBIS (США), управляемого программой Coherent Connection 3. Флуоресцентные изображения клеток были сделаны с излучением при 590 нм и возбуждением при 560 нм. Для этих экспериментов клетки культивировались на чашках Петри со стеклянным дном диаметром 35 × 10 мм (Eppendorf, Германия).

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 13.3 (StatSoft, Inc), однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с посттестом Dunnett при сравнении с контролем или Bonferroni при попарном сравнении. Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты выражали как среднее с ошибкой среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для моделирования процесса воспаления в среду культивирования астроцитов, клеток эндотелия и зернистых нейронов мозжечка на 24 ч вносили ЛПС. Результаты экспериментов показали, что по сравнению с контролем во всех культурах данное воздействие вызывало достоверное повышение продукции оксида азота при всех использованных концентрациях (рис. 1). Наибольший эффект был показан для культивированных астроцитов, в которых ЛПС в концентрации 5 мкг/мл вызывал увеличение продукции оксида азота более чем в 8 раз (рис. 1). В культурах зернистых нейронов данное воздействие вызывало увеличение продукции оксида азота почти в 5 раз (рис. 1) при такой же концентрации ЛПС. Самый слабый ответ на стимуляцию продукции клетками оксида азота был показан для клеток эндотелия. Продукция оксида азота в этом случае возрастала только в 1.7 раза (рис. 1). Следовательно, для стимуляции выраженного роста оксида азота во всех типах культур достаточно использовать ЛПС в концентрации 5 мкг/мл.

Известно, что воспалительный процесс сопровождается повышением уровня лактата. В последующих экспериментах вместе с ЛПС (5 мкг/мл, 24 ч) в среду культивирования астроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток вносили 5 мМ лактата натрия. Однако достоверного влияния лактата на продукцию оксида азота во всех типах культур не было обнаружено, как в контроле, так и во время действия ЛПС (рис. 2).

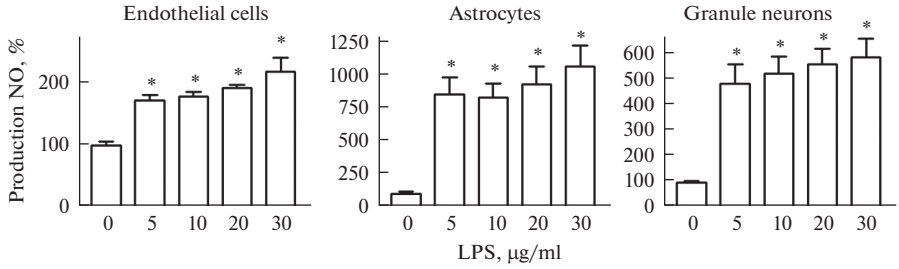

Рис. 1. Интенсивность выработки оксида азота в культивированных эндотелиальных клетках (Endothelial cells), астроцитах (Astrocytes) и зернистых нейронах (Granule neurons) при стимуляции воспаления липополисахаридом (LPS). По оси абсцисс отложена концентрация липополисахарида в мкг в мл среды культивирования. По оси ординат – продукция оксида азота (Production NO) в процентах относительно контроля. * $p < 0.01$ по сравнению с контролем (0).

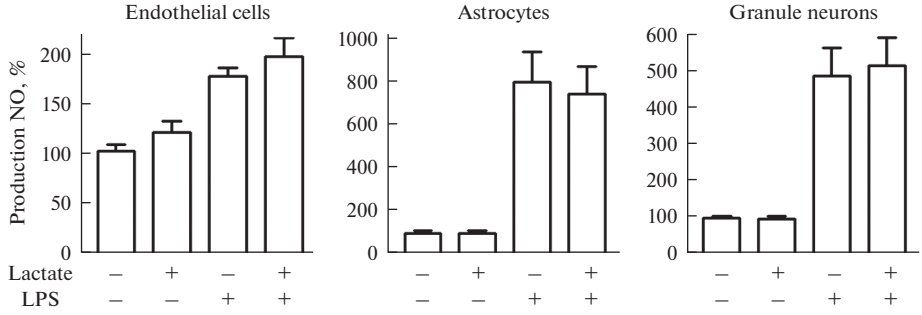

Рис. 2. Интенсивность выработки оксида азота в культивированных эндотелиальных клетках (Endothelial cells), астроцитах (Astrocytes) и зернистых нейронах (Granule neurons). По оси ординат отложена продукция оксида азота (Production NO) в процентах относительно исходного уровня. На оси абсцисс отмечено наличие добавок в среде культивирования: отсутствие (–), при добавлении лактата (5 мМ, Lactate, +) или липополисахарида (LPS, 5 мкг/мл, +).

Для индукции окислительного повреждения в среду культивирования вносили менадион (VK3) на 24 ч. Результаты экспериментов показали, что 10 мкМ менадиона было уже достаточно для полной гибели всех зернистых нейронов в культурах (рис. 3). В норме (Control) зернистые нейроны легко идентифицировать прижизненно как небольшие, 7–10 мкм в диаметре, округлые или овальные клетки, большую часть тел которых занимает ядро, окруженное тонким ободком цитоплазмы. При токсическом воздействии первоначально происходит отек цитоплазмы, в дальнейшем – конденсация хроматина ядра и лизис клетки, которая погибает с образованием пикнотического ядра (3–4 мкм). Пикнотические ядра погибших нейронов видны при фазовом контрасте на правой части рис. 3 как яркие точки.

Клетки эндотелия и астроциты оказались значительно более устойчивы к окислительному стрессу. Это довольно крупные распластанные по субстрату клетки, образующие монослой. Повреждение клеток в этих культурах наблюдалось только при повышении концентрации менадиона до 50 мкМ. В таких условиях снижается распластанность клеток, и они сжимаются, некоторые клетки ошариваются и, в конечном итоге, их ядра становятся пикнотическими (правые микрофотографии на рис. 3).

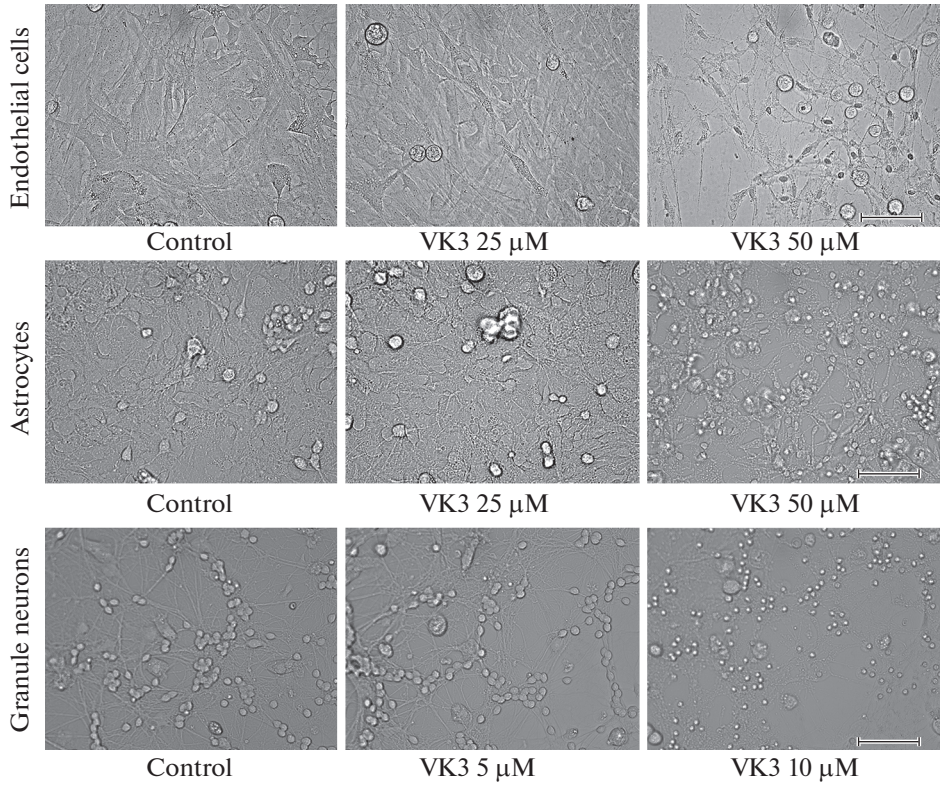

Рис. 3. Влияние менадиона (VK3, 24 ч) на жизнеспособность культивированных эндотелиальных клеток (Endothelial cells), астроцитов (Astrocytes) и зернистых нейронов (Granule neurons). Фазовый контраст. Живые культуры. Масштабный отрезок 70 мкм.

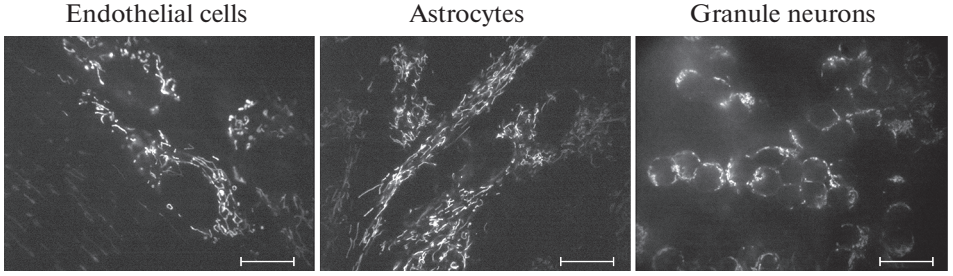

Рис. 4. Морфология митохондрий в культивированных эндотелиальных клетках (Endothelial cells), астроцитах (Astrocytes) и зернистых нейронах (Granule neurons). Флуоресцентная микроскопия живых культур, окрашенных ТМРЭ. Масштабный отрезок 15 мкм.

Оценка митохондриона в интактных клетках контрольных культур показала, что в астроцитах и эндотелии митохондрии многочисленны и представляют собой длинные изогнутые тяжи, тогда как в зернистых нейронах эти органеллы гораздо мельче по размеру, вблизи ядра округлые, палочковидные в отростках, и не обладают нитевидной морфологией, как в астроцитах и эндотелии (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В головном мозге существует тесная функциональная связь капилляров с функциональной нагрузкой нейронов и глиальных клеток, что позволяет рассматривать их как единый структурно-функциональный комплекс – нейроваскулярную единицу [1]. Даже незначительные нарушения в нейроваскулярной единице могут в некоторых случаях необратимо повлиять на гомеостаз головного мозга. В настоящее время показано, что астроциты являются ключевыми посредниками в системе модуляции сосудистого тонуса головного мозга. Одним из механизмов этого сигналинга при стимуляции нейронов является высвобождение астроцитами АТФ и ее метаболитов, способствующих выработке эндотелиального оксида азота и расширению сосудов [14]. Кинетика и эффективность этих сигналов, в свою очередь, определяются метаболическим состоянием ткани, уровнем тонуса базальных артериол и/или величиной и типом вызванного стимула [15]. Возможно и самостоятельное участие нейронов в гиперемии. Например, внутри нейрона, активированного глутаматом, усиливаются синтез и выделение во внеклеточную среду оксида азота, а также АТФ и аденозина, которые могут прямо воздействовать на гладкомышечные клетки [16]. Таким образом, в нейроваскулярной единице при стимуляции нейронов главными продуцентами оксида азота являются клетки эндотелия и нейроны, но не астроциты. Однако известно, что астроциты и клетки эндотелия при стимуляции ЛПС могут продуцировать оксид азота [17–19]. Полисахаридная модель является наиболее характеризованной моделью воспаления *in vitro*, в которой в ряде первичных культур медиатором воспаления является оксид азота. В нашей работе мы показали, что при стимуляции ЛПС именно астроциты гораздо более интенсивно продуцируют оксид азота по сравнению с клетками эндотелия и нейронами. Полученные нами результаты подтверждаются данными Wong с соавт. [17], которые демонстрируют, что первичные культуры клеток эндотелия мозга при стимуляции ЛПС продуцируют низкий уровень оксид азота.

Таким образом, наше исследование указывает, что при патологических воспалительных процессах в нейроваскулярной единице одним из главных продуцентов оксида азота являются астроциты, но не клетки эндотелия и нейроны. Это заключение подтверждается тем, что астроциты считаются одними из ключевых фигур в инициировании воспалительной реакции в головном мозге. Эти клетки ЦНС могут повлиять на локальную микросреду и, таким образом, определить степень повреждения и последующего восстановления [20].

Кроме того, известно, что воспалительный процесс сопровождается повышением уровня лактата [21]. Лактат, будучи продуктом гликолиза, выполняет свои функции не только в качестве энергетического субстрата для нейронов, но может осуществлять и некоторые другие функции. Так, лактат, посредством взаимодействия с рецептором HCAR1 на клетках церебрального эндотелия, способен вызывать ингибирование процессов воспаления [22]. Снижение экспрессии рецепторов и транспорта лактата на церебральных эндотелиоцитах и сопутствующее повышение концентрации внеклеточного лактата регистрируются в первичной культуре клеток эндотелия микрососудов головного мозга под воздействием ЛПС и PolyI:C [23]. Однако в нашей модельной системе мы не обнаружили влияния лактата на продукцию оксида азота клеточными культурами астроцитов, эндотелия и нейронов.

Еще одним патогенетически значимым фактором, способным нарушать функционирование нейроваскулярной единицы, является окислительный стресс. Поэтому в ряде экспериментов мы оценивали устойчивость к этому повреждению элементов нейроваскулярной единицы. Одним из главных источников свободных радикалов в клетке являются митохондрии. Комплексы I и III дыхательной цепи митохондрий продуцируют радикалы в виде супероксид-аниона и перекиси водо-

рода, которые играют роль сигнальных молекул, необходимых для дифференцировки клеток, пролиферации, их выживания и адаптивных иммунных реакций. Почти все образующиеся анионы супероксида эффективно нейтрализуются супероксиддисмутазой с образованием перекиси водорода, которая служит важным предшественником для других свободных радикалов и действует как вторичный посредник со способностью диффундировать через митохондриальную мембрану, взаимодействуя со специализированным белком из семейства аквапоринов [24]. Однако в поврежденных митохондриях продукция свободных радикалов может многократно возрастать, вызывая повреждение клетки. Моделировать этот процесс можно с помощью менадиона. Внутри клетки менадион вызывает окислительный стресс за счет способности принимать электроны от DT-диафоразы, минуя комплекс I, что перенаправляет поток электронов от NADH непосредственно в Q-цикл [25], тем самым повышая утечку электронов с цепи переноса, и как следствие, наблюдается возрастание продукции супероксид-аниона. По данным Bayol-Denizot с соавт. [26], нейроны продуцируют достоверно меньше супероксида при действии менадиона по сравнению с эндотелиальными клетками, тогда как астроциты и эндотелий продуцируют приблизительно одинаковое количество супероксида. Так как продукция супероксида при метаболизме менадиона осуществляется митохондриями, уровень генерации этих активных молекул коррелируют с величиной митохондриона в клетках и уровнем мембранного потенциала митохондрий. По приведенным нами в этой работе данным митохондрион имеет наименьшую величину в нейронах и гораздо большие размеры в астроцитах и эндотелиальных клетках (рис. 4). По сравнению с периферическими сосудами для клеток эндотелия головного мозга характерно большое количество и высокая активность митохондрий. Видимо, это необходимо, чтобы функционировали многочисленные системы активного транспорта, такие как GLUT1, P-гликопротеин и т.д. [27]. Однако наиболее чувствительными к окислительному стрессу, вызванному менадионом, оказались нейроны. Результаты экспериментов показали, что 10 мкМ менадиона было уже достаточно для гибели всех зернистых нейронов в культурах, тогда как повреждение клеток эндотелия и астроцитов наблюдалось при повышении концентрации менадиона до 50 мкМ.

Повышенная чувствительность к окислительному стрессу, вызванному менадионом, зернистых нейронов объясняется тем, что они являются глутаматергическими и глутаматчувствительными нейронами (имеют рецепторы к этому нейромедиатору). Окислительный стресс, в свою очередь, приводит к высвобождению эндогенного глутамата, чрезмерной стимуляции рецепторов глутамата и гибели нейронов [28]. Более того, окислительный стресс, вызванный паракватом, является сильным фактором, модулирующим повреждение незрелых нейронов глутаматом [29].

В целом, в нейроваскулярной единице головного мозга при развитии нейровоспаления главными продуцентами оксида азота являются астроциты, а наиболее чувствительными к окислительному стрессу, несмотря на относительно слабое развитие митохондриона, являются нейроны, при этом клетки церебрального эндотелия демонстрируют минимальный вклад в продукцию оксида азота.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено по плановым темам ФГБНУ Научного центра неврологии и ФГБОУВО МГУ им. М.В. Ломоносова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.К.И. и Е.В.С.), выращивание культур, проведение экспериментов, сбор и первичный анализ данных (Е.В.С., М.Р.К., Н.А.Р., О.П.А., В.В.О., Е.Е.Г., С.В.Н., Н.К.И.), обработка и анализ данных (Н.К.И.), написание и редактирование манускрипта (Н.К.И. и Е.В.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Peters APS, Webster HD* (1991) The Fine Structure of the Nervous System. New York: Oxford Univer Press 1991.
2. *Schaeffer S, Iadecola C* (2021) Revisiting the neurovascular unit. Nat Neurosci 24(9): 1198–1209. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00904-7
3. *Dobrynina LA* (2018) Neurovascular coupling and cerebral perfusion in aging, cerebral microangiopathy and Alzheimer's diseases. Ann Clin Exp Neurol 12(5): 87–94. https://doi.org/10.25692/ACEN.2018.5.11
4. *Han HS, Suk K* (2005) The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. Curr Neurovasc Res 2(5): 409–423. https://doi.org/10.2174/156720205774962647
5. *Tricoire L, Vitalis T* (2012) Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: a journey from birth to neuronal circuits. Front Neural Circuits 6: 82. https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00082
6. *Buskila Y, Farkash S, Hershfinkel M, Amitai Y* (2005) Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. Glia 52(3): 169–176. https://doi.org/10.1002/glia.20217
7. *Ko AR, Kim JY, Hyun HW, Kim JE* (2015) Endothelial NOS activation induces the blood-brain barrier disruption via ER stress following status epilepticus. Brain Res 1622: 163–173. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.06.020
8. *Salmina AB, Komleva YK, Szijártó IA, Gorina YV, Lopatina OL, Gertsog GE, Filipovic MR, Gollasch M* (2015) H2S- and NO-Signaling Pathways in Alzheimer's Amyloid Vasculopathy: Synergism or Antagonism? Front Physiol 6: 361. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00361
9. *Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ* (2019) Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1865(8): 1949–1967. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.007
10. *Liu Y, Xue Q, Tang Q, Hou M, Qi H, Chen G, Chen W, Zhang J, Chen Y, Xu X* (2013) A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. Microvasc Res 90: 199–205. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004
11. *Weikert S, Freyer D, Weih M, Isaev N, Busch C, Schultze J, Megow D, Dirnagl U* (1997) Rapid Ca^{2+}-dependent NO-production from central nervous system cells in culture measured by NO-nitrite/ozone chemoluminescence. Brain Res 748(1–2): 1–11. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01241-3
12. *Stelmashook EV, Novikova SV, Isaev NK* (2010) Glutamine effect on cultured granule neuron death induced by glucose deprivation and chemical hypoxia. Biochemistry (Mosc) 75(8): 1039–1044. https://doi.org/10.1134/s0006297910080134
13. *Favaron M, Manev RM, Rimland JM, Candeo P, Beccaro M, Manev H* (1993) NMDA-stimulated expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule neurones. Neuroreport 4(10): 1171–1174. PMID: 8106000
14. *Toth P, Tarantini S, Davila A, Valcarcel-Ares MN, Tucsek Z, Varamini B, Ballabh P, Sonntag WE, Baur JA, Csiszar A, Ungvari Z* (2015) Purinergic glio-endothelial coupling during neuronal activity: role of P2Y1 receptors and eNOS in functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. Am J Physiol Heart Circ Physiol 309(11): H1837–H1845. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00463.2015
15. *McConnell HL, Li Z, Woltjer RL, Mishra A* (2019) Astrocyte dysfunction and neurovascular impairment in neurological disorders: Correlation or causation? Neurochem Int 128: 70–84. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.005
16. *Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV* (2017) Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. Nat Rev Neurosci 18(7): 419–434. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48
17. *Wong D, Dorovini-Zis K, Vincent SR* (2004) Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. Exp Neurol 190(2): 446–455. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.08.008

18. *Cantarella G, Lempereur L, D'Alcamo MA, Risuglia N, Cardile V, Pennisi G, Scoto GM, Bernardini R* (2007) Trail interacts redundantly with nitric oxide in rat astrocytes: potential contribution to neurodegenerative processes. J Neuroimmunol 182(1–2): 41–47.
https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.09.007
19. *Arias-Salvatierra D, Silbergeld EK, Acosta-Saavedra LC, Calderon-Aranda ES* (2011) Role of nitric oxide produced by iNOS through NF-κB pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. Cell Signal 23(2): 425–435.
https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.017
20. *Karve IP, Taylor JM, Crack PJ* (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. Br J Pharmacol 173(4): 692–702.
https://doi.org/10.1111/bph.13125
21. *Shih MT, Singh AK, Wang AM, Patel S* (2004) Brain lesions with elevated lactic acid peaks on magnetic resonance spectroscopy. Curr Probl Diagn Radiol 33(2): 85–95.
https://doi.org/10.1016/j.cpradiol.2003.11.002
22. *Boitsova EB, Morgun AV, Osipova ED, Pozhilenkova EA, Martinova GP, Frolova OV, Olovannikova RY, Tohidpour A, Gorina YV, Panina YA, Salmina AB* (2018) The inhibitory effect of LPS on the expression of GPR81 lactate receptor in blood-brain barrier model in vitro. J Neuroinflammat 15(1): 196.
https://doi.org/10.1186/s12974-018-1233-2
23. *Бойцова ЕБ, Моргун АВ, Осипова ЕД, Мартынова ГП, Салмина АБ* (2020) Изменение рецепции и транспорта лактата церебральным эндотелием под воздействием индуктора вирусного и бактериального воспаления *in vitro*. Фундамент клин мед 5(1): 8–14. [*Boytsova EB, Morgun AV, Osipova ED, Martinova GP, Salmina AB* (2020) Change of reception and lactate transport by cerebral endothelium under the influence of viral and bacterial inflammation *in vitro*. Fundament Clin Med 5(1): 8–14. (In Russ)].
https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-1-8-14
24. *Rinaldi C, Donato L, Alibrandi S, Scimone C, D'Angelo R, Sidoti A* (2021) Oxidative Stress and the Neurovascular Unit. Life (Basel) 11(8): 767.
https://doi.org/10.3390/life11080767
25. *Isaev NK, Stelmashook EV, Ruscher K, Andreeva NA, Zorov DB* (2004) Menadione reduces rotenone-induced cell death in cerebellar granule neurons. Neuroreport 15(14): 2227–2231.
https://doi.org/10.1097/00001756-200410050-00017
26. *Bayol-Denizot C, Daval JL, Netter P, Minn A* (2000) Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurones. Biochim Biophys Acta 1497(1): 115–126.
https://doi.org/10.1016/s0167-4889(00)00047-1
27. *Huang X, Hussain B, Chang J* (2021) Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. CNS Neurosci Ther 27(1): 36–47.
https://doi.org/10.1111/cns.13569
28. *Stelmashook EV, Genrikhs EE, Aleksandrova OP, Amelkina GA, Zelenova EA, Isaev NK* (2016) NMDA-Receptors Are Involved in $Cu2^{+}$/Paraquat-Induced Death of Cultured Cerebellar Granule Neurons. Biochemistry (Mosc) 81(8): 899–905.
https://doi.org/10.1134/S0006297916080113
29. *Stelmashook EV, Isaev NK, Zorov DB* (2007) Paraquat potentiates glutamate toxicity in immature cultures of cerebellar granule neurons. Toxicol Lett 174(1–3): 82–88.
https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.012

Effect of the Neuroinflammation Inducer on the Components of the Neurovascular Unit of the Brain *in vitro*

E. V. Stelmashook[a], M. R. Kapkaeva[a], N. A. Rozanova[a], O. P. Alexandrova[a], E. E. Genrikhs[a], V. V. Obmolov[a, b], S. V. Novikova[a], and N. K. Isaev[a, b, *]

[a] *Research Center of Neurology, Moscow, Russia*
[b] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*
**e-mail: nisaev61@mail.ru*

There is a close connection of the brain capillaries with the functional load of neurons and glial cells, which allows us to consider them as a single structural and functional complex – a neurovascular unit. The effect of lipopolysaccharide (LPS, 5–30 μg/mL, 24h) on the production of nitric oxide and the effect of menadion (5–50 μgM, 24 h) on cell viability in cultures of granule neurons, endothelial cells of the cerebral cortex and astrocytes was studied, mitochondrion in different cell types was evaluated. It was found

that already 5 μg/mL of LPS caused intensive production of nitric oxide in cell cultures. The greatest effect was shown for astrocytes, in which LPS caused an increase in nitric oxide production by more than 8 times. In cultures of granular neurons, this effect caused an increase in nitric oxide production by almost 5 times. The weakest response to stimulation of nitric oxide production by cells was shown for endothelial cells. In this case, the production of nitric oxide increased only 1.7 times. To induce oxidative damage, menadion was introduced into the culture medium. In neuronal cultures, 10 μM of menadion was already enough for the complete death of granular neurons. Damage to endothelial cells and astrocytes was observed only when the concentration of menadion increased to 50 μM. Since oxidative stress under the action of menadion is mediated by mitochondria, an assessment of the mitochondrion in intact cells was performed. It has been shown that in astrocytes and endothelium, mitochondria are numerous and represent long curved strands, whereas in granular neurons these organelles are much smaller in size, rounded in shape. Thus, our results indicate that in neuroinflammation, astrocytes are the main producers of nitric oxide, and neurons are the most sensitive to oxidative stress, despite the relatively weak development of the mitochondrion, whereas brain microvessel endothelial cells do not contribute significantly to the production of nitric oxide within the neurovascular unit.

Keywords: endotheliocyte, astrocyte, granule neuron, lipopolysaccharide, menadion, mitochondria