

Влияние FTY720 на липиды, церамид, TNF α мозга при острой церебральной ишемии у крыс

П. Н. Герасимов^{1,2*}, И. Г. Брындына¹

¹ Ижевский государственный медицинский университет, Россия, 426034, республика Удмуртия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281, к. 2

² Многопрофильный медицинский центр «Больница для всей семьи», Россия, 426000, республика Удмуртия, г. Ижевск, Широкий пер., д. 38а

Для цитирования: П. Н. Герасимов, И. Г. Брындына. Влияние FTY720 на липиды, церамид, TNF α мозга при острой церебральной ишемии у крыс. *Общая реаниматология*. 2026; 22 (2): 29–37. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2026-2-2649> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Павел Николаевич Герасимов, machaon20@yahoo.com

Резюме

Модуляция рецепторов сфингозин-1-фосфата оказывает разнообразные нейропротективные эффекты в условиях церебральной ишемии. В настоящей работе исследовали взаимосвязь между липидным составом мозговой ткани, липидным сигналингом и содержанием провоспалительного цитокина TNF α , а также экспрессией его рецептора TNFR1.

Цель. На модели острой церебральной ишемии у крыс оценить влияние FTY720 на липидный состав мозговой ткани, концентрацию церамида и экспрессию основных ферментов, участвующих в его образовании, а также на содержание TNF α и его рецептора TNFR1.

Материалы и методы. Исследование провели на 37 самцах белых нелинейных крыс массой 180–230 г. Острую ишемию головного мозга моделировали методом комбинированной необратимой перевязки левой общей сонной артерии и обратимой перевязки правой общей сонной артерии. Животных разделили на три группы: ложнооперированные, с острой церебральной ишемией и с ишемией при предварительном введении FTY720 (финголимода). На 3-й день наблюдения у выживших животных оценивали неврологический дефицит по шкале Гарсия. Сфинголипидный и фосфолипидный состав ткани мозга исследовали методом тонкослойной хроматографии. Концентрацию церамида, экспрессию ферментов его биосинтеза, TNF α и TNFR1 определяли с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии.

Результаты. Предварительное введение финголимода сопровождалось большей выживаемостью животных: 31% в группе FTY720 vs 20% в группе Ишемия ($p=0,043$). Функциональные нарушения по шкале Гарсия были значительно менее выражены в группе FTY720, чем в группе Ишемия: 14 [13,5; 15] vs 11 [10; 12,5] баллов ($Me [Q1; Q3]$, $p < 0,01$). В группе FTY720 выявили снижение концентрации церамида в ткани мозга по сравнению с группой Ишемия ($p=0,0005$), подавление экспрессии ферментов его синтеза — aSMase ($p=0,0012$), nSMase ($p=0,0003$), SPT ($p=0,0002$) и CerS ($p=0,0001$), а также снижение концентрации провоспалительного цитокина TNF α ($p=0,0003$) и нормализацию экспрессии его рецептора TNFR1.

Закключение. Сохранение фосфолипидного состава мозговой ткани, снижение чрезмерного образования церамида и провоспалительных цитокинов сопровождается менее выраженным неврологическим дефицитом и повышенной выживаемостью крыс в острый период церебральной ишемии.

Ключевые слова: FTY720; церамид; TNF α ; TNFR1; церебральная ишемия; фосфолипиды; сфинголипидный сигналинг

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The Effect of FTY720 on Brain Lipids, Ceramide, and TNF- α in Acute Cerebral Ischemia in Rats

Pavel N. Gerasimov^{1,2*}, Irina G. Bryndina¹

¹ Izhevsk State Medical University, 281 Kommunarov Str., Bldg 2, 426034 Izhevsk, Republic of Udmurtia, Russia

² Multidisciplinary medical center «Hospital for the whole family», 38a Shirokiy lane, 426000 Izhevsk, Republic of Udmurtia, Russia

Summary

Modulation of sphingosine-1-phosphate receptors exerts various neuroprotective effects under conditions of cerebral ischemia. In this study, we investigated the relationship between the lipid composition of brain tissue, lipid signaling, and the content of the proinflammatory cytokine TNF α , as well as the expression of its receptor, TNFR1.

Objective. In a rat model of acute cerebral ischemia, to evaluate the effects of FTY720 on the lipid composition of brain tissue, ceramide concentration, and the expression of key enzymes involved in its synthesis, as well as on the contents of TNF- α and its receptor TNFR1.

Materials and Methods. The study was conducted on 37 male white non-linear rats weighing 180–230 g. Acute cerebral ischemia was induced by a combined procedure involving irreversible ligation of the left common carotid artery and reversible ligation of the right common carotid artery. The animals were divided into three groups: sham-operated, rats with acute cerebral ischemia, and rats with ischemia following prior administration of FTY720 (fingolimod). On the third day of observation, neurological deficits in surviving animals were assessed using the Garcia scale. The sphingolipid and phospholipid composition of brain tissue was examined using thin-layer chromatography. Ceramide concentration, the expression of enzymes involved in its biosynthesis, TNF α , and TNFR1 concentrations were evaluated using immunofluorescent microscopy.

Results. Pretreatment with fingolimod was associated with better survival rates: 31% in the FTY720 group vs. 20% in the Ischemia group ($p=0.043$). Functional impairments on the Garcia scale were significantly less severe in the FTY720 group than in the Ischemia group: 14 [13.5; 15] vs. 11 [10; 12.5] scores ($Me [Q1; Q3]$, $p<0.01$). FTY720 group also demonstrated a decrease in ceramide concentration in the brain tissue compared to the Ischemia group ($p=0.0005$), along with downregulated expression of aSMase ($p=0.0012$), nSMase ($p=0.0003$) enzymes involved in its synthesis, of SPT ($p=0.0002$), and CerS ($p=0.0001$), a decrease in pro-inflammatory cytokine TNF α ($p=0.0003$) concentration and normalized expression of its receptor TNFR1.

Conclusion. Preservation of phospholipid composition and reduction in the excessive production of ceramide and pro-inflammatory cytokines in the brain tissue are associated with less severe neurological deficits and improved survival rates in rats during the acute phase of cerebral ischemia.

Keywords: FTY720; ceramide; TNF α ; TNFR1; cerebral ischemia; phospholipids; sphingolipid signaling

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Информация об авторах / Information about the authors:

Павел Николаевич Герасимов / Pavel N. Gerasimov: <https://orcid.org/0009-0003-9414-2711>

Ирина Георгиевна Брындина / Irina G. Bryndina: <https://orcid.org/0000-0003-4099-4508>

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Нейрональное воспаление при острой ишемии головного мозга развивается в течение нескольких минут после начала повреждения и характеризуется активацией резидентных иммунных клеток (астроцитов и микроглии), инфильтрацией ткани мозга периферическими иммунными клетками, высвобождением провоспалительных цитокинов, хемокинов и активных форм кислорода, а также миграцией эффекторных Т-клеток [1].

Существуют данные о роли сфингозин-1-фосфатного (S1P) механизма в нейропротекции при ишемии. S1P образуется под действием сфингозинкиназ SphK1 и SphK2, а неселективный модулятор S1P-рецепторов финголимод (FTY720) проявляет нейропротективную активность, влияя на нейрональное воспаление [2]. Семейство S1P-рецепторов включает пять подтипов (S1P1–S1P5) с различными эффектами. Наиболее экспрессируемым является S1P1; его активация повышает концентрацию внутриклеточного кальция, запускает антиапоптотические механизмы, перестройку цитоскелета и клеточную миграцию [3]. FTY720 обладает высокой аффинностью к S1P1, и исследования на крысах показывают, что его применение снижает объем инфаркта, выраженность неврологического дефицита и апоптоз нейронов [4]. При этом некоторые данные свидетельствуют, что нейропротекторные свойства FTY720 могут быть связаны с ингибированием S1P1 [5].

Патогенетическая роль S1P1 при ишемии обусловлена, прежде всего, модуляцией нейронального воспаления: уменьшается образование провоспалительных цитокинов, актив-

ность микроглии, экспрессия MAPK и NF- κ B, а проницаемость гематоэнцефалического барьера снижается [6]. Подавление S1P2 уменьшает также объем инфаркта, отек головного мозга и проницаемость ГЭБ, вероятно, через влияние на матриксную металлопротеиназу-9 и миграцию прогениторных нейронов [7]. Ингибирование S1P3 сопровождается снижением клеточной инфильтрации и продукции провоспалительных медиаторов, синтезом противовоспалительных цитокинов и уменьшением активации микроглии [8]. Роль S1P4 и S1P5 изучена ограниченно, хотя известно, что активация S1P4 стимулирует миграцию нейтрофилов, а подавление S1P5 может повышать уровень провоспалительных цитокинов [9].

Биохимическим предшественником S1P является церамид. Провоспалительные медиаторы, гипоксия и окислительный стресс стимулируют образование церамида, который действует как проапоптотический сигнал, регулирует аутофагию, воспалительный ответ и дифференцировку клеток [10].

Описаны три основных механизма нейропротекции FTY720: взаимодействие с S1P рецепторами лимфоцитов, приводящий к лимфопении и снижению лимфоцитарной инфильтрации; взаимодействие с S1P рецепторами на нейронах, клетках микроглии, астроцитах, олигодендроцитах и эндотелиальных клетках; и рецептор-независимый механизм, при котором FTY720 связывается с внутриклеточными белками, модулируя сигнальные пути и эпигенетическую транскрипцию [11].

Цель исследования — изучить влияние FTY720 на выживаемость крыс, неврологиче-

ский дефицит животных, оценить фосфолипидный и сфинголипидный состав ткани мозга, концентрацию церамида и экспрессию ферментов его синтеза в катаболическом пути и пути «de novo», содержание цитокина TNF α и его рецептора TNFR1 на модели острой ишемии головного мозга.

Материал и методы

Работу провели на 37 самцах белых нелинейных крыс массой 180–230 г. Все процедуры с животными были одобрены локальным этическим комитетом Ижевского государственного медицинского университета (протокол 736/1 от 11.05.2022). Исследование выполнили в соответствии международными нормами (Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. N 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований»), рекомендациями ARRIVE 2.0, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, 2011) и Директивой 2010/63/EU, с соблюдением принципов 3R. Использовали адекватную анестезию и определяли гуманные конечные точки.

Моделирование острой ишемии головного мозга. Накануне операции животных оставляли без корма. Вмешательство выполняли в условиях строгой асептики. Анестезию проводили препаратом золазепам/тилетамин (Золетил 100, Virbac, Франция) в дозе 30 мг/кг массы тела. Операционное поле выбрасывали и обрабатывали 5% спиртовым раствором йода. На вентральной поверхности шеи выполняли срединный разрез, после чего послойно выделяли сонные артерии от окружающих мягких тканей и нервных структур. На обе сонные артерии свободно накладывали лигатуры. Левую сонную артерию лигировали, а на правую накладывали на 30 мин зажим типа «бульдог». По завершении манипуляций рану ушивали послойно, обработав ее 0,05% водным раствором хлоргексидина биглюконата [12].

Животных случайно распределяли на три группы. Первая группа (Ишемия) включала крыс, у которых моделировали острую церебральную ишемию. Из 85 прооперированных животных этой группы выжило 17, что соответствует 20% выживаемости. Во вторую группу (FTY720) входили животные, которым перед индукцией ишемии вводили финголимод (FTY720) в дозе 1 мг/кг массы тела. Из 35 животных второй группы выжило 11 (31% выживаемости). Третью группу составляли ложнооперированные животные (ЛО), у которых выполняли все этапы хирургического вмешательства без перевязки сонных артерий ($n=9$).

Финголимод вводили в дозе 1 мг/кг массы тела непосредственно перед моделированием острой ишемии. Выбор дозы и времени введения основан на данных систематических обзоров, демонстрирующих уменьшение объема ишемического очага, выраженности отека головного мозга и степени поведенче-

ского дефицита при использовании указанного режима введения [13].

На 3-и сутки проводили оценку выживаемости и неврологического статуса по шкале Гарсия [14], после чего животных выводили из эксперимента под общей анестезией.

Макроскопическая визуализация очага ишемии. Животное вводили в наркоз препаратом золазепам/тилетамин. После достижения необходимой глубины анестезии осуществляли доступ к сердцу и вводили канюлю в полость левого желудочка. Проводили системную перфузию 4% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида, приготовленным на фосфатно-солевом буферном растворе (PBS; состав, mM: 3,2 NaH₂PO₄, 0,5 K₂HPO₄, 1,3 KCl, 135 NaCl; pH 7,4). После декапитации извлекали головной мозг, фиксировали его в 10% растворе формалина, а по истечении 24 ч готовили коронарные срезы толщиной 1 мм.

Определение фосфолипидного и сфинголипидного состава ткани мозга. Ткань головного мозга гомогенизировали, после чего для полной экстракции липидов гомогенат выдерживали в смеси хлороформ/метанол в соотношении 2:1 по методу Фолча. Липидные фракции разделяли методом тонкослойной хроматографии в камерах, содержащих соответствующие системы растворителей. Для выделения фосфолипидных фракций применяли систему хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/дистиллированная вода (60:50:1:4), а для разделения сфинголипидов — систему бутанол/ледяная уксусная кислота/дистиллированная вода (3:1:1). Пробы наносили на хроматографические пластины фирмы Merck с УФ-меткой (TLC Silica gel 60 F254, 20 × 20 см). Липиды визуализировали в парах йода, а количественный анализ проводили с использованием денситометра «Сорбфил» [16].

Исследование методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Под общей анестезией препаратом золазепам/тилетамин проводили транскардиальную системную перфузию фосфатно-солевым буфером, после чего — фиксирующим раствором 4% параформальдегида, приготовленным на основе PBS. Головной мозг извлекали, помещали в 4% параформальдегид на 2 ч для дополнительной фиксации, затем в течение суток выдерживали в 30% растворе сахарозы и замораживали с использованием сухого льда.

На следующем этапе выполняли коронарные срезы головного мозга толщиной 14 мкм на криотоме HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific, USA). Полученные срезы фиксировали на предметных стеклах с адгезивным покрытием (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Срезы инкубировали в пермеабилзирующем растворе (1% раствор Тритон X-100 в PBS, содержащий 5% бычьего сывороточного альбумина) в течение 20 мин. Затем осуществляли инкубацию в растворе первичных антител: анти-TNFR1, анти-TNF α , анти-aSMase, анти-nSMase (моноклональные кроличьи IgG,

разведение 1:200, Affinity Biosciences) и анти-Cer (моноклональные мышиные IgG, 1:200, ALX-804-196-T050, Enzo Life Sciences, США), анти-SPT2, анти-CerS1 (кроличьи IgG, 1 : 200, Abcam) в присутствии 5% бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию проводили в течение суток. После промывки в PBS срезы выдерживали в растворах вторичных антител: антикроличьих Alexa Fluor 488 (goat IgG, 1:300, Abcam) и антимышиных Alexa Fluor 647 (goat IgG, 1:300, Abcam) в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях защиты от света [17].

Иммунофлуоресценцию на срезах мозга анализировали с использованием приставки DS-Fi3 EF-2E к микроскопу Nikon Eclipse E200, программного обеспечения NIS-Elements D (Nikon Instruments Inc., США) и ImageJ. Выраженность экспрессии рассчитывали по интенсивности флуоресценции на стандартной площади 0,1 мм².

Статистические данные анализировали с использованием пакета IBM SPSS Statistics 23, описывали в виде медианы и межквартильного размаха ($Me [Q1; Q3]$). Нормальность распределения оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. В связи с отклонением распределения показателей от нормального закона для межгруппового сравнения использовали непараметрические критерии. Для межгруппового сравнения трех независимых групп использовали H -критерий Краскела–Уоллиса. При выявлении статистически значимых различий проводили пост-хок анализ посредством попарного сравнения групп с использованием U -критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Для анализа различий частотных характеристик (долей выживших животных) между группами применяли точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Результаты представили в графической форме в виде диаграмм «ящик с усами» с обозначением уровня статистической значимости.

У животных, получавших FTY720 перед моделированием острой церебральной ишемии, наблюдали статистически значимо более высокий уровень выживаемости по сравнению с животными группы Ишемия: 31 и 20%, соответственно, $p = 0,043$.

Предварительное введение FTY720 способствовало также снижению неврологического дефицита. Функциональные нарушения по шкале Гарсия были значительно менее выражены в группе FTY720: медиана составила 14 баллов ($Me [Q1; Q3] = 14 [13,5; 15]$) vs 11 баллов ($Me [Q1; Q3] = 11 [10; 12,5]$) в группе Ишемия. При сравнении трех групп с использованием критерия Краскела–Уоллиса выявили статистически значимые различия ($p = 0,000008$). При последующем попарном сравнении групп с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони установили, что в группе FTY720 значения шкалы Гарсия были выше, чем в группе Ишемия ($p = 0,0019$). В группе ЛО неврологического дефицита не выявили.

На рис. 1, *a* представили показатели выживаемости, а на рис. 1, *b* — данные по неврологическому дефициту по шкале Гарсия. На рис. 1, *c* представили коронарные срезы переднего мозга крыс, окрашенные 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ). В нижнем ряду слева расположен срез мозга ложнооперированного (ЛО) животного: ткань равномерно окрашена в красный цвет, что отражает ее жизнеспособность и сохранение дегидрогеназной активности. На остальных срезах (верхний ряд и нижний ряд справа) визуализировали белые неокрашенные участки, соответствующие зоне ишемического повреждения, где произошла утрата ферментативной активности.

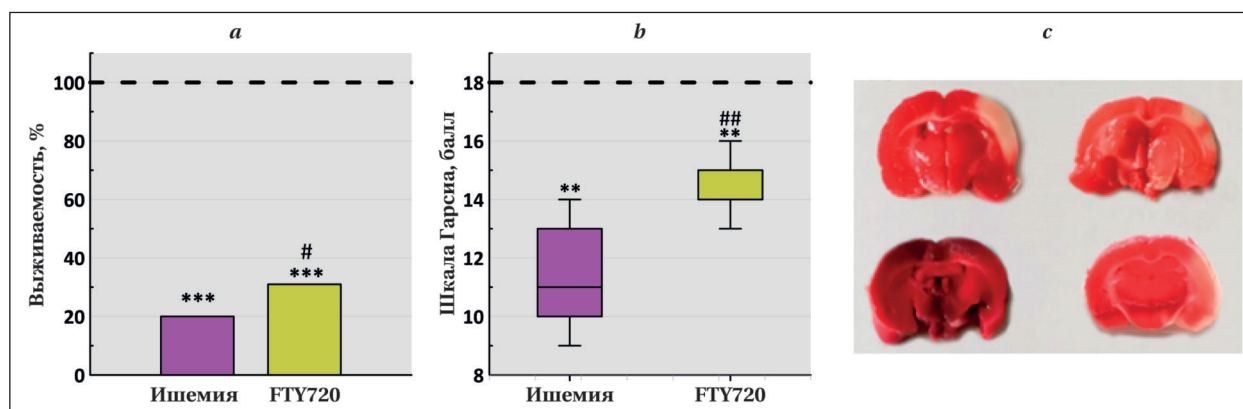


Рис. 1. Выживаемость (*a*), функциональный дефицит (*b*) и визуализация очага ишемии при окрашивании 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (*c*) при моделировании острой церебральной ишемии и ишемии на фоне введения FTY720. **Примечание.** Пунктирная линия отражает показатель группы ЛО. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$, — по сравнению с группой животных с ишемией.

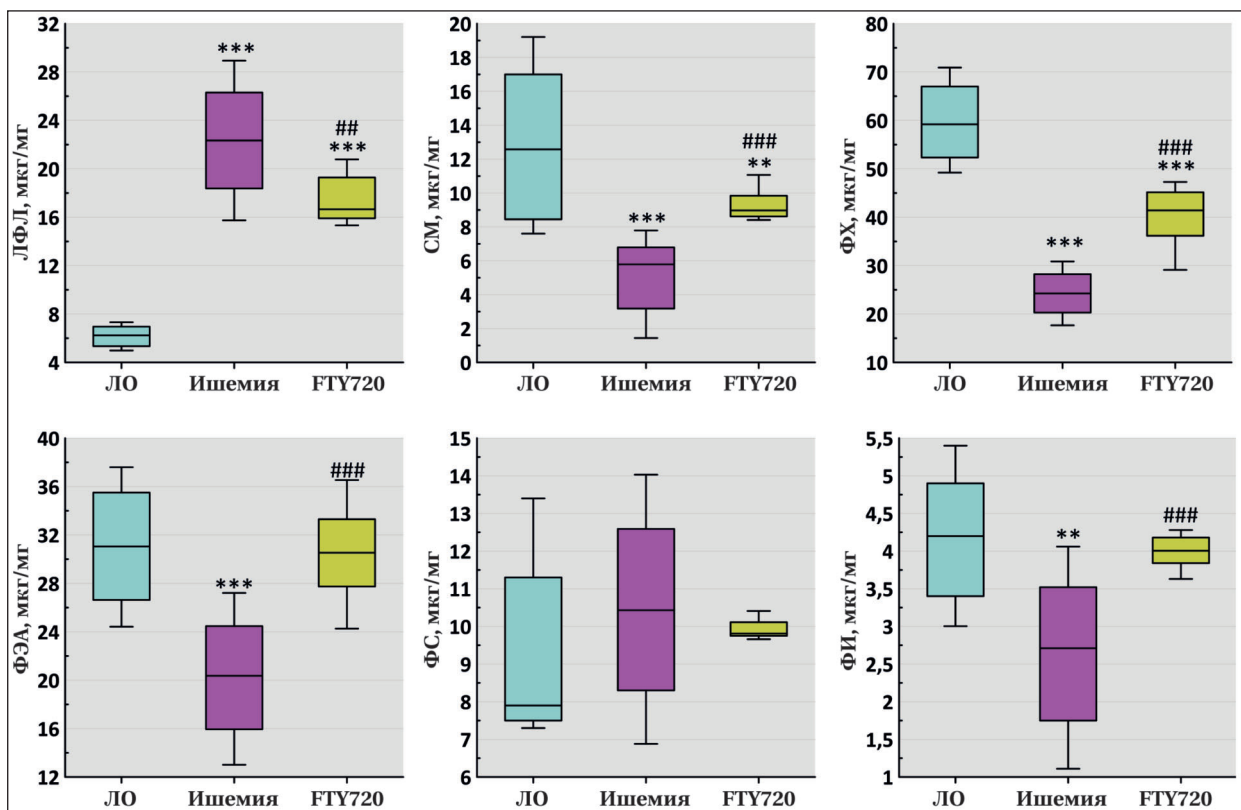


Рис. 2. Концентрации основных фракций фосфолипидов в исследуемых группах.

Примечание. ЛФЛ — лизофосфолипиды; СМ — сфингомиелин; ФХ — фосфатидилхолин; ФЭА — фосфатидилэтаноламин; ФС — фосфатидилсерин; ФИ — фосфатидилинозитол. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; # — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ — по сравнению с группой животных, не получавших FTY720.

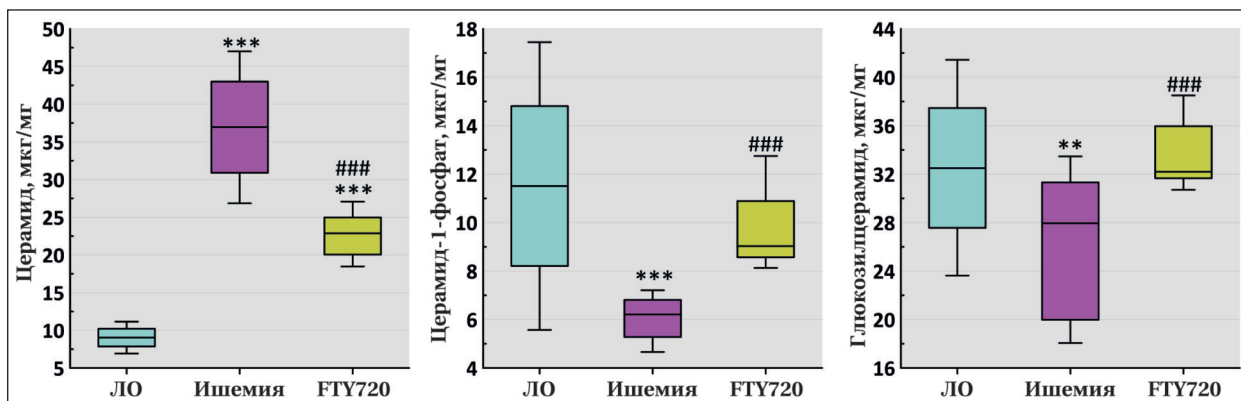


Рис. 3. Концентрация церамида и его метаболитов в исследуемых группах.

Примечание. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; ### — $p < 0,001$ — по сравнению с группой животных с ишемией.

На рис. 2 представили изменения фосфолипидного состава ткани головного мозга при острой церебральной ишемии. В условиях трехдневной ишемии наблюдали значительное снижение концентрации основных фосфолипидных фракций: фосфатидилэтаноламина (ФЭА) — на 34,9% ($p = 0,0002$), фосфатидилхолина (ФХ) — на 59,3% ($p = 0,0000012$). Также отмечали снижение концентрации сфингомиелина (СМ) на 60,2% ($p = 0,0003$) и фосфатидилинозитола (ФИ) на 37% ($p = 0,00012$). Одновременно происходила

кумуляция лизофосфолипидов (ЛФЛ), их концентрация увеличивалась в 3,79 раза ($p = 0,0002$).

У животных, получавших FTY720, концентрация СМ была в 1,9 раза выше ($p = 0,0004$), а ФХ — в 1,7 раза выше ($p = 0,0001$) по сравнению с группой животных с ишемией, однако эти показатели не достигали значений в группе ЛО. Концентрации ФЭА и ФИ в группе FTY720 увеличились в 1,5 раза ($p = 0,0002$ и $p = 0,001$, соответственно) и были сопоставимы с показателями группы ЛО.

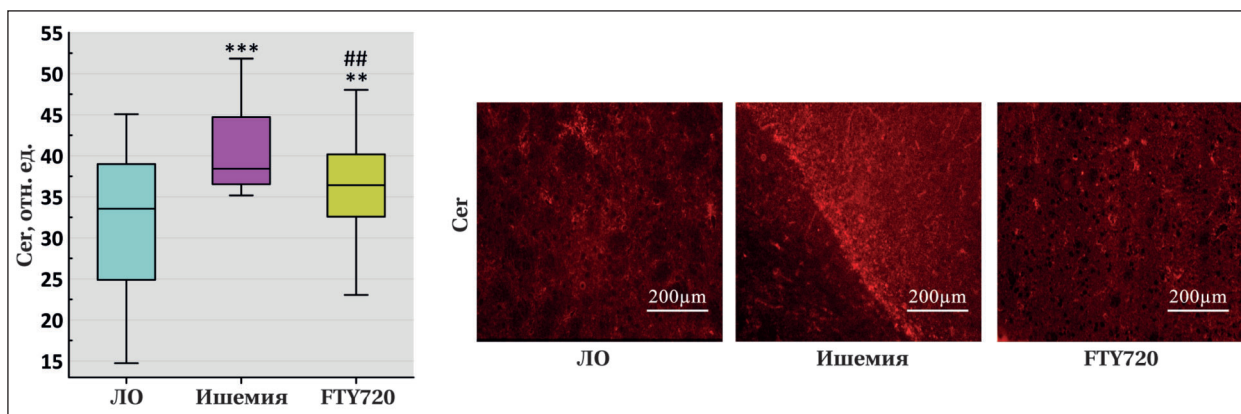


Рис. 4. Экспрессия церамида в исследуемых группах.

Примечание. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; ## — $p < 0,01$ — по сравнению с группой животных с ишемией.

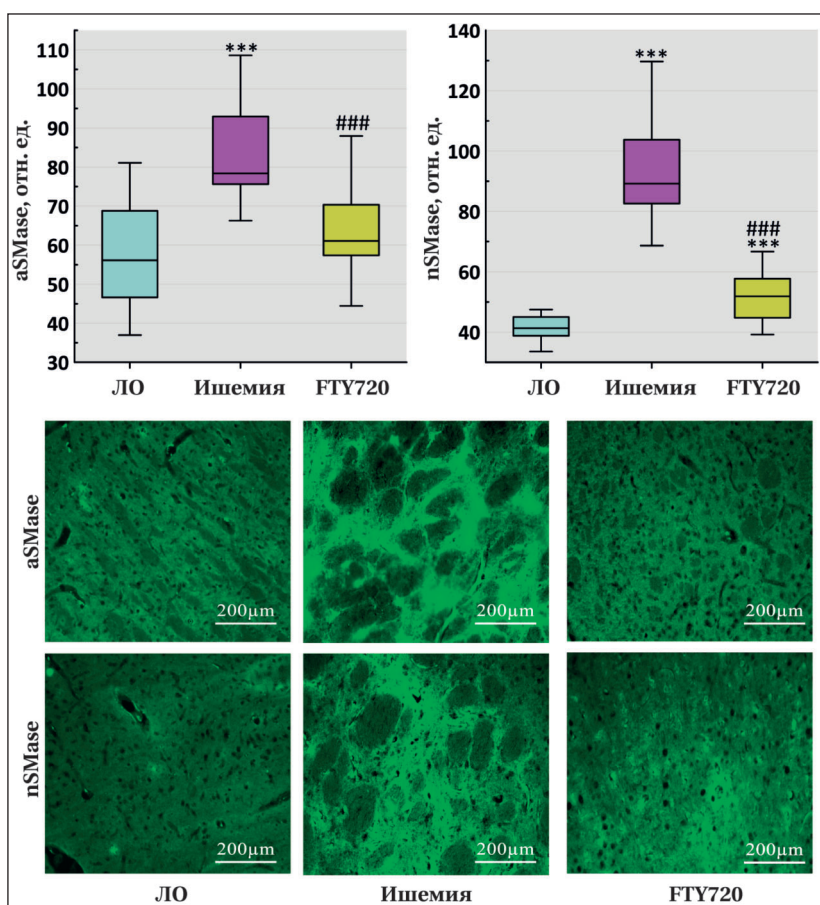


Рис. 5. Экспрессия aSMase и nSMase в исследуемых группах.

Примечание. *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; ### — $p < 0,001$ — по сравнению с группой животных с ишемией.

Выявили, что в условиях острой церебральной ишемии нарастала концентрация церамида в 4,2 раза ($p = 0,0003$) в сравнении с группой ЛО животных, в то время как концентрация церамид-1-фосфата снижалась на 47,4% ($p = 0,0008$), глюкозилцерамида — на 14,1% ($p = 0,009$).

Предварительное введение FTY720 позволило сгладить эти эффекты. У животных из группы FTY720 концентрация церамида в мозге

была в 1,6 раз ниже, чем в группе животных с ишемией ($p = 0,0005$), а концентрации церамид-1-фосфата и глюкозилцерамида были сопоставимы с группой ЛО животных. На рис. 3 представили полученные данные о концентрации церамида и его метаболитов.

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии удалось подтвердить, что предварительное введение FTY720 сопровождается ограничением образования церамида в ишемизированном мозге.

Так, при ишемии концентрация церамида была выше в 1,3 раза по сравнению с ЛО животными ($p = 0,0006$). В то же время, у крыс, получавших FTY720, она оказалась в 1,3 раза ниже, чем в группе с ишемией ($p = 0,002$), но оставалась существенно выше, чем у животных ЛО группы. Данные об изменениях церамида в мозге представили на рис. 3, 4.

В сфингомиелиназном пути церамид образуется под действием кислой и нейтральной сфингомиелиназ aSMase и

nSMase. В условиях острой церебральной ишемии экспрессия aSMase и nSMase значительно нарастала: в 1,4 раза ($p = 0,0001$) и в 1,8 раз соответственно ($p = 0,0004$). Предварительная инъекция FTY720 способствовала уменьшению экспрессии aSMase до уровня, сопоставимого с ЛО животными. При этом образование nSMase также уменьшалось в 1,2 раза в группе FTY720, тем не менее, не достигая такового у ЛО животных.

Изменения aSMase и nSMase отразили на рис. 5.

Провели оценку экспрессии ферментов серинпальмитоилтрансферазы (SPT) и церамидсинтазы (CerS) при острой ишемии головного мозга, что позволило охарактеризовать активность биосинтеза церамида по пути «*de novo*». У животных с ишемией экспрессия SPT увеличилась в 1,5 раза по сравнению с контролем (ЛО) ($p=0,0001$), тогда как экспрессия CerS — в 1,9 раза ($p=0,0001$). Предварительное введение FTY720 предотвращало повышение экспрессии обоих ферментов, приводя ее к величинам, сопоставимым с таковыми у ЛО животных. Результаты представили на рис. 6.

При изучении провоспалительного цитокина TNF α и его рецептора TNFR1 выявили, что в условиях церебральной ишемии концентрация TNF α увеличивалось в 1,6 раза по сравнению с группой ЛО животных ($p=0,0001$), а экспрессия TNFR1 возрастает в 1,9 раза ($p=0,0001$). Предварительное введение FTY720 приводило к снижению образования TNF α в 1,3 раза относительно группы с ишемией ($p=0,0003$), однако концентрация цитокина при этом оставалась повышенной. Плотность рецепторов TNFR1 в группе FTY720 также уменьшалась и становилась сопоставимой с уровнем в группе ЛО. Влияние FTY720 на экспрессию TNF α и TNFR1 представили на рис. 7.

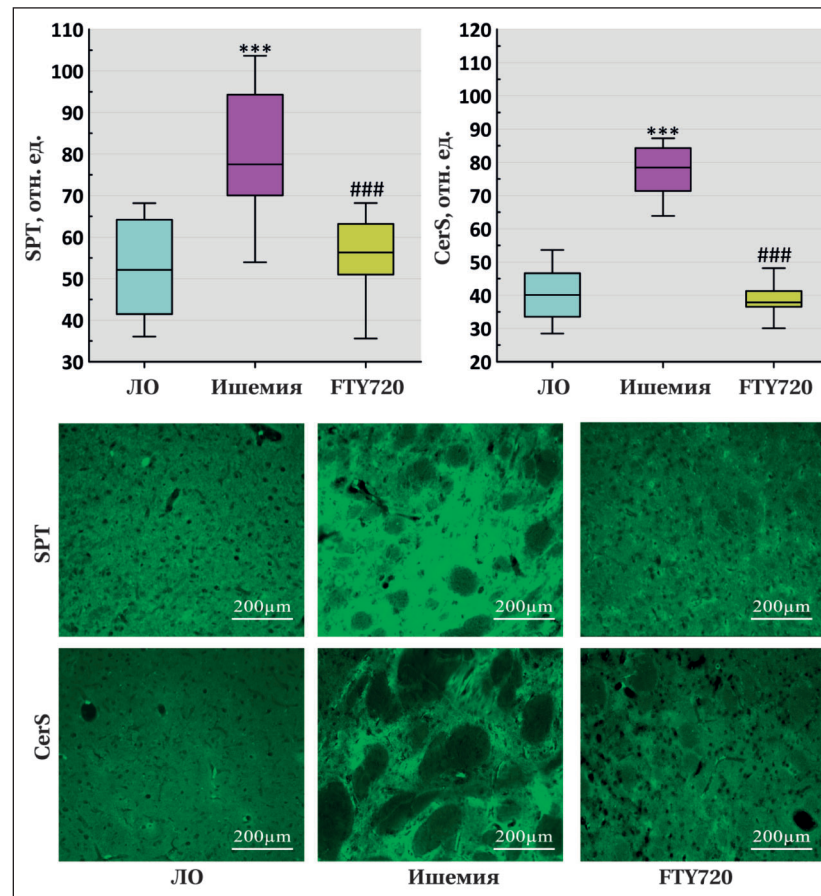


Рис. 6. Экспрессия SPT и CerS в исследуемых группах.

Примечание. *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; ### — $p < 0,001$ — по сравнению с группой животных с ишемией.

Обсуждение

Липиды клеточных мембран играют существенную роль в поддержании их структурной и функциональной целостности. Деградация фосфолипидов способствует гибели нейронов при ишемическом повреждении. В условиях ишемии гидролиз фосфолипидов усиливается вследствие повышения активности фосфолипазы A₂, индуцируемой активными формами кислорода и провоспалительными цитокинами, в первую очередь IL-1, TNF α и IFN γ [18].

В дальнейшем, за счет активации циклооксигеназы, липооксигеназы, цитохром-P450 монооксигеназы образуются оксипирины и лизофосфолипиды, которые также обладают сигнальными функциями. В большей степени исследованы лизофосфатидная кислота и сфин-

гозин-1-фосфат, которые обладают свойствами стимулировать нейрональное воспаление и лейкоцитарную инфильтрацию. Их продукция снижается при введении FTY720 преимущественно за счет уменьшения воспалительного ответа, снижения инфильтрации Т-клетками, нейтрофилами, а также за счет снижения активации микроглии [19].

В эксперименте G. Payne и соавт. (2007) на культуре тучных клеток установлено, что FTY720 ингибирует активность фосфолипазы A₂, тем самым снижая секрецию простагландинов и тромбаксанов, что приводит к ослаблению воспаления и уменьшению гидролиза клеточных мембран [20].

В наших исследованиях отметили снижение экспрессии SPT. Согласно данным литературы, FTY720 не оказывает прямого ингибирующего действия на этот фермент, в отличие от своего природного предшественника — мириоцина, известного ингибитора SPT [21]. В модели ишемии миокарда, описанной M. R. Reforgiato и соавт., показано, что активность SPT ассоциирована с нарастанием IL-6, IL-1 β , TNF- α и усиленной продукцией активных форм кислорода. Это позволяет предположить,

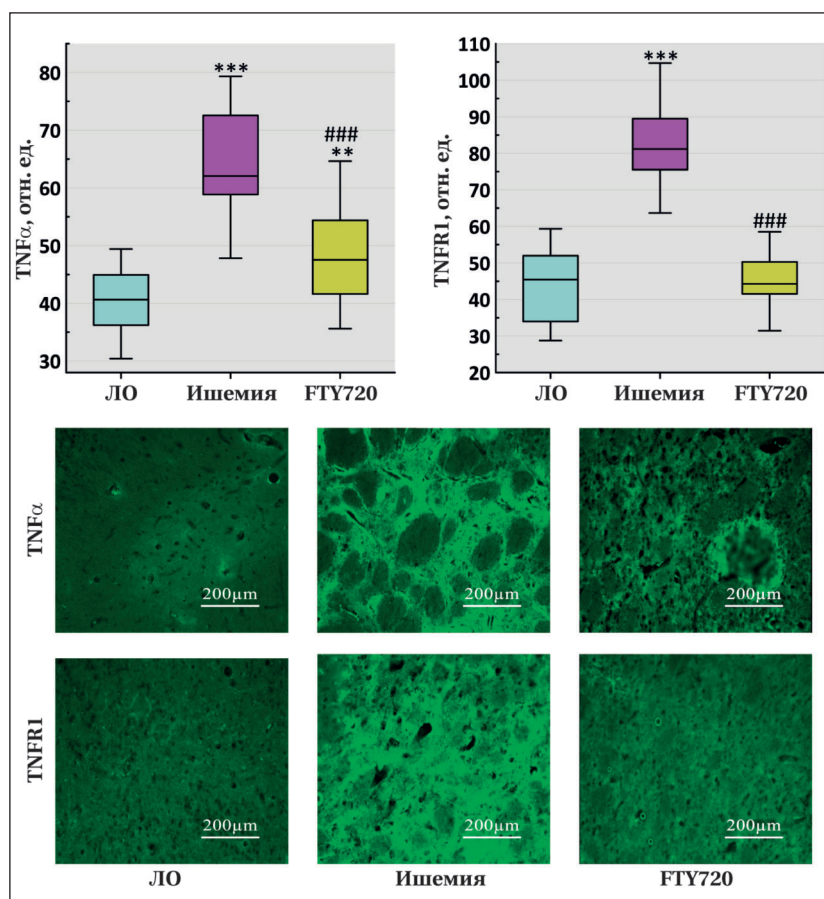


Рис. 7. Динамика экспрессии TNF α и его рецепторов TNFR-1 в исследуемых группах.

Примечание. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛО животными; ### — $p < 0,001$ — по сравнению с группой животных с ишемией.

что снижение воспалительной активации под влиянием FTU720 может уменьшать стимуляцию SPT [22].

Согласно данным Н. Jeřsko и соавт., полученным на модели болезни Альцгеймера, FTU720 способен подавлять экспрессию мРНК церамидсинтазы [23]. Интересно, что при церебральной ишемии снижается содержание сфинганина — предшественника сфинганин-1-фосфата. Известно, что алкалоид нуциферин проявляет антиишемические свойства, сопровождающиеся увеличением уровня сфинганин-1-фосфата, тогда как подавление активности CerS приводит к накоплению сфинганина [24].

Имеются данные, что FTU720 снижает активность aSMase, вызывая протеолитическую деградацию ферментного комплекса — механизм, сходный с действием трициклических антидепрессантов [25]. В нашей работе FTU720 также уменьшал экспрессию nSMase. Поскольку прямой эффект FTU720 на этот фермент ранее не описан, вероятно, снижение его экспрессии связано с уменьшением воспалительной инфильтрации и снижением продукции провоспалительных цитокинов.

Заклучение

В условиях острой ишемии головного мозга у крыс выявляются выраженные нарушения липидного гомеостаза, характеризующиеся деградацией мембранных фосфолипидов, накоплением лизофосфолипидов и активацией как сфингомиелиназного, так и синтетического «*de novo*» пути образования церамида.

Эти изменения сопровождаются повышением уровня провоспалительного цитокина TNF α и усилением экспрессии его рецептора TNFR1, что отражает активацию нейровоспалительного ответа и сопровождается развитием выраженного неврологического дефицита и снижением выживаемости животных.

Предварительно введение FTU720 оказывало модифицирующее влияние на указанные патологические процессы. Происходит частичная оптимизация фосфолипидного состава мозговой ткани, снижение деградации сфингомиелина и уменьшение накопления церамида. Это сопровождается подавлением экспрессии ферментов, участвующих в его образовании, включая кислую и нейтральную сфингомиелиназы, серинпальмитоилтрансферазу и церамидсинтазу, что указывает на торможение как катаболического, так и синтетического путей биосинтеза церамида.

Наряду с влиянием на липидный метаболизм, FTU720 способствует снижению продукции TNF α и нормализации экспрессии TNFR1 в ишемизированной ткани мозга, что отражает уменьшение выраженности провоспалительного ответа. Эти патохимические изменения сопровождаются снижением степени неврологического дефицита и повышением выживаемости животных в острый период ишемического повреждения.

Полученные данные свидетельствуют о значимой роли нарушений липидного сигналинга, в частности церамид-зависимых механизмов, в патогенезе нейронального воспаления при острой ишемии головного мозга. Модуляция сфинголипидного обмена и сигнальных путей TNF α /TNFR1 под воздействием FTU720 может рассматриваться как одно из ключевых направлений нейропротективной стратегии при ишемическом поражении мозга.

Литература

1. Jurcau A., Simion A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2021; 23 (1): 14. DOI: 10.3390/ijms23010014. PMID: 35008440.
2. Gaire B. P., Choi J. W. Sphingosine 1-phosphate receptors in cerebral ischemia. *Neuromolecular Med.* 2021; 23 (1): 211–223. DOI: 10.1007/s12017-020-08614-2. PMID: 32914259.
3. Zhang S.-Q., Xiao J., Chen M., Zhou L.-Q., Shang K., Qin C., Tian D.-S. Sphingosine-1-phosphate signaling in ischemic stroke: from bench to bedside and beyond. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 781098. DOI: 10.3389/fncel.2021.781098. PMID: 34916911.
4. Ciubotaru A., Covali R., Grosu C., Alexa D., Pila E. F., Cucu A. I., Bobu A. M., et al. Fingolimod as a neuroprotective agent in ischemic stroke: a review of preclinical and clinical evidence. *J Clin Med.* 2025; 14 (19): 6797. DOI: 10.3390/jcm14196797. PMID: 41095877.
5. Maktabi B., Shehjar F., Senger Z., Kountz L., Hasan S., Maaieh K., Hoersten K., et al. Sphingosine-1-phosphate modulation in neurological disorders: insights from MS and stroke. *Brain Sci.* 2025; 15 (5): 436. DOI: 10.3390/brainsci15050436. PMID: 40426607.
6. Zhang L., Sui R., Zhang L. Fingolimod protects against cerebral ischemia reperfusion injury in rats by reducing inflammatory cytokines and inhibiting p38 MAPK and NF- κ B pathways. *Neurosci Lett.* 2022; 771: 136413. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.136413. PMID: 34942319.
7. Fukuzaki Y., Faustino J., Lecuyer M., Rayasam A., Vexler Z. S. Global sphingosine-1-phosphate receptor 2 deficiency attenuates neuroinflammation and ischemic-reperfusion injury after neonatal stroke. *iScience.* 2023; 26 (4): 106340. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106340. PMID: 37009213.
8. Fan X., Chen H., Xu C., Wang Y., Yin P., Li M., Tang Z., et al. Inhibiting sphingosine 1-phosphate receptor subtype 3 attenuates brain damage during ischemia-reperfusion injury by regulating nNOS/NO and oxidative stress. *Front Neurosci.* 2022; 16: 838621. DOI: 10.3389/fnins.2022.838621. PMID: 35242008.
9. Basnet N., Cho H., Sapkota A., Park S., Lim C., Gaire B. P., Kim D., et al. Blocking S1P4 signaling attenuates brain injury in mice with ischemic stroke. *J Adv Res.* 2025; 78: 681–702. DOI: 10.1016/j.jare.2025.02.012. PMID: 39952320.
10. Mohamad Yusuf A., Zhang X., Gulbins E., Peng Y., Hagemann N., Hermann D. M. Signaling roles of sphingolipids in the ischemic brain and their potential utility as therapeutic targets. *Neurobiol Dis.* 2024; 201: 106682. DOI: 10.1016/j.nbd.2024.106682. PMID: 39332507.
11. Naseh M., Vatanparast J., Rafati A., Bayat M., Haghani M. The emerging role of FTY720 as a sphingosine 1-phosphate analog for the treatment of ischemic stroke: the cellular and molecular mechanisms. *Brain Behav.* 2021; 11 (6): e02179. DOI: 10.1002/brb3.2179. PMID: 33969931.
12. Radenovic L. *In vivo* experimental models of cerebral ischemia: analysis, translational potential and clinical relevance. *Cardiol Res Cardiovasc Med.* 2024; 9: 232. DOI: 10.29011/2575-7083.100232.
13. Zhu X.-Y., Ma T.-T., Li Y., Zhang M.-Q., Zhao L., Liang J., Min L.-Q. Fingolimod protects against neurovascular unit injury in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res.* 2023; 18 (4): 869–874. DOI: 10.4103/1673-5374.353500. PMID: 36204856.
14. Yager B. R., Kondrasov S. A., Jestus J., Venkataraman S., Contillo N. J., McMullen N. P., Coffman S. A., et al. Performing the Garcia score for accuracy and reliability. *Glob J Med Res.* 2024; 24 (1): 1–4. DOI: 10.34257/GJMRAVOL24IS1PG1.
15. Wang Y., Zhang Q., Zhang S., Qi J., Li L. The superiority and feasibility of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-stained brain tissues for molecular biology experiments based on microglial properties. *Anim Models Exp Med.* 2023; 6 (2): 111–119. DOI: 10.1002/ame2.12312. PMID: 37140996.
16. Gerhardtova I., Jankech T., Majerova P., Piestansky J., Olesova D., Kovac A., Jampilek J. Recent analytical methodologies in lipid analysis. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (4): 2249. DOI: 10.3390/ijms25042249. PMID: 38396926.
17. Ciani C., Pistorio G., Mearelli M., Falcone C. Immunofluorescence protocol for localizing protein targets in brain tissue from diverse model and non-model mammals. *STAR Protoc.* 2023; 4 (3): 102482. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102482. PMID: 37561635.
18. Li Y. W., Liu Y., Luo S.-Z., Huang X.-J., Shen Y., Wang W.-S., Lang Z. C. The significance of calcium ions in cerebral ischemia-reperfusion injury: mechanisms and intervention strategies. *Front Mol Biosci.* 2025; 12: 1585758. DOI: 10.3389/fmolb.2025.1585758. PMID: 40421420.
19. Xing Y., Zhong L., Guo J., Bao C., Luo Y., Min L. Fingolimod alleviates inflammation after cerebral ischemia via HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. *J Integr Neurosci.* 2024; 23 (8): 142. DOI: 10.31083/j.jin2308142. PMID: 39207074.
20. Payne S. G., Oskeritzian C. A., Griffiths R., Subramanian P., Barbour S. E., Chalfant C. E., Milstien S., et al. The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors. *Blood.* 2007; 109 (3): 1077–1085. DOI: 10.1182/blood-2006-03-011437. PMID: 17008548.
21. Chun J., Kihara Y., Jonnalagadda D., Blaho V. A. Fingolimod: lessons learned and new opportunities for treating multiple sclerosis and other disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019; 59: 149–170. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021358. PMID: 30625282.
22. Reforgiato M. R., Milano G., Fabriàs G., Casas J., Gasco P., Paroni R., Samaja M., et al. Inhibition of ceramide de novo synthesis as a postischemic strategy to reduce myocardial reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2016; 111 (2): 12. DOI: 10.1007/s00395-016-0533-x. PMID: 26786259.
23. Jęško H., Wencel P. L., Wójtowicz S., Strosznajder J., Lukiw W. J., Strosznajder R. P. Fingolimod affects transcription of genes encoding enzymes of ceramide metabolism in animal model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2020; 57 (6): 2799–2811. DOI: 10.1007/s12035-020-01908-3. PMID: 32356173.
24. Wu L., Chen C., Li Y., Guo C., Fan Y., Yu D., Zhang T., et al. UPLC-Q-TOF/MS-based serum metabolomics reveals the anti-ischemic stroke mechanism of nuciferine in MCAO rats. *ACS Omega.* 2020; 5 (51): 33433–33444. DOI: 10.1021/acsomega.0c05388. PMID: 33403305.
25. Dawson G., Qin J. Gilenya (FTY720) inhibits acid sphingomyelinase by a mechanism similar to tricyclic antidepressants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 404 (1): 321–323. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.115. PMID: 21130737.

Поступила 18.12.2025
 Принята 01.04.2026
 Публикация онлайн 14.04.2026