

Влияние гипотермии на экспрессию белков-маркеров повреждения головного мозга в условиях действия интерлейкина-6 и аноксии *in vitro*

А. А. Ивкин^{1*}, Е. Д. Хилажева², Е. В. Григорьев¹, А. И. Мосягина²

¹ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний Минобрнауки России, Россия, 650002, г. Кемерово, бульвар им. акад. Л. С. Барбараша, д. 6

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Россия, 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

Для цитирования: А. А. Ивкин, Е. Д. Хилажева, Е. В. Григорьев, А. И. Мосягина. Влияние гипотермии на экспрессию белков-маркеров повреждения головного мозга в условиях действия интерлейкина-6 и аноксии *in vitro*. *Общая реаниматология*. 2026; 22 (4): 38–46. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2026-4-2695> [На русск. и англ.]

*✉ Артем Александрович Ивкин, ivkiaa@kemcardio.ru

Резюме

Гипотермия длительное время применяется в кардиохирургии для нейропротекции, однако, ее эффективность не является однозначной.

Цель исследования. Выявление нейропротективного потенциала гипотермии в условиях действия гипоксии и интерлейкина-6 как имитации системного воспаления *in vitro*.

Материалы и методы. Сформировали *in vitro* модель нейроваскулярной единицы (НВЕ), состоящей из нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов. Провели культивирование НВЕ в условиях аноксии с добавлением сыворотки с максимальной либо минимальной концентрацией интерлейкина-6 [EO1.1] [ИА2.1] [ИЛ-6]. Образцы сыворотки получили из коллекции сыворотки 78 пациентов детского возраста от 1 месяца до 6,5 лет (13 [9–23] мес.) с массой тела от 3,3 до 21,5 кг (8,7 [6,9–11,0] кг), которым проводилась оперативная коррекция септальных врожденных пороков сердца в условиях искусственного кровообращения. В качестве контрольной группы использовали интактную модель НВЕ. Инкубацию клеток проводили в течение 15 минут при разных температурных режимах (20, 24, 28 и 37°C) с дальнейшей иммуноцитохимической оценкой экспрессии маркеров повреждения НВЕ: клаудина-5; окклюдина-1; рецепторов интерлейкина-1 (ИЛ-1) и ИЛ-6.

Результаты. Выявили, что при инкубации в условиях аноксии снижение интенсивности флуоресценции для клаудина-5 наступало при всех температурных режимах, и гипотермия не обладала протективным эффектом. Для окклюдина-1 температура 24°C нивелировала воздействие аноксии только при воздействии сыворотки с минимальной концентрацией ИЛ-6 ($p=0,442$). При воздействии сыворотки с максимальной концентрацией ИЛ-6 наступало значимое снижение интенсивности флуоресценции данного маркера по сравнению с контрольной группой ($p=0,092$). Гипотермия при 20°C не восстановила выраженность экспрессии рецепторов ИЛ-1 до значений контрольной группы, однако оказала протективное действие на экспрессию рецепторов ИЛ-6 и нивелировала воздействие аноксии ($p=0,44$), но только без добавления сыворотки.

Заключение. Воздействие сыворотки с различной концентрацией ИЛ-6 приводит к более выраженному влиянию на экспрессию маркеров повреждения НВЕ, чем гипоксия. Гипотермия в исследуемом диапазоне температур, в целом, не оказала должного защитного эффекта: экспрессия клаудина-5, рецепторов к ИЛ-1 и ИЛ-6 не была сопоставима с контрольной группой даже без добавления сыворотки.

Ключевые слова: гипотермия; церебральное повреждение; интерлейкин-6; аноксия; окклюдин-1; клаудин-5; рецепторы интерлейкина-1; нейроваскулярная единица; НВЕ; септальные врожденные пороки сердца у детей

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Effect of Hypothermia on the Expression of Brain Injury Marker Proteins in the Presence of Interleukin-6 and Anoxia *in vitro*

Artem A. Ivkin^{1*}, Elena D. Khilazheva¹, Evgeniy V. Grigoriev², Angelina I. Mosyagina²

¹ Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Disease, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 6 Academician L. S. Barbarash Boulevard, 650002 Kemerovo, Russia

² Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia, 1 Partizana Zheleznyaka Str., 660022 Krasnoyarsk, Krasnoyarsk area, Russia

Summary

Hypothermia has long been used in cardiac surgery for neuroprotection; however, its effectiveness is not clear-cut.

Objective of the study: to investigate the neuroprotective potential of hypothermia under conditions of hypoxia and interleukin-6, which simulates systemic inflammation *in vitro*.

Materials and methods. We established an *in vitro* model of a neurovascular unit (NVU) consisting of neurons, astrocytes, and endothelial cells. The NVU was cultured under anoxic conditions with the addition of serum containing either the maximum or minimum concentration of interleukin-6 (IL-6). Serum samples were obtained from a collection of serum samples from 78 pediatric patients aged 1 month to 6.5 years (13 [9–23] months) with body weights ranging from 3.3 to 21.5 kg (8.7 [6.9–11.0] kg), who underwent surgical correction of congenital septal heart defects under cardiopulmonary bypass. An intact NVU model was used as the control group. Cells were incubated for 15 minutes at different temperatures (20, 24, 28, and 37°C), followed by immunocytochemical assessment of the following NVU damage markers expression: claudin-5, occludin-1, and receptors for interleukin-1 (IL-1) and IL-6.

Results. We found that, during incubation under anoxic conditions, a decrease in the fluorescence intensity of claudin-5 occurred at all temperature conditions, and hypothermia had no protective effect. For occludin-1, a temperature of 24°C counteracted the effect of anoxia only when exposed to serum with the minimum IL-6 concentration ($p=0.442$). Exposure to serum with the maximum IL-6 concentration resulted in a significant decrease in the fluorescence intensity of this marker compared to the control group ($p=0.092$). Hypothermia at 20°C did not restore the expression levels of IL-1 receptors to those of the control group; however, it had a protective effect on the expression of IL-6 receptors and neutralized the effects of anoxia ($p=0.044$), but only in the absence of serum.

Conclusion. Exposure to serum containing varying concentrations of IL-6 results in a more pronounced effect on the expression of NVU damage markers than hypoxia. Hypothermia within the temperature range studied generally did not provide the expected protective effect: the expression of claudin-5, IL-1 and IL-6 receptors was not comparable to that of the control group, even without the addition of serum.

Keywords: hypothermia; cerebral injury; interleukin-6; anoxia; occludin-1; claudin-5; interleukin-1 receptors; neurovascular unit; NVU; septal congenital heart defects in children

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

Информация об авторах / Information about the authors:

Ивкин Артем Александрович / Artem A. Ivkin, <https://orcid.org/0000-0002-3899-1642>

Григорьев Евгений Валерьевич / Evgeniy V. Grigoriev, <https://orcid.org/0000-0001-8370-3083>

Хилажева Елена Дмитриевна / Elena D. Khilazheva, <https://orcid.org/0000-0002-9718-1260>

Мосягина Ангелина Ивановна / Angelina I. Mosyagina, <https://orcid.org/0000-0002-7344-7925>

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

Введение

Впервые роль гипотермии для органопroteкции описали W. G. Bigelow и коллеги в 1950 г., изучив ее в эксперименте на собаках: авторы выполнили животным остановку кровообращения в условиях охлаждения до 20°C на 15 мин и дальнейшее восстановление витальных функций организма [1]. В кардиохирургии гипотермия впервые была применена F. J. Lewis для коррекции дефекта межпредсердной перегородки у ребенка [2]. Таким образом, гипотермия используется для органопroteкции в кардиохирургии уже много лет, но до сих пор ее эффективность и безопасность во многом не до конца исследованы, особенно в части нейропротективных эффектов.

Влияние гипотермии на нейроваскулярную единицу (НВЕ) состоящую из нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов, является комплексным и включает следующие:

- Снижение церебрального метаболизма: активность метаболизма головного мозга падает на 5–7% на каждый 1°C снижения температуры. Это приводит к уменьшению потребления кислорода и глюкозы, сохранению макроэргических фосфатов (АТФ, АДФ) и поддержанию ионных градиентов, что позволяет продлить период, в течение которого мозг может переносить полную ишемию без необратимых повреждений [3].

- Подавление эксайтотоксичности: гипотермия напрямую ингибирует пресинаптическое высвобождение возбуждающих нейромедиаторов (глутамата, аспартата) и предотвращает перегрузку нейронов ионами кальция через NMDA-рецепторы, что является ключевым звеном в ишемическом каскаде, а также модулирует постсинаптические рецепторы, уменьшая последующую активацию липаз и эндонуклеаз [4].

- Модуляция апоптоза: гипотермия влияет на внутренние пути апоптоза, подавляя активацию каспаз, высвобождение цитохрома С из митохондрий и экспрессию про-апоптотических белков, одновременно стимулируя синтез антиапоптотических факторов [5].

- Подавление воспалительного ответа: гипотермия ингибирует активацию микроглии и выброс провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6), а также хемокинов, что ограничивает нейровоспаление и повреждение ГЭБ [6].

- Снижение образования активных форм кислорода (АФК): при реперфузии происходит массивное образование АФК. Гипотермия уменьшает генерацию АФК и модулирует активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, тем самым снижая оксидативный стресс [7].

- Для астроцитов, гипотермия снижает активность астроглиального глутаматтранс-

портера EAAT2, предотвращая его работу в обратном направлении и тем самым препятствуя дополнительному выбросу глутамата в эксайтотоксических условиях [8].

- Гипотермия стабилизирует ГЭБ, уменьшая экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках и подавляя активность матриксных металлопротеиназ, что ограничивает лейкоцитарную инфильтрацию и отек мозга [5].

Клинические и экспериментальные исследования эффективности гипотермии. Исследования показали, что глубокая гипотермия (18°C) значительно сохраняет высокоэнергетические фосфаты и внутриклеточный pH, отсрочивая наступление ишемического повреждения коры головного мозга, базальных ганглиев и гиппокампа по сравнению с нормотермией [9]. По данным систематического обзора с метаанализом гипотермия не только сохраняет энергетический статус, но и существенно улучшает функциональные неврологические исходы и снижает гистопатологическую степень повреждения головного мозга после ишемии [10].

Отдельным вопросом является влияние гипотермии на системное воспаление. Учитывая его значимую роль в церебральном повреждении, стоит принять во внимание исследование клинического характера с пациентами детского возраста, в котором установлено, что применение гипотермии на уровне 27°C вначале уменьшало концентрацию L-селектина, однако через 30 мин, его концентрация была сопоставима с группой исследуемых с гипотермией 33°C [11].

В одном из самых масштабных и долгосрочных рандомизированных контролируемых исследований Boston Circulatory Arrest Study, сравнивались стратегии с глубокой гипотермией и остановкой кровообращения, и глубокой гипотермией с непрерывным искусственным кровообращением у детей с коррекцией транспозиции магистральных артерий. Результаты показали, что хотя стратегия циркуляторного ареста технически была значительно удобнее для хирурга, она была ассоциирована с более высоким риском послеоперационных судорог и более низкими показателями моторного развития и речевой функции в отдаленном периоде по сравнению с непрерывным низкообъемным перфузионным потоком [12]. Это свидетельствует о том, что сама по себе остановка кровообращения, даже в условиях глубокой гипотермии, несет значительные риски.

Современные клинические практики эволюционировали в сторону отказа от плановой гипотермической остановки кровообращения в пользу непрерывной церебральной перфузии в условиях умеренной (25–32°C) или глубокой гипотермии. Показано, что такой подход ассо-

циирован с лучшими неврологическими исходами, снижением частоты послеоперационных судорог и более низкими показателями послеоперационной когнитивной дисфункции [13].

Некоторые исследователи вообще декларируют отказ от гипотермии в пользу нормотермии в постоянной церебральной перфузией. Так в работе M. Caputo и соавт. [14] проведено сравнение двух групп детей — с проведением ИК в условиях нормотермии или с гипотермией на уровне 28°C, и выявлено, что по выраженности повреждения НВЕ группы были сопоставимы, как и по длительности дальнейшего нахождения в отделении реанимации.

Другое исследование с аналогичным дизайном, демонстрирует, однако, что в группе с гипотермией была значимо выше потребность в трансфузии, а также длительность ИВЛ и нахождения в отделении реанимации [15].

Исследователи из Texas Children's Hospital, предполагают, что умеренная гипотермия может быть столь же эффективной для нейропротекции при определенных типах операций, но с меньшим количеством побочных эффектов, присущих глубокой гипотермии [16]. Можно заключить, что оптимальный температурный режим остается предметом дискуссий.

Цель исследования — выявление нейропротективного потенциала гипотермии в условиях действия гипоксии и интерлейкина-6 как имитации системного воспаления *in vitro*.

Материал и методы

Клиническую часть исследования и набор сыроворотки пациентов провели на базе Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ, г. Кемерово, Россия) с 2018 по 2023 гг. Экспериментальную часть исследования провели в Красноярском государственном медицинском университете имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (КрасГМУ). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 20 от 20.11.2018). Схему исследования представили на рис. 1.

Клеточная модель нейроваскулярной единицы. Применили Transwell-клеточную модель НВЕ, содержащую полупроницаемую вставку-мембрану толщиной 10 мкм. Вставка формирует 2 камеры: наружную верхнюю (люминальную), и внутреннюю нижнюю (аблюминальную), расположенную между вставкой и дном лунки. Такая конструкция имитирует просвет сосуда, позволяет исследовать механизмы проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [17, 18]. Внутренняя камера содержит клетки, имитирующие ткань головного мозга — астроциты и нейроны, которые расположены с нижней стороны мембраны и на дне лунки. Схематично Transwell-модель изобраили на рис. 2.



Рис. 1 Схема исследования.

Получение клеточной модели НВЕ включало 4 этапа:

1. Выделение церебральных эндотелиоцитов.
2. Выделение и культивирование нейросфер.
3. Получение астроцитов и нейронов из полученных нейросфер путем направленной дифференцировки в астроциты и нейроны.

4. Формирование модели НВЕ. Для этого смесь эндотелиоцитов и нейронов помещали на дно лунок культурального планшета, затем устанавливали культуральные вставки (Corning-Costar, США), на которые помещали астроциты. Смесь клеток культивировали в среде, состоящей из DMEM с FBS, глутамином, смесью антибиотиков при 37°C с 5% CO₂.

Получение первичных культур клеток головного мозга. Использовали первичные культуры клеток эндотелия, астроцитов и нейронов головного мозга, полученных из крыс линии Wistar. Животных содержали в клетках со свободным доступом к корму и воде. Температуру поддерживали постоянно — 21±1°C. Световой цикл составил 12 ч день/12 ч ночь. Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC) [19]. Общее количество животных — $n=10$.

В лаборатории КрасГМУ на основе клеточной модели НВЕ была разработана модель повреждения головного мозга при кардиохирургических операциях, которая может культивироваться в различных условиях, имитирующих факторы интраоперационного периода.

Образцы сыворотки. В распоряжении авторов имеется коллекция сыворотки 78 пациентов детского возраста — от 1 месяца до 6,5 лет (13 (9–23) мес.) с массой тела от 3,3 до 21,5 кг (8,7 (6,9–11,0) кг), которым проводилась оперативная коррекция септальных

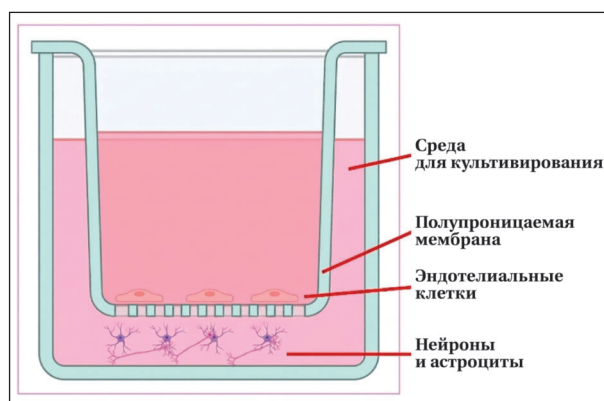


Рис. 2. Клеточная модель нейроваскулярной единицы (рисунки авторов).

врожденных пороков сердца в условиях искусственного кровообращения (ИК) на базе НИИ КПССЗ.

Критерии включения пациентов в исследование были следующие: планируемое хирургическое вмешательство по коррекции врожденного порока сердца (дефекта межпредсердной или межжелудочковой перегородки) в условиях ИК, наличие информированного согласия об участии в исследовании, подписанного законным представителем ребенка, возраст ребенка от 1 месяца до 7 лет; масса тела от 3 до 25 кг (в подразделе «Образцы сыворотки» привели фактические данные пациентов, включенных в исследование).

Критерии исключения: экстренные и срочные оперативные вмешательства; наличие клинически выраженной анемии, гипотермический режим ИК, эпизоды десатурации в периоперационном периоде; наличие иных ВПС, кроме дефекта межпредсердной или межжелудочковой перегородки, а также их со-

четание, заболевания центральной нервной системы в анамнезе, установленный электрокардиостимулятор, нестабильность гемодинамики, требующая предоперационной фармакологической и/или механической поддержки, любые эпизоды нарушения мозгового кровообращения в анамнезе или периоперационном периоде, наличие у пациента тяжелых сопутствующих заболеваний, ухудшающих психический и соматический статус, острая инфекция и обострение хронической инфекции в периоперационном периоде, сопутствующие аутоиммунные заболевания, наличие злокачественных новообразований, хирургические осложнения в послеоперационном периоде.

В каждом образце сыворотки определили концентрацию интерлейкина-6 (ИЛ-6), как одного из главных показателей системного воспалительного ответа (СВО) [20].

Для исследования *in vitro* из имеющейся коллекции отобрали по 3 образца сыворотки с наибольшей и наименьшей концентрацией ИЛ-6, как отражающих наибольший и наименьший уровень развития СВО, соответственно. Замороженную сыворотку транспортировали с соблюдением температурного режима в КрасГМУ.

Формирование групп. Для определения эффектов ИЛ-6 на клеточную модель НВЕ в культуральную среду добавили сыворотку, смешанную из 3-х образцов с минимальной концентрацией ИЛ-6, либо смешанную из 3-х образцов с максимальной концентрацией ИЛ-6.

Группы сформировали в зависимости от концентрации ИЛ-6 в сыворотке.

1. Группа «Контроль» — интактная модель НВЕ.
2. Группа «Минимум» (Min) — добавление в культуру смеси образцов сыворотки с минимальным содержанием ИЛ-6.
3. Группа «Максимум» (Max) — добавление в культуру смеси образцов сыворотки с максимальным содержанием ИЛ-6.

Для определения эффектов гипотермии в условиях аноксии для каждой группы сформировали следующие подгруппы:

1. Нормоксия 37°: стандартные условия культивирования, N₂ — 75%, O₂ — 20%, CO₂ — 5%, t — 37°C.
2. Аноксия 37°: N₂ — 95%, O₂ — 0%, CO₂ — 5%, t — 37°C.
3. Аноксия 28°: N₂ — 95%, O₂ — 0%, CO₂ — 5%, t — 28°C.
4. Аноксия 24°: N₂ — 95%, O₂ — 0%, CO₂ — 5%, t — 24°C.
5. Аноксия 20°: N₂ — 95%, O₂ — 0%, CO₂ — 5%, t — 20°C.

Формирование условий аноксии и гипотермии проводили в гипоксической станции НурухуLab (Oxford Optronix, Великобритания). В камеру станции с заранее установленными параметрами температуры и кислородного статуса помещали планшеты с культурами клеток. Длительность воздействия аноксии и гипотермии составила 15 мин. Непосредственно

после воздействия клетки подвергали фиксации 4% раствором формальдегида и дальнейшему иммуноцитохимическому исследованию молекул-маркеров. Число наблюдений в группах составляло 5 лунок на каждую [EO3.1] [ИА4.1] группу. В каждой лунке анализировали не менее 5 полей зрения.

Иммуноцитохимические исследования. Для регистрации целевых молекул-маркеров использовали метод двойного непрямого иммуноцитохимического окрашивания согласно протоколу фирмы-изготовителя антител. Клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в PBS в течение 15 мин. Пермеабиллизацию проводили 0,25% раствором Triton X-100 в PBS в течение 5 мин при комнатной температуре. Блокирование неспецифического связывания проводили в 10% растворе BSA в PBS в течение 30 мин при 37°C. Использовали первичные антитела к GFAP (ab4648, Abcam), NeuN (ABN78, Merck Millipore), VWF (LS-B4034, LSBio), Claudin-5 (AF0130, Affinity Biosciences), ZO1 (AF5145, Affinity Biosciences), Interleukin-1 Receptor Type I (PAA066Ra01, Cloud-Clone Corp), Interleukin-6 Receptor (DF2530, Affinity Biosciences), TNF Receptor I (AF0282, Affinity Biosciences), TNF Receptor II (AF0364, Affinity Biosciences). Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:200. Время инкубации с первичными антителами составило 18 ч при 4°C. Вторичные антитела, меченые FITC (SAA544Rb58, Cloud-Clone Corp.), использовали в разведении 1:400, время инкубации составляло 2 ч при 37°C.

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Выполняли подсчет интенсивности флуоресценции исследуемых маркеров с помощью программного обеспечения ImageJ.

Методы статистического анализа. Данные обрабатывали статистически с помощью программы BioStat Pro 5.9.8. Данные в тексте и таблицах представили в виде медианы (*Me*), нижнего (*Q1*) и верхнего (*Q3*) квартилей, так как большинство данных имело характер распределения, отличный от нормального (критерий Шапиро–Уилка, $p < 0,05$). Количественные переменные сравнивали с использованием двухстороннего *U*-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для выявления значимых отличий в нескольких независимых группах применяли критерий Краскела–Уоллеса. Для сравнения нескольких групп, либо подгрупп, использовали поправку Бонферрони. Влияние разной концентрации ИЛ-6 на НВЕ — в 2-х группах с добавлением сыворотки и 1-й контрольной — без добавления сыворотки, значимость различий составила 0,017. Влияние температуры инкубации НВЕ для каждой группы оценивали в 4-х подгруппах с аноксией и 1-й подгруппе с нормоксией, значимость различий составила 0,0125.

Результаты

Экспрессия клаудина-5 (табл. 1). В группах Контроль и Min в условиях аноксии по сравне-

Таблица 1. Интенсивность флуоресценции экспрессии клаудина-5.

Группы	Значения показателей в подгруппах					p				
	Нормоксия	Аноксия				Нормоксия vs Аноксия				
	37°C	37°C	28°C	24°C	20°C	vs 37°C vs 28°C vs 24°C vs 20°C	vs 37°C	vs 28°C	vs 24°C	vs 20°C
Контроль	34,25 [30,90–36,88]	9,20 [8,23–9,80]	9,20 [8,43–9,75]	11,20 [10,28–11,93]	17,55 [16,75–18,23]	0,003	0,011	0,011	0,011	0,011
Min	13,50 [11,18–15,80]	4,15 [3,95–4,58]	4,95 [4,68–5,45]	6,35 [5,68–7,10]	7,40 [7,20–7,75]	0,003	0,011	0,011	0,011	0,011
Max	3,55 [3,28–3,83]	2,30 [2,18–2,33]	2,15 [2,08–2,53]	2,25 [1,98–2,78]	2,50 [2,25–2,80]	0,130	—	—	—	—
Контроль vs Min vs Max	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007					
Контроль vs Min	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					
Контроль vs Max	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					
Min vs Max	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					

Примечание. Для табл. 1–4: все значения указаны в условных единицах (у. е.) флуоресценции; уровень значимости различий в группах — 0,017; в подгруппах нормоксия vs аноксия — 0,0125.

Таблица 2. Интенсивность флуоресценции экспрессии окклюдина-1.

Группы	Значения показателей в подгруппах					p				
	Нормоксия	Аноксия				Нормоксия vs Аноксия				
	37°C	37°C	28°C	24°C	20°C	vs 37°C vs 28°C vs 24°C vs 20°C	vs 37°C	vs 28°C	vs 24°C	vs 20°C
Контроль	53,75 [51,60–56,85]	43,90 [40,98–48,38]	43,35 [42,98–45,05]	57,40 [56,70–58,38]	62,0 [59,28–64,48]	0,003	0,042	0,022	0,124	0,042
Min	26,25 [25,0–28,10]	16,65 [15,43–17,70]	18,05 [16,95–18,88]	26,90 [25,68–27,68]	29,15 [27,35–30,65]	0,007	0,011	0,011	0,442	0,193
Max	8,15 [7,83–8,58]	8,40 [7,98–8,83]	8,30 [8,13–8,78]	10,05 [9,28–10,83]	12,0 [11,68–12,58]	0,092	—	—	—	—
Контроль vs Min vs Max	0,007	0,018	0,018	0,018	0,018					
Контроль vs Min	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					
Контроль vs Max	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					
Min vs Max	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					

нию с нормоксией происходило статистически значимое снижение экспрессии клаудина-5 во всех подгруппах ($p=0,003$). При температуре ниже 37°C в этих группах наблюдали тенденцию к стабилизации и увеличению экспрессии клаудина-5. Однако значения показателя не достигали таковых при нормоксии ($p=0,011$).

В группе Max температурный режим и концентрации кислорода не влияли на экспрессию клаудина-5 ($p=0,130$).

Снижение экспрессии клаудина-5 по сравнению с контролем было более выражено в группе Max, чем в группе Min, при нормоксии и аноксии ($p=0,011$). Так, в условиях нормоксии присутствие сыворотки в среде культивирования приводило к снижению экспрессии клаудина-5 по сравнению с контролем: в группе Min — 2,5 раза ($p=0,011$), в группе Max — в 9,6 раз ($p=0,011$).

Экспрессия окклюдина-1 (табл. 2). Вторым исследуемым белком, который участвует в обеспечении функциональной активности ГЭБ, являлся белок плотных контактов окклюдина-1. В контрольной группе и группе Max после воздействия аноксии при всех температурных режимах не выявили статистически значимого

изменения экспрессии окклюдина-1 по сравнению с нормоксией ($p>0,0125$). При нормоксии экспрессия окклюдина-1 в группе Min снижается в 2,05 раза ($p=0,011$), а в группе Max — в 6,6 раз ($p=0,011$). При этом в группе Min начиная с гипотермии в 24°C статистически значимой разницы между условиями нормоксии и аноксии уже не наблюдали ($p=0,442$).

Экспрессия рецепторов интерлейкина-1 (IL-1R) (табл. 3). Установили, что в контрольной группе инкубация клеток в условиях аноксии при 37°C приводит к статистически значимому увеличению интенсивности флуоресценции IL-1R с 9,85 до 21,20 у. е. ($p=0,011$). При снижении температуры отметили тенденцию к уменьшению негативного эффекта аноксии. Начиная с 24°C это снижение было статистически значимым ($p=0,011$).

Тем не менее даже при температуре 20°C интенсивность флуоресценции экспрессии IL-1R статистически значимо отличалась от контрольной группы ($p=0,011$). Также выявили, что при нормоксии присутствие в среде культивирования сыворотки крови приводило к статистически значимому увеличению экспрессии IL-1R ($p=0,011$), независимо от концентрации

Таблица 3. Интенсивность флуоресценции экспрессии рецепторов интерлейкина-1.

Группы	Значения показателей в подгруппах					p				
	Нормоксия	Аноксия				Нормоксия vs Аноксия				
	37°C	37°C	28°C	24°C	20°C	vs 37°C vs 28°C vs 24°C vs 20°C	vs 37°C	vs 28°C	vs 24°C	vs 20°C
Контроль	9,85 [9,78–10,05]	21,20 [19,98–22,58]	18,25 [16,05–21,00]	15,70 [14,55–16,68]	13,95 [13,30–14,90]	0,004	0,011	0,011	0,011	0,011
Min	22,65 [21,65–23,68]	43,25 [42,20–44,33]	40,80 [38,45–43,18]	33,30 [38,45–43,18]	31,25 [29,60–33,73]	0,003	0,011	0,011	0,011	0,011
Max	27,55 [49,35–50,25]	49,35 [48,15–50,25]	44,25 [41,80–47,50]	40,70 [39,45–42,48]	38,65 [35,25–40,60]	0,006	0,011	0,011	0,011	0,022
Контроль vs Min vs Max	0,010	0,007	0,017	0,018	0,018					
Контроль vs Min	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					
Контроль vs Max	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011					
Min vs Max	0,022	0,011	0,095	0,011	0,124					

Таблица 4. Интенсивность флуоресценции экспрессии рецепторов интерлейкина-6.

Группы	Значения показателей в подгруппах					p				
	Нормоксия	Аноксия				Нормоксия vs Аноксия				
	37°C	37°C	28°C	24°C	20°C	vs 37°C vs 28°C vs 24°C vs 20°C	vs 37°C	vs 28°C	vs 24°C	vs 20°C
Контроль	8,55 [7,85–8,98]	22,90 [22,33–24,68]	22,70 [20,68–24,15]	15,20 [13,98–16,75]	8,35 [7,33–9,15]	0,003	0,011	0,011	0,011	0,044
Min	8,80 [8,20–9,40]	30,85 [28,93–32,78]	33,95 [30,95–36,13]	27,15 [26,13–28,53]	20,85 [19,05–22,55]	0,003	0,011	0,011	0,011	0,011
Max	8,90 [8,25–10,10]	49,45 [45,55–51,78]	43,40 [41,63–46,00]	39,15 [36,05–41,65]	34,25 [32,60–35,63]	0,005	0,011	0,011	0,011	0,011
Контроль vs Min vs Max	0,668	0,013	0,007	0,010	0,007					
Контроль vs Min	—	0,042	0,011	0,011	0,011					
Контроль vs Max	—	0,011	0,011	0,011	0,011					
Min vs Max	—	0,011	0,011	0,022	0,011					

IL-6 в ней. При гипотермии с температурой 20°C в группе Max различия экспрессии IL-1R в условиях нормоксии и гипоксии нивелировались ($p=0,022$).

Экспрессия рецепторов интерлейкина-6 (IL-6 R) (табл. 4). Установили, что в группе Контроль в условиях аноксии при 37°, 28° и 24°C происходит значимое увеличение экспрессии IL-6R по сравнению с нормоксией ($p=0,011$). При этом наблюдали тенденцию к снижению экспрессии по мере снижения температуры. При 20°C экспрессия IL-6R не отличалась от таковой при нормоксии ($p=0,044$).

В группах Min и Max в условиях аноксии экспрессия IL-6R была выше, чем при нормоксии, во всех подгруппах (37°, 28°, 24° и 20°C, $p=0,011$). Понижение температуры до 20°C в обеих группах не привело к восстановлению уровня экспрессии до значений при нормоксии ($p=0,011$).

В условиях нормоксии группы Контроль, Min и Max значимо не различались по уровню экспрессии IL-6R ($p=0,668$). Однако в условиях аноксии обнаружили статистически значимое повышение экспрессии IL-6R по сравнению с Контролем: в группе Min — начиная с 28°C ($p=0,011$), в группе Max — с 37°C ($p=0,011$). Начиная с 28°C и ниже, повышение экспрессии

IL-6R по сравнению с нормоксией было более выражено в группах Min и Max, чем в Контроле ($p\leq 0,010$).

Обсуждение

Выявленное снижение экспрессии клаудина-5 и окклюдина-1 под воздействием аноксии полностью согласуется с имеющимися данными о том, что ишемия/гипоксия является мощным дестабилизирующим фактором целостности ГЭБ. Показано, что уже через несколько минут после окклюзии средней мозговой артерии у грызунов происходит быстрое снижение экспрессии и перераспределение белков плотных контактов, что приводит к увеличению проницаемости ГЭБ [21, 22]. Аналогичные данные получены и в условиях *in vitro*: кислородно-глюкозная депривация в культурах клеток эндотелия головного мозга приводит к диссоциации комплексов окклюдина-1 и клаудина-5 с цитоскелетом и их интернализации [23]. Наши результаты, демонстрирующие снижение экспрессии этих белков при аноксии в группе без сыворотки и в группе с низким содержанием IL-6, подтверждают эту общепризнанную патофизиологическую концепцию. По всей видимости, даже несмотря на возможные протективные эффекты гипотермии на стабилизацию ГЭБ,

они недостаточны для его сохранения. Однако это требует дальнейшего изучения в более сложных моделях НВЕ с имитацией тока крови.

Особый интерес представляют данные о влиянии сыворотки пациентов на модель НВЕ. Установили, что даже сыворотка с минимальной концентрацией IL-6 существенно снижала экспрессию клаудина-5 и окклюдина-1, а сыворотка с высоким IL-6 оказывала максимальный повреждающий эффект, практически нивелируя разницу между воздействиями аноксии и нормоксии. Это свидетельствует о том, что системное воспаление, опосредованное гуморальными факторами крови, является независимым и мощным повреждающим агентом для ГЭБ. Данный вывод находит подтверждение в работах, демонстрирующих, что провоспалительные цитокины, такие как TNF- α IL-1 β и IL-6, способны напрямую модулировать экспрессию и организацию белков плотных контактов. В частности, показано, что IL-6 может активировать сигнальный путь JAK-STAT, приводя к подавлению транскрипции гена клаудина-5 [24].

Как показывают наши данные, нейропротективный эффект гипотермии в значительной степени зависит от сопутствующих факторов, в частности, от наличия сопутствующего системного воспаления. Наиболее выраженный протективный эффект гипотермии в эксперименте наблюдали в группах без добавления сыворотки или с сывороткой с низким содержанием IL-6. Фиксировали увеличение экспрессии клаудина-5 при снижении температуры до 20°C по сравнению с аноксией при 37°C, но оно было статистически значимо ниже показателей контрольной группы, а следовательно эффекты гипотермии оказались недостаточными для нейропротекции. В отношении IL-1R гипотермия также продемонстрировала недостаточный протективный эффект, не снижая их аноксия-индуцированную гиперэкспрессию. Экспрессию IL-6R гипотермия значимо снижала только при температуре 20°C.

Однако ключевым ограничением эффективности гипотермии, выявленным в исследо-

ванном диапазоне температур, является ее неспособность полноценно нивелировать повреждающее действие высокой концентрации провоспалительных факторов в сыворотке. В группе Мах по содержанию IL-6 гипотермия не оказывала значимого влияния ни на экспрессию клаудина-5, ни на экспрессию IL-6R. Это позволяет предположить, что запускаемые высокими концентрациями цитокинов сигнальные каскады (например, JAK-STAT, NF- κ B) обладают значительной устойчивостью к модулирующему действию снижения температуры. Возможно, для преодоления этого требуется более глубокая или более длительная гипотермия, либо комбинированная терапия, включающая, помимо гипотермии, фармакологические ингибиторы провоспалительных путей.

Ограничения исследования связаны, в первую очередь, с самой моделью НВЕ, которая не обладает свойствами имитации тока крови. Кроме того, можно отметить ограниченный уровень гипотермии в 20°C, которого, возможно, не хватило для протективных эффектов. Однако, в практике кардиохирургии, редко применяются охлаждение пациента до более низких температур [25, 26]. Кроме того, важно отметить, что для имитации действия СВО применяли не ИЛ-6, а сыворотку крови пациентов с известным его содержанием. Это может искажать результаты, так как в сыворотке содержится и множество других факторов, инициирующих системное воспаление.

Заключение

Воздействие сыворотки с различной концентрацией ИЛ-6 приводило к более выраженному влиянию на экспрессию маркеров повреждения НВЕ, чем аноксия.

Гипотермия в исследуемом диапазоне температур, в целом, не оказала должного защитного эффекта: экспрессия клаудина-5, рецепторов к IL-1 и IL-6 не была сопоставима с контрольной группой даже без добавления сыворотки.

Литература

1. Bigelow W.G., Lindsay W.K., Greenwood W.F. Hypothermia: its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg.* 1950; 132: 849–866. DOI: 10.1097/00000658-195011000-00001. PMID: 14771796.
2. Lewis F.J., Taufic M. Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery.* 1953; 33: 52–59. PMID: 13015312.
3. Flickinger K.L., Weissman A., Elmer J., Coppler P.J., Guyette F.X., Repine M.J., Dezfulian C., et al. Metabolic manipulation and therapeutic hypothermia. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2024; 14 (1): 46–51. DOI: 10.1089/ther.2023.0010. PMID: 37405749.
4. Campos F., Pérez-Mato M., Agulla J., Blanco M., Barral D., Almeida A., Brea D., et al. Glutamate excitotoxicity is the key molecular mechanism which is influenced by body temperature during the acute phase of brain stroke. *PLoS One.* 2012; 7 (8): e44191. DOI: 10.1371/journal.pone.0044191. PMID: 22952923.
5. Xu L., Yenari M.A., Steinberg G.K., Giffard R.G. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons *in vitro* early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22 (1): 21–28. DOI: 10.1097/00004647-200201000-00003. PMID: 11807390.
6. Sun H., Cai J., Shen S., Ren X. Hypothermia treatment ameliorated cyclin-dependent kinase 5-mediated inflammation in ischemic stroke and improved outcomes in ischemic stroke patients. *Clinics (Sao Paulo).* 2019; 74: e938. DOI: 10.6061/clinics/2019/e938. PMID: 31644666.
7. Gong P., Li C.S., Hua R., Zhao H., Tang Z.R., Mei X., Zhang M.Y., et al. Mild hypothermia attenuates mitochondrial oxidative stress by protecting respiratory enzymes and upregulating MnSOD in a pig model of cardiac arrest. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35313. DOI: 10.1371/journal.pone.0035313. PMID: 22532848.
8. Nishi H., Nakatsuka T., Takeda D., Miyazaki N., Sakanaka J., Yamada H., Yoshida M. Hypothermia suppresses excitatory synaptic transmission and neuronal death induced by experimental ischemia

- in spinal ventral horn neurons. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007; 32 (25): E741-747. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31815b654b. PMID: 18245989.
9. Greeley WJ., Kern F.H., Ungerleider R.M., Boyd 3rd J.L., Quill T., Smith L.R., Baldwin B., et al. The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991; 101 (5): 783-794. PMID: 2023435.
 10. van der Worp H.B., Sena E.S., Donnan G.A., Howells D.W., Macleod M.R. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain*. 2007; 130 (Pt 12): 3063-3074. DOI: 10.1093/brain/awm083. PMID: 17478443.
 11. Deist E.L., Menasché P., Kucharski C., Bel A., Piwniwa A., Bloch G. Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophil-endothelial cell adhesion. A clinical study. *Circulation*. 1995; 92 (9 Suppl): 354-358. DOI: 10.1161/01.cir.92.9.354. PMID: 7586437.
 12. Newburger J.W., Jonas R.A., Wernovsky G., Wypij D., Hickey P.R., Kuban K.C., Farrell D.M., et al. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. *N Engl J Med*. 1993; 329 (15): 1057-1064. DOI: 10.1056/NEJM199310073291501. PMID: 8371727.
 13. Algra S.O., Jansen N.J., van der Tweel I., Schouten A.N.J., Groenendaal F., Toet M., van Oeveren W., et al. Neurological injury after neonatal cardiac surgery: a randomized, controlled trial of 2 perfusion techniques. *Circulation*. 2014; 129 (2): 224-233. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003312. PMID: 24141323.
 14. Caputo M., Pike K., Baos S., Sheehan K., Selway K., Ellis L., Stoica S., et al. Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass in low-risk paediatric heart surgery: a randomised controlled trial. *Heart*. 2019; 105 (6): 455-464. DOI: 10.1136/heartjnl-2018-313567. PMID: 30322847.
 15. Corno A.F., Bostock C., Chiles S.D., Wright J., Tala M.-T. Jn, Mimic B., Cvekovic M. Comparison of early outcomes for normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass in children undergoing congenital heart surgery. *Front Pediatr*. 2018; 6: 219. DOI: 10.3389/fped.2018.00219. PMID: 30175089.
 16. Andropoulos D.B., Hunter J.V., Nelson D.P., Stayer S.A., Stark A.R., McKenzie E.D., Heinle J.S., et al. Brain immaturity is associated with brain injury before and after neonatal cardiac surgery with high-flow bypass and cerebral oxygenation monitoring. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 139 (3): 543-556. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.08.022. PMID: 19909994.
 17. Cenini G., Hebisch M., Iefremova V., Flitsch L.J., Breitkreuz Y., Tanzi R.E., Kim D.Y., et al. Dissecting Alzheimer's disease patho- genesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci*. 2021; 110: 103568. DOI: 10.1016/j.mcn.2020.103568. PMID: 33068718.
 18. Nakagawa S., Deli M.A., Kawaguchi H., Shimizudani T., Shimono T., Kittel A., Tanaka K., et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*. 2009; 54 (3-4): 253-263. DOI: 10.1016/j.neuint.2008.12.002. PMID: 21240470.
 19. Hartung T. Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC — a t4 report. *ALTEX*. 2010; 27 (4): 285-303. DOI: 10.14573/altex.2010.4.285. PMID: 21240470.
 20. Jekarl D.W., Lee S.Y., Lee J., Park Y.J., Kim Y., Park J.H., Wee J.H., et al. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 75 (4): 342-347. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.12.011. PMID: 23391607.
 21. Zhao Y., Gan L., Ren L., Lin Y., Ma C., Lin X. Factors influencing the blood-brain barrier permeability. *Brain Res*. 2022; 1788: 147937. DOI: 10.1016/j.brainres.2022.147937. PMID: 35568085.
 22. Li L., Welser J.V., Dore-Duffy P., del Zoppo G.J., Lamanna J.C., Milner R. In the hypoxic central nervous system, endothelial cell proliferation is followed by astrocyte activation, proliferation, and increased expression of the alpha 6 beta 4 integrin and dystroglycan. *Glia*. 2010; 58 (10): 1157-1167. DOI: 10.1002/glia.20995. PMID: 20544851.
 23. Haile W.B., Gavegnano C., Tao S., Jiang Y., Schinazi R.F., Tyor W.R. The Janus kinase inhibitor ruxolitinib reduces HIV replication in human macrophages and ameliorates HIV encephalitis in a murine model. *Neurobiol Dis*. 2016; 92 (Pt B): 137-143. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.02.007. PMID: 26851503.
 24. Yeung Y.T., Aziz F., Guerrero-Castilla A., Arguelles S. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies. *Curr Pharm Des*. 2018; 24 (14): 1449 1484. DOI: 10.2174/1381612824666180327165604. PMID: 29589535.
 25. Muehlschlegel G., Kubicki R., Jacobs-LeVan J., Kroll J., Klemm F., Humburger F., Stiller B., et al. Neurological impact of slower re-warming during bypass surgery in infants. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2024; 72 (S 03): e7-e15. DOI: 10.1055/s-0044-1787650. PMID: 38909608.
 26. Bhalala U.S., Appachi E., Mumtaz M.A. Neurologic injury associated with rewarming from hypothermia: is mild hypothermia on bypass better than deep hypothermic circulatory arrest?. *Front Pediatr*. 2016; 4: 104. DOI: 10.3389/fped.2016.00104. PMID: 27734011.

Поступила 16.03.2026
Принята 08.07.2026