

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

ЕВТУШЕНКО АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ
ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ ПРИ
ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ В НОРМЕ И ПРИ
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

03.03.01 – физиология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Т.В. Козырева

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ. ТЕРМОРЕГУЛЯЦИЯ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ	11
1.1. Основные принципы терморегуляции	11
1.2. Терморегуляция при холодových воздействиях	21
1.3. Молекулярные механизмы терморечепции	28
1.4. Артериальная гипертензия. Модели артериальной гипертензии	38
1.5. Терморегуляция при артериальной гипертензии	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
2.1. Экспериментальные животные	46
2.2. Длительное температурное воздействие (адаптация к холоду)	46
2.3. Острое температурное воздействие	46
2.4. Метод аппликации ментола	48
2.5. Определение экспрессии генов	50
2.6. Статистический анализ данных	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
3.1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА	56
3.1.1. Термочувствительные TRP ионные каналы в структурах мозга	56
3.1.2. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса	59
3.2. ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ	62
3.2.1. Влияние длительной адаптации организма к холоду на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга	62
3.2.2. Влияние острого охлаждения на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса	64

3.2.3. Изменение экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов после острого охлаждения и восстановления глубокой температуры до исходного уровня	66
3.2.4. Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 агонистом ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе	69
3.3. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ У КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ.....	72
3.3.1. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса	72
3.3.2. Влияние острого охлаждения на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса.....	78
3.3.3. Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 агонистом ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе	80
3.3.4. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке – сравнение нормо- и гипертензивных животных	83
3.4. ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ИОННОГО КАНАЛА TRPM8 МЕНТОЛОМ НА ТЕРМОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ МЕДЛЕННОМ ГЛУБОКОМ ОХЛАЖДЕНИИ.....	87
3.4.1. Влияние аппликации ментола на регистрируемые параметры в термонеutralных условиях	87
3.4.2. Влияние аппликации ментола на параметры терморегуляторных реакций у нормотензивных крыс при медленном глубоком охлаждении.....	88
3.4.3. Влияние аппликации ментола на параметры терморегуляторных реакций у гипертензивных крыс при медленном глубоком охлаждении.....	91
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	95
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Система терморегуляции, обеспечивающая температурный режим всех процессов, протекающих в живом организме, представляет собой одну из важнейших гомеостатических систем. Как и любая функциональная гомеостатическая система, она включает в себя сенсорные образования – терморцепторы (афферентное звено), структуры центральной нервной системы, где осуществляется обработка температурной информации (в первую очередь гипоталамус – центральное звено системы терморегуляции), и исполнительные органы – эффекторное звено.

В настоящее время интенсивно ведутся исследования, касающиеся клеточных и молекулярных механизмов температурной чувствительности. На роль молекулярной основы термочувствительности претендуют различные ионные каналы и в наибольшей степени – недавно идентифицированные TRP ионные каналы, которые, по мнению целого ряда авторов (McKemy et al., 2002; Jordt et al., 2003; Patapoution et al., 2003; McKemy, 2005; Nilius, Flockerzi, 2014), и являются первичными детекторами изменений температуры у теплокровных животных. Наиболее признанными считаются 6 термочувствительных TRP ионных каналов. Два холодочувствительных, активирующихся при понижении температуры: ниже 17°C – TRPA1, и ниже 28°C – TRPM8 (McKemy, 2005; Karashima et al., 2009; McCoy et al., 2011); а также 4 теплочувствительных, которые активируются при повышении температуры: TRPV1 – от 42°C и выше, TRPV2 – от 52°C и выше, TRPV3 – в диапазоне 31-39°C, и TRPV4 – от 25 до 42°C (Jordt et al., 2003; Vay et al., 2012). Все вместе они охватывают диапазон температур, воспринимаемых большинством млекопитающих. Для некоторых TRP каналов показано наличие нетемпературных агонистов – ментол для TRPM8, горчичное масло и корица для TRPA1, капсаицин для TRPV1 (Hinman et al., 2006) и камфора для TRPV3 (Xu et al., 2006). Можно предположить, что их нетермическая активация вызовет сходные реакции, как и при температурном воздействии, что позволит оценить влияние активации TRP ионных каналов в

формировании температурного сигнала.

Проблемам терморегуляции с позиции интегрирования молекулярного и организменного уровня пока не уделяется достаточного внимания. Генетические механизмы температурной чувствительности также являются совершенно неисследованной областью. Исследования реакций, опосредованных TRP ионными каналами при температурных воздействиях, активно ведутся на культурах клеток, однако, функциональная роль этих ионных каналов в реакциях целого организма остается неясной. Поэтому вопрос, касающийся температурной чувствительности, как на периферии, так и в центральных структурах, и участия в этом различных TRP каналов, остается открытым. В связи с освоением территорий, климатической особенностью которых являются низкие температуры, не менее важными являются вопросы о механизмах изменения термочувствительности теплокровного организма при смене температурных условий обитания и возможном участии в этом TRP каналов.

На сегодняшний день термочувствительные TRP ионные каналы рассматривают как перспективные мишени терапевтических воздействий, так как показано их участие в патогенезе целого ряда заболеваний (Nilius et al., 2007; Okuhara et al., 2007; Liu et al., 2008; Vay et al., 2012; Zholos, Curtis, 2013).

Артериальная гипертензия, характеризующаяся стойким повышением артериального давления, является одним из самых распространенных заболеваний. Этиология этого заболевания до сих пор остается неясной. Наличие у теплокровного организма повышенного артериального давления ведет к изменению его реакций на температурные воздействия (Krista et al., 1979; Kirby et al., 1999; Chambers et al., 2000). Однако сведения о функционировании терморегуляторной системы при артериальной гипертензии немногочисленны и противоречивы. Остаются не до конца выясненными механизмы поддержания температурного гомеостаза, в том числе возможное участие термочувствительных TRP ионных каналов в системе температурного гомеостаза при артериальной гипертензии.

Изменения температурной чувствительности организма, происходящие под

действием температурных стимулов, а также наблюдаемые при артериальной гипертензии, могут быть связаны с изменением в работе тех или иных термочувствительных ионных каналов, что в свою очередь должно найти отражение в функционировании генома – уменьшении или увеличении экспрессии генов, кодирующих эти ионные каналы.

Цель исследования: Выявить функциональные изменения активности (экспрессии) генов термочувствительных TRP ионных каналов при температурных воздействиях на организм в норме и при артериальной гипертензии.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное исследование активности генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга, включая гипоталамус – центр регуляции висцеральных функций (терморегуляции и артериального давления).

2. Выяснить влияние длительной адаптации организма к холоду на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центральных структурах мозга.

3. Оценить влияние гипертензивного состояния на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса (переднем и заднем), а также периферическом органе иммунной системы – селезенке, у нормотензивных и гипертензивных животных.

4. Оценить влияние острого холодового воздействия на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе, в норме и при артериальной гипертензии.

5. Выяснить влияние активации периферического термочувствительного ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом, на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе в норме и при артериальной гипертензии.

6. Исследовать влияние активации периферического кожного ионного канала TRPM8 на терморегуляторные (метаболические и сосудистые) показатели у нормотензивных и гипертензивных животных при остром охлаждении.

Научная новизна работы

- Впервые проведено сопоставление и показана неравнозначная экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга. Экспрессия теплочувствительных TRP ионных каналов в мозге выше чем, экспрессия генов холодочувствительных TRP каналов. В функционально различных отделах гипоталамуса – переднем и заднем, наблюдаются различия в экспрессии генов TRP ионных каналов: в переднем гипоталамусе повышена экспрессия холодочувствительного ионного канала TRPM8, в заднем отделе гипоталамуса наблюдается более высокая экспрессия генов теплочувствительного ионного канала TRPV1 и, реагирующего на болевые низкие температуры, ионного канала TRPA1.

- Впервые показана вовлеченность геномного уровня регуляции при температурных воздействиях как длительных, так и острых. Длительная адаптация организма к холоду приводит к специфичным для гипоталамуса изменениям – снижению экспрессии гена ионного канала TRPV3, тогда как острое охлаждение приводит к повышению экспрессии гена ионного канала TRPV3.

- Впервые установлено, что наследственная стресс-индуцированная артериальная гипертензия сопровождается изменением экспрессии генов TRP ионных каналов в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, так экспрессия гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 снижена в переднем отделе гипоталамуса, а экспрессия гена теплочувствительного TRPV4 ионного канала повышена в заднем отделе гипоталамуса. Изменение экспрессии генов затрагивают также и периферические висцеральные органы – в селезенке наблюдается значительное снижение экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1.

- Впервые показано функциональное взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне изменения экспрессии генов. Активация периферического ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом приводит к сходным с острым охлаждением изменениям в экспрессии генов TRP ионных каналов. У нормотензивных животных наблюдается в том и другом случае повышение экспрессии гена ионного канала TRPV3 в заднем отделе гипоталамуса. У гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8*, активация периферического кожного ионного канала TRPM8, как и охлаждение, приводит к значительному увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса.

- Впервые показано, что снижение экспрессии гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 у гипертензивных животных сопровождается функциональными изменениями реакции организма на холод. У гипертензивных животных, в отличие от нормотензивных, активация ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом не вызывает уменьшения температурных порогов терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении.

Положения, выносимые на защиту

1. В функционально различных структурах мозга экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов неравнозначна, при этом уровень экспрессии теплочувствительных TRP ионных каналов во всех исследованных отделах мозга значительно выше, чем экспрессия генов холодочувствительных TRP ионных каналов. В функционально различных отделах гипоталамуса – переднем и заднем, наблюдаются различия в экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов.

2. В поддержание температурного гомеостаза при холодовом воздействии на организм как длительном, так и остром вовлечен геномный уровень регуляции активности термочувствительных TRP ионных каналов.

3. Наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия сопровождается изменением активности (экспрессии) генов TRP ионных каналов

в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, а также в периферическом висцеральном органе – селезенке. Изменения активности генов TRP ионных каналов в гипоталамусе в ответ на холодовое воздействие у нормо- и гипертензивных животных различны.

4. Взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне экспрессии генов изменено при артериальной гипертензии и сопровождается функциональными (метаболическими и сосудистыми) изменениями реакции организма на холод. У гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8*, ослаблена чувствительность к активации периферического кожного ионного канала TRPM8.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Настоящая работа объединяет молекулярно-генетический и организменный уровни исследования функциональной роли термочувствительных TRP ионных каналов. Полученные новые знания расширяют представления о роли термочувствительных TRP каналов в регуляции термозащитных реакций при действии холода на организм, позволяют приблизиться к пониманию физиологического значения этих каналов, а также молекулярных механизмов поддержания температурного гомеостаза в норме и при такой патологии как гипертензия. Кроме того полученные данные могут представлять собой платформу для планирования экспериментов, направленных на дальнейшее выяснение физиологической роли этих ионных каналов.

Полученные данные используются в курсе лекций «Физиология сенсорных систем» для студентов факультета естественных наук Новосибирского Государственного Университета.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены и обсуждены на XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011), The 4th International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation

(Rio de Janeiro, Brazil, 2012); VIII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2012), VII Сибирском физиологическом съезде (Красноярск, 2012), International Summer School: «Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies» (Zvenigorod, 2012); Всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века» (Москва, 2012); XXII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013); X международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2014); VII Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2015); XI международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2015); IV международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых отечественных (1) и иностранных (3) журналах, 13 тезисов в сборниках материалов конференций.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, выводы, список цитируемой литературы (433 источника). Работа изложена на 160 страницах, содержит 24 рисунка и 21 таблицу.

Соавторство и благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю профессору, д.б.н. Т.В. Козыревой; к.б.н. И.П. Вороновой за совместную работу и помощь в освоении метода количественного ОТ-ПЦР; Г.М. Храмовой за помощь в проведении физиологических экспериментов.

ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ. ТЕРМОРЕГУЛЯЦИЯ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

1.1. Основные принципы терморегуляции

Возможность поддержания температуры тела в узких пределах является величайшим приобретением эволюции, поскольку гарантирует стабильность регуляции всех жизненных функций. Определенный температурный режим является одним из основных условий для сохранения скорости обменных процессов в живом организме (Веселкин, 1963; Hochachka, Somero, 2002).

У различных организмов оптимальные температурные условия для течения обменных процессов неодинаковы. У пойкилотермных (экзотермных) животных температура тела изменяется в связи с колебаниями температуры внешней среды. Температура тела высших животных и человека поддерживается на определенном уровне, несмотря на изменения температуры внешней среды и воздействия других факторов – это гомойотермные (эндотермные) животные (Crompton et al., 1978). К группе гомойотермных организмов относятся также гетеротермные, у которых колебания температуры их тела превышают границы, свойственные гомойотермным животным, а периоды постоянной температуры тела сменяются периодами значительных ее колебаний, зависящих от изменений температуры среды. Это характерно для ранних этапов онтогенеза, состояния зимней спячки, а также для млекопитающих и птиц с очень малыми размерами тела (Проссер, 1977; Гурин, 1980; Слоним, 1986).

Привлечение нервной системы к регуляции температуры позволило гомойотермным животным достигнуть стабилизации температурных условий функционирования важнейших внутренних органов и центральной нервной системы, что освободило регуляцию обмена этих органов от постоянных колебаний, связанных с изменениями температуры внешней среды (Баркрофт, 1937; Бартон, Эдхолм, 1957).

Система терморегуляции – система с множеством сенсорных входов, в которой температура многочисленных точек организма воспринимается и интегрируется для контроля эффекторных процессов. С этой точки зрения температура любого участка организма представляет контролируемую величину, а температурный гомеостаз не регулируется по какой-то одной локальной температуре тела, регуляция его основана на суммации температурных сигналов разных частей организма (Hardy, 1961; Hammel, 1968; Benzinger, 1968).

В организме различают гомойотермное «ядро» и гетеротермную «оболочку». Между ними имеется перепад температур, величина которого зависит от условий жизнедеятельности и температуры внешней среды. В обычных условиях реакции, происходящие в «оболочке», удерживают оптимальную температуру в тканях «ядра» тела (Simon, 1986; Иванов, 1990; Kurz, 2008), путем взаимодействия процессов теплопродукции и теплоотдачи, которые в свою очередь контролируются за счет активации или угнетения термоэффекторов (Gordon, 1990; Козырева, Верхогляд, 1989, 1997; Romanovsky, 2007). Для поддержания температурного гомеостаза, система терморегуляции должна инициировать защитные реакции до того как изменения в температуре окружающей среды повлияют на температуру «ядра» тела (Morrison, Nakamura, 2011).

Для своего функционирования система терморегуляции использует ресурсы практически всех специфических физиологических систем организма. Это обусловлено более поздним развитием эндотермии, когда другие функциональные системы животных уже располагали «собственными» эффекторными органами (Минут-Сорохтина, 1972, 1987). Такая особенность системы терморегуляции позволила академику В.Н. Черниговскому (1969, 1985) высказать мысль о том, что терморегуляция теплокровных животных представляет собой надсистемный уровень организации.

Терморегуляция гомойотермных животных складывается из двух противоположных процессов – теплоотдачи, называемой еще физической терморегуляцией, и теплопродукции, или химической терморегуляции. Как

известно, теплоотдача с поверхности тела теплокровного зависит от изоляционных свойств «оболочки» – толщины подкожных жировых образований, изоляционных свойств меха, реакций пилоэрекции, тонуса кожных сосудов, изменения влагопотерь с поверхности кожи и дыхательных путей. Образование тепла происходит во всех тканях организма при биохимических реакциях, обеспечивающих жизнедеятельность клеток. Диапазон внешних температур, в котором у покоящегося организма теплообразование минимально и нет усиленных теплопотерь, получил название «зоны термонеutrальности» для данного организма (Hammel, 1968; Bligh, 1972; Romanovsky et al., 2002; Kingma et al., 2012).

Под действием как низких, так и высоких температур теплокровные животные используют вегетативные и поведенческие эффекторные реакции регулирования температуры тела (Nagashima, 2006; Terrien et al., 2011). В тех случаях, когда внешняя температура выше термонеutralной, у теплокровных организмов включаются реакции теплоотдачи. Происходит расширение сосудов кожи, возникает полипноэ, активизируется процесс потоотделения, возникают поведенческие реакции, направленные на то, чтобы избежать перегревания, – груминг, поиск более комфортных мест. При падении внешней температуры ниже термонеutralной первыми включаются реакции физической терморегуляции как наиболее экономные – пилоэрекция и констрикция сосудов на поверхности кожи. Если их оказывается недостаточно для поддержания температуры тела на нужном уровне, возникают реакции химической терморегуляции – повышается термогенез (Иванов, 1990).

Термогенез является важным компонентом поддержания температуры тела при действии низких температур (Morrison et al., 2008). Различают два вида термогенеза – сократительный и несократительный. По мнению К.П. Иванова (1990) сократительный термогенез – основной источник теплообразования при охлаждении. Он включает в себя терморегуляторный мышечный тонус и дрожь, что является дополнительной функцией скелетной мускулатуры (Якименко, 1982; Иванов, 1990; Morrison, Nakamura, 2011). Несократительный термогенез – это

теплопродукция, связанная с преобразованием метаболической энергии в процессах, в которые не вовлечено сокращение скелетных мышц. Основным органом, его осуществляющим, является бурая жировая ткань (Jansky, 1973; Cannon, Nedergaard, 2004; Clapham, 2012; Morrison et al., 2012). Определенное значение в этом процессе придается также внутренним органам – печени, почкам (Jansky, 1973). Реализуется несократительный термогенез на клеточном уровне путем снижения эффективности синтеза основных макроэргических соединений при сопутствующем увеличении доли прямого окисления жира (Скулачев, 1962). К настоящему времени открыты митохондриальные белки, так называемые разобщающие протеины, основной функцией которых является разобщение процессов окисления и синтеза макроэргов. Им придается большое значение в повышении выхода тепла при несократительном термогенезе (Andersson et al., 1997; Kikuchi-Utsumi et al., 1997; Bengtsson et al., 2000).

Надежное функционирование системы поддержания температуры тела, когда механизмы регуляции приводятся в действие задолго до изменения температуры «ядра», обеспечивается наличием в коже специфических сенсорных образований – терморцепторов, которые постоянно информируют организм обо всех температурных колебаниях внешней и внутренней среды (Hammel, 1968; Hensel, 1980; Гурин, 1980, 1989; Иванов, 1990). Выделяют три источника температурной рецепции – терморцепторы кожи, термочувствительные интерорецепторы внутренних органов и тканей и специфические термочувствительные нейроны центральной нервной системы (Stuart et al., 1961; Гурин, 1980, 1989; Иванов, 1990).

В многочисленных исследованиях были выявлены характеристики импульсной активности рецепторов, воспринимающих термическое воздействие, на основании чего и было выделено несколько их типов (Hensel, Voman, 1960; Минут-Сорохтина, 1972; Hensel, 1974):

1. Специфические холодовые рецепторы, обладающие в условиях устойчивой температуры тоническим типом активности с максимальным ритмом импульсов в зоне 20-30 °С.. На быстрые сдвиги температуры эти рецепторы

реагируют учащением импульсов в ответ на охлаждение и урежением импульсов в ответ на согревание.

2. Специфические тепловые рецепторы, имеющие максимум активности при температуре 38-43°C., на быстрые сдвиги температуры реагируют противоположно холодovým: учащением импульсов в ответ на согревание и урежением в ответ на охлаждение.

3. Механо-холодовые рецепторы – активны только при наличии механического раздражения кожи. На быстрые сдвиги температуры реагируют так же, как и холодové рецепторы: охлаждение вызывает в них кратковременное учащение, а согревание – урежение импульсной активности.

4. Рецепторы, чувствительность которых к механическому раздражению повышается с повышением температуры кожи.

5. Рецепторы, реагирующие на очень сильные болевые температурные раздражения – термонцицепторы.

Терморепторы имеют два типа активности – статическую и динамическую. Статическая активность – это постоянная импульсация при постоянной температуре кожи, причем разным значениям температуры кожи соответствуют различные уровни активности рецепторов. В термонейтральных условиях частота импульсации холодových терморепторов составляет 10-15 импульсов в секунду, а тепловых – всего 2-4 импульса в секунду (Akins, 1996). Динамическая активность – это резкое кратковременное изменение частоты импульсации рецепторов в результате быстрого сдвига температуры кожи (Hensel, 1980; Козырева, 1990). Наличие такой специфической динамической активности у терморепторов служит критерием как их термочувствительности, так и их подразделения на холодové и тепловые (Козырева, 1992).

Соотношение тепловых и холодových рецепторов в центре и на периферии различно: в центре преобладают тепловые, а на периферии – холодové рецепторы. Это может свидетельствовать, с одной стороны, о большей вероятности столкновения организма с холодowymi воздействиями внешней среды, а с другой, о большем значении периферических холодových рецепторов в

запуске холодозащитных реакций (Hensel, 1974; Козырева, 1992).

Импульсы от холодových рецепторов проводятся А- и С-волокнунами, а от тепловых рецепторов – С-волокнунами (Триумфов, 1974). Сигналы от периферических терморецепторов проводятся по двум сенсорным путям: медиальному лемнисковому (специфическому пути), включающему заднекорешковые нейроны, нейроны ядер задних столбов, вентробазальные ядра таламуса, проекционные зоны коры и спинно-таламическому (неспецифическому) полисинаптическому пути – через клетки задних рогов спинного мозга, затем через ретикулярную формацию ствола головного мозга к нейронам гипоталамуса, ядрам таламуса и коры (Глебова, Данилова, 1970; Тлеулин и др., 1973; Craig, 2002).

Участие нервных центров в терморегуляции. В настоящее время можно считать доказанным участие в терморегуляции переднего и заднего гипоталамуса, а также области перегородки, таламуса, ретикулярной формации среднего мозга, структур лимбической системы – гиппокампа и миндального комплекса, а также коры головного мозга и спинного мозга.

Современные сведения о терморегуляции, свидетельствующие об участии в процессах поддержания температуры тела многих отделов нервной системы, позволяют полагать существование в ЦНС иерархической организации контроля этих процессов (Kanosue et al., 1998; Nagashima et al., 2000; Nagashima, 2006).

Основной контроль осуществляется в гипоталамусе. Наибольшие нарушения, иногда даже полная потеря способности поддерживать температуру тела наблюдались при разрушении переднего и заднего гипоталамуса (Kluger, Heath, 1971). Это позволило исследователям считать именно эту структуру центром основных интегрирующих функций терморегуляторной системы.

Накаяма с соавторами (Nakayama et al., 1961) впервые обнаружили термочувствительные нейроны в гипоталамусе, которые отвечали как на тепловые, так и холодových стимулы. Дальнейшие исследования показали, что нейроны гипоталамуса обладают собственной температурной чувствительностью, способны изменять свою импульсную активность даже при очень незначительном

температурном воздействии на них (Watanabe et al., 1986; Brück, Zeisberger, 1990; Козырева, Пирау, 1994; Boulant, 1998). Заметные изменения частоты импульсации этих нейронов возникают при сдвигах температуры гипоталамуса всего на 0,2-0,5°C (Иванов, 1990). В термонеutralных условиях физиологические колебания температуры глубоких структур мозга составляют около 0,5 °C. В зависимости от изменения импульсации при сдвиге температуры термочувствительные нейроны гипоталамической области подразделяются на холодные и теплые так же, как и периферические терморецепторы (Хензель, 1960).

В работах ряда авторов (Boulant, Dean, 1986; Kozyreva, Pierau, 1994) было показано наличие трех типов термочувствительных нейронов в гипоталамусе у животных:

1). Нейроны, чувствительные к изменению температуры в диапазоне 35-38°C и нечувствительные или слабо чувствительные в области температур 38-41°C;

2). Нейроны, чувствительные к изменению температуры в диапазоне 38-41°C и нечувствительные в области 35-38°C;

3). Нейроны, чувствительные к изменению температуры во всем диапазоне исследованных температур 35-41°C.

По данным Hellon (1967), в преоптической области гипоталамуса нейроны, активность которых изменяется при сдвигах местной температуры, составляют около 10%. Среди них преобладают (около 80%) нейроны, реагирующие на повышение температуры. Ватанейбе с соавторами (Watanabe et al., 1986) также исследовали термочувствительность нейронов различных структур мозга. Согласно их данным содержание термочувствительных нейронов, а также соотношение теплых и холодных клеток для разных структур мозга неодинаково (Таблица 1.).

Из таблицы видно, что при переходе на более низкий уровень центральной нервной системы от гипоталамуса к продолговатому мозгу количество термочувствительных нейронов увеличивается. Причем, если количество термочувствительных клеток повышается только на 20%, то число

холодочувствительных нейронов возрастает в 15 раз. Изменяется и соотношение тепло - и холодочувствительных нейронов: в гипоталамусе оно составляет 20:1, в среднем мозге 5:1, в продолговатом мозге 2:1. В обычных условиях понижение температуры начинается с периферии, а не с «ядра», этим обстоятельством и объясняют меньшую чувствительность гипоталамических центров к холоду, чем к теплу (Хензель, 1960).

Таблица 1. Соотношение термочувствительных нейронов разной модальности в отделах мозга (Watanabe et al., 1986)

Область мозга	Количество нейронов, %		
	Теплочувствительные	Холодочувствительные	Термонечувствительные
Гипоталамус	40	2	58
Средний мозг	57	11	32
Продолговатый мозг	60	33	7

Были получены многочисленные данные о влиянии изменения локальной температуры переднего гипоталамуса на терморегуляторные реакции организма. Оказалось, что при локальном обогреве преоптической области переднего гипоталамуса наблюдается снижение температуры тела (Белявский, 1969), а при ее охлаждении – появление дрожи и вазоконстрикции кожных сосудов (Strom, 1960; Hammel et al., 1960). Все эти данные дали возможность полагать, что преоптическая область переднего гипоталамуса специфически чувствительна к изменению температуры притекающей крови и играет решающую роль в интегративных механизмах и инициации вегетативных терморегуляторных реакций (Zhang et al., 1997). Кроме этого было показано, что нейроны преоптической области гипоталамуса реагируют и на температурные раздражения периферических терморцепторов, являясь точками конвергенции температурных сигналов центрального и периферического происхождения (Хензель, 1960;

Иванов, 1984; Morrison et al., 2008). Показано также, что при поражении преоптической области гипоталамуса у животных в большей степени снижается способность к терморегуляции (Carlisle, 1969; Satinoff, 1970). Все это, а также некоторые экспериментальные и клинические наблюдения (Гурин, 1980; 1989) позволили сделать вывод, что передний гипоталамус (преоптическое ядро) в основном является термодетектором, тогда как задний – интегративной структурой.

Широкое разнообразие механизмов и процессов терморегуляции предполагает существование функциональных связей между гипоталамусом и другими отделами ЦНС, а также воздействие последних на гипоталамические центры. Одним из подтверждений участия в терморегуляторных актах многих структур головного мозга помимо переднего и заднего гипоталамуса может служить изменение электроэнцефалограммы, возникающее в ответ на термическое воздействие на организм в коре головного мозга, ретикулярной формации среднего мозга, гиппокампе и миндалевидном комплексе, перегородке (Майстрах, 1970, 1971).

Метод разрушения и удаления частей мозга, а также метод перерезок на различных уровнях мозгового ствола позволили, в какой-то степени, судить об участии той или иной структуры нервной системы в терморегуляторных процессах. Кроме того, была установлена возможность осуществления терморегуляции и при разрушении гипоталамических структур (Усачева, Дымникова, 1971; Усачева, 1971). Это указывает на то, что в самих нервных центрах возможны функциональные замещения деятельности поврежденных групп клеток и компенсация выпадающей центральной регуляции за счет стволовых образований и сегментарных спинномозговых рефлексов.

При перерезке спинного мозга на уровне шейных позвонков у животных возникала гипотермия, однако, уже через неделю снова появлялись терморегуляторные реакции (Вейнберг, 1940; Simon, 1967). Также было показано, что спинной мозг выполняет в терморегуляции три функции: функцию входа (как термочувствительная область), регулирующую функцию (добавочный

терморегулятор) и функцию выхода (усиление выходных сигналов, идущих из гипоталамуса). Локальное понижение или повышение температуры в спинномозговом канале приводило к возникновению дрожи и вазодилатации (Тлеулин, 1984; Simon, 1986). Этот факт свидетельствует о том, что спинной мозг может осуществлять терморегуляцию в отсутствие связей с высшими нервными центрами (Simon, 1967).

Мезэнцефалическая ретикулярная формация по данным Хензеля (1960) обладает способностью усиливать импульсы от холодовых рецепторов, по данным Amini-Sereshki (1977) в вентромедиальной ее части на уровне варолиева моста имеются нейроны, оказывающие тоническое тормозное влияние на механизмы холодовой дрожи. Облегчает развитие терморегуляторной реакции на охлаждение гиппокамп. Слабое электрическое раздражение гиппокампа, как оказалось, усиливает дрожь. Нейроны миндалевидного ядра облегчают возникновение терморегуляторной реакции в условиях действия тепла, усиливая импульсы от тепловых рецепторов. После разрушения этого образования мозга у кролика одышка начинается только тогда, когда ректальная температура достигает 38 °C и более (Hammel, 1968; Hensel, 1973).

Участие таламуса в терморегуляции, по мнению Hayward (1975), имеет специфические особенности. Изучая электрическую активность различных ядер таламуса, автор пришел к заключению, что они ответственны за «поведенческую» терморегуляцию. Позднее, другими авторами (Egan et al., 2005) также было показано участие таламуса в процессах терморегуляции.

Кора больших полушарий является наиболее сложной областью головного мозга. Разрушение различных областей коры головного мозга вызывало сдвиги температурного уровня в организме весьма небольшие (1-1,2°C) по сравнению со сдвигами температуры тела, развивающимися при разрушении, например, гипоталамических областей мозга (8-10°C) (Finger, 1970). Это позволило исследователям говорить о незначительной роли коры в регуляции температуры тела. Однако, применение других методов (электрофизиологического и метода условных рефлексов) подтверждает ее участие в процессах поддержания

температуры тела. Это может быть связано с образованием временных связей между корой больших полушарий и гипоталамическими центрами терморегуляции, а также возможностью условно-рефлекторного воспроизведения самых различных реакций терморегуляции (Слоним, 1952). Участие коры в осуществлении терморегуляторных реакций подтверждается и изменением электроэнцефалограммы под влиянием температуры окружающей среды (Takatani et al., 1967; Kawakami et al., 1969). Показано участие соматосенсорной коры и ассоциативной зоны коры в передаче и обработке информации, поступающей от кожных терморецепторов (Козырева, 1972; Casey et al., 1996; Davis et al., 1998; Craig et al., 2000; Egan et al., 2005). Кроме того есть данные о наличии собственной термочувствительности коры головного мозга (Ройтбак, Беказ, 1967; Козырева, Иванов, 1975).

Таким образом, терморегуляция представляет собой многоуровневую систему поддержания постоянства внутренней среды организма. Эта система организована единством взаимодействия периферических и центральных звеньев. Центром осуществления основных интегрирующих функций системы терморегуляции является гипоталамус. Однако, на сегодняшний день, в механизмах формирования температурного сигнала и температурных ощущений многое остается не выясненным.

1.2. Терморегуляция при холодовых воздействиях

При понижении температуры окружающей среды запускается каскад реакций, направленных на поддержание температурного гомеостаза. На изменение температуры окружающей среды в первую очередь отвечают кожные терморецепторы, реакция которых зависит от интенсивности охлаждения, то есть от скорости изменения кожной температуры (Davies, 1983; Козырева, 1992; Ткаченко и др., 2010).

Основными эффекторными физиологическими процессами, позволяющими поддерживать температуру тела в определенных пределах при действии холода на организм, являются регулируемые процессы теплоотдачи и теплопродукции

(Иванов, 1990; Lim et al., 2008). Важнейшей реакцией, направленной на уменьшение теплоотдачи при действии холода, является констрикторная реакция кожных кровеносных сосудов. При этом происходит снижение температуры кожи, что приводит к снижению температурного градиента между кожей и окружающей средой и в результате снижению теплоотдачи (Иванов, 1990).

Большое значение в физиологической защите организма на холоде имеет химическая терморегуляция – повышение теплопродукции (метаболическая реакция на холод). Увеличение теплопродукции, может включать в себя стимуляцию как сократительного термогенеза – повышение теплообразования в скелетной мускулатуре, так и несократительного термогенеза – усиление обменных процессов во внутренних органах (Иванов, 1990), в особенности в бурой жировой ткани (Иванов, 1990; Morrison, Madden, 2014; Morrison et al., 2014).

Важными показателями системы терморегуляции являются температурные пороги термозащитных реакций, которые зависят от активности центральных и периферических терморцепторов. Показано, что формирование терморегуляторных реакций происходит по-разному при быстром и медленном охлаждении (Козырева, Верхогляд, 1989, 1997). При медленных скоростях внешнего охлаждения, когда динамическая активность холодовых рецепторов кожи практически отсутствует, для запуска эффекторных реакций, в частности, повышения метаболизма, важен вклад как глубоких, так и поверхностных кожных температур, а значит и центральных, и периферических терморцепторов. При быстром охлаждении, когда появляется динамическая реакция кожных холодовых рецепторов, запуск метаболической реакции может наблюдаться и без изменения глубокой температуры тела. Причем, с увеличением динамической активности холодовых рецепторов кожи, что наблюдается при нарастании скорости охлаждения, происходит снижение порога метаболической реакции. При этом для реакции теплоотдачи, наоборот, характерна некоторая задержка (Козырева, Верхогляд, 1989). Наличие динамической активности кожных холодовых рецепторов значительно изменяет структуру терморегуляторного ответа на холод (Kozyreva, 1996; Ткаченко и др., 2010). Показано также, что в отличие от

медленного, быстрое охлаждение в большей степени способствует возникновению таких терморегуляторных реакций, как сужение сосудов и возникновение дрожи (Taniguchi et al., 2011).

Известно, что в реакциях организма на охлаждение участвует симпатическая нервная система, активация которой зависит от скорости охлаждения, то есть от характеристики афферентного сигнала терморцепторов (Козырева и др., 1999). При действии холода повышается активность симпатических волокон и увеличивается содержание норадреналина в крови (Depocas, Behrens, 1978; Jansky, 1995; Kozyreva et al., 1999a). Повышение концентрации норадреналина в крови при различного рода охлаждении может быть обусловлено выделением его из симпатических нервных окончаний, клеток хромаффинной ткани, а при более глубоких охлаждениях из надпочечников (Гурин, 1989). Ранее было показано, что введение экзогенного норадреналина приводит к изменению структуры метаболического ответа на холод (Jansky, 1995). Эксперименты с модулирующим влиянием норадреналина на терморцепторы кожи выявили изменение и порогов терморегуляторных реакций при охлаждении (Kozyreva et al., 1999b).

Изменения системы терморегуляции при адаптации теплокровного организма к холоду. Под физиологической адаптацией следует понимать совокупность морфофизиологических и биохимических особенностей организма, позволяющих данной особи, популяции или виду в целом существовать в определенных условиях среды. Как правило, это возникшие в индивидуальной жизни или генетически запрограммированные особенности направлены на уменьшение общего напряжения организма (Слоним, 1969; 1979). Исследование адаптации к условиям обитания в первую очередь тесно связано с вопросами термической адаптации и терморегуляции животных.

При температурной адаптации существенно изменяется функционирование многих органов и систем организма. Конечным результатом этих изменений является стабильное поддержание температурного баланса организма в новых условиях. Так, показано, что в условиях пониженных температур у

адаптированных к холоду животных ректальная температура и температура гипоталамуса не отличаются от этих показателей у контрольных животных, находящихся в тепле (Козырева, Якименко, 1979; Диверт, 1979; Kozyreva, 2006). Наряду с изменениями в органах, ответственных за теплопродукцию и теплоотдачу, изменяется и температурная чувствительность организма, как на уровне периферических, так и на уровне центральных структур (Козырева, Якименко, 1979; Козырева, 1992; Козырева, Пирау, 1994). Анализ полученных на сегодняшний день данных позволяет выделять морфологические и функциональные изменения в организме при адаптации теплокровного организма к холоду.

Изменения морфологического характера обуславливают, в основном, улучшение теплоизоляционных свойств организма. К ним относятся: повышение плотности и улучшение качества меха, утолщение подкожного жирового слоя (Hart, 1964), изменение размера и формы тела – приближение к форме шара для снижения теплоотдачи с поверхности (Проссер, 1977; Слоним, 1986), увеличение массы бурой жировой ткани. Развитие таких морфологических адаптивных изменений требует довольно длительного периода (месяцы, годы). Обычно им предшествуют функциональные изменения, которые требуют значительно меньшего времени для своего развития.

Функциональные изменения при адаптации организма к холоду, в свою очередь, можно подразделить на 1) изменения возможностей самих эффекторных органов и тканей и 2) изменения регуляторных характеристик системы терморегуляции – сдвиги температурных порогов реакций. Поддержание температурного гомеостаза в организме при длительном действии низких температур возможно лишь двумя путями: повышением теплопродукции или снижением теплоотдачи (Хаскин, 1975; Якименко, 1984).

К физиологическим реакциям, изменяющим теплоотдачу организма, относятся вазомоторные реакции кровеносных сосудов кожи и теплопотери с дыханием. При адаптации организма к холоду у многих животных и у человека наряду с другими признаками изоляционной адаптации имеют место также

снижение кровоснабжения в поверхностных тканях, уменьшение легочной вентиляции и снижение температуры выдыхаемого воздуха и испарительных теплопотерь с дыханием (Симонова и др., 1978; Симонова, 1980; Авцын, 1982; Якименко, 1984). Все это способствует сохранению тепла в организме.

После адаптации организма к холоду увеличивается мощность и физиологическая эффективность теплообразования. Это связано с повышением теплового эффекта сокращения мышц (Якименко, 1982, 1984; Иванов и др., 1970; Ткаченко, Иванов, 1971; Соболев, 1974) и активацией бурой жировой ткани (Jansky, 1967; 1995). Было обнаружено, что в ответ на охлаждение у животных повышается потребление кислорода, которое сопровождается усилением электрической активности скелетной мускулатуры. Уровень этой активности у адаптированных к холоду животных значительно ниже, чем у контрольных, которых содержали при комнатной температуре (Бисерова, Гебчинский, 1964; Иванов, 1990). Как было показано, в основе этих адаптивных процессов повышения теплообразования лежит изменение работы митохондрий клеток мышц и других органов, а именно, процесс разобщения дыхания и фосфорилирования (Скулачев, 1969). В результате этих изменений повышается термогенная функция органов (Скулачев, 1962; Хаскин, 1975).

В формировании и поддержании адаптивных изменений эффекторных реакций при адаптации животных к холоду важную роль играют симпатическая нервная система. В настоящее время является доказанным повышение активности симпатической нервной системы в процессе адаптации организма к холоду, сопровождающейся увеличением количества норадреналина, адреналина и их метаболитов. Наиболее высок обмен катехоламинов в первые дни адаптации, затем он понижается и к концу падает до исходного уровня (Стабровский, Коровин, 1971, 1972; Коровин, 1973; Хаскин, 1975; Пастухов, Хаскин, 1979). Показано, что введение норадреналина неадаптированным животным вызывает изменение интенсивности терморегуляторных реакций, сходные с теми, которые происходят при адаптации организма к холоду, а именно: повышение тонуса кожных сосудов и теплового эффекта сокращения скелетных мышц (Якименко и

др., 1971; Иванов и др., 1973; Слепчук, Румянцев, 1976), увеличение активности бурой жировой ткани, активацию липолиза (Панин, 1978).

Температурная чувствительность периферических терморцепторов и нейронов гипоталамуса при адаптации организма к холоду. Адаптация организма к холоду затрагивает не только изменение возможностей эффекторных органов и тканей, но и сдвиги температурных порогов реакций (Brück, Zeisberger, 1987; Козырева, Верхогляд, 1997), в частности метаболической и сосудистой реакций. При этом происходит смещение термонеutralной зоны в сторону более низких температур и как следствие снижение энергетических затрат на выживание в условиях холода. Изменение порогов холодозащитных реакций после адаптации организма к холоду свидетельствует об изменении регуляторных характеристик системы температурного гомеостаза, определяемых свойствами центральных и периферических терморцепторов (Козырева, 1992).

Долгое время считалось, что периферические терморцепторы не претерпевают адаптивных изменений (Минут-Сорохтина, 1987). Однако было показано, что характер функционирования как холодовых, так и тепловых рецепторов кожи при адаптации к холоду значительно изменяется (Козырева, Якименко, 1979, 1984; Козырева, 1992). Электрофизиологические исследования с регистрацией импульсной активности термочувствительных волокон *n.sapheni* у крыс показали, что при адаптации животных к низким температурам среды холодовые рецепторы кожи сохраняют свои основные особенности: колоколообразную зависимость их статической активности от температуры кожи и характерную для них динамическую реакцию. Однако характер как статической, так и динамической активности кожных холодовых рецепторов после адаптации организма к холоду изменяется (Козырева, 1992).

Одним из важных показателей статической характеристики терморцептора является температура, при которой активность его достигает своей максимальной величины. Существует взаимосвязь частотного диапазона статической активности рецептора и температурного диапазона его функционирования (Козырева, Якименко, 1978). При анализе импульсных характеристик холодовых рецепторов

было показано, что после адаптации организма к холоду уменьшается количество низкочастотных холодовых рецепторов с рабочей зоной в области низких температур кожи с максимумом активности при 24-25°C, и увеличивается количество рецепторов, функционирующих в диапазоне более высоких температур с максимумом активности при 34-35°C, то есть происходит перераспределение работающих кожных терморепцепторов (Козырева, 1994). Как у контрольных, так и у адаптированных к холоду животных основную массу холодовых рецепторов составляли рецепторы с максимумом активности при 28-30°C (61 и 76 %, соответственно). Статический максимум активности этой группы рецепторов достоверно снижался после адаптации к холоду. Значительно снижалась и динамическая активность этой группы рецепторов (Козырева, 1991).

Таким образом, было показано, что при длительной адаптации гомойотермного организма к холоду характер функционирования, а, следовательно, и температурная чувствительность холодовых рецепторов кожи изменяется, свидетельствуя о снижении чувствительности к холоду периферического афферентного звена системы терморегуляции (Козырева, 1991).

Что касается центральных терморепцепторов, сопоставление температурной чувствительности нейронов медиальной преоптической области гипоталамуса, где сосредоточены первичные термосенсоры, у контрольных и адаптированных к холоду животных показало, что после адаптации к холоду доля нейронов чувствительных в области низких температур (35-38 °C) уменьшается, тогда как количество нейронов чувствительных в области высоких температур (38-41 °C) возрастает (Козырева, Пирау, 1994; Козырева, 2003), то есть чувствительность в области низких температур снижается, а в области высоких температур – повышается. Это согласуется с данными о том, что после адаптации к холоду организм допускает большее падение температуры тела, не запуская холодозащитные реакции, а также с тем, что у адаптированных к холоду животных легче вызвать состояние перегрева и запуск реакций теплоотдачи (Cabanac, 1975). Таким образом, результаты работы Козыревой и Пирау (Козырева, Пирау, 1994) свидетельствуют о наличии адаптивных изменений центрального

температурного входа.

Модулирующее влияние на температурную чувствительность гипоталамических и кожных термосенсоров при адаптации к холоду оказывает симпатическая нервная система и ее медиатор норадреналин. В результате адаптации изменяется чувствительность нервных элементов гипоталамуса к некоторым нейротрансмиттерам, в том числе к норадреналину (Bruck, Zeiberger, 1986). Также в результате холодовой адаптации происходит повышение чувствительности к норадреналину холодовых рецепторов кожи (Козырева, 1991). Важная роль периферических терморецепторов в становлении и поддержании адаптационных перестроек в организме обусловлена, по-видимому, их прямой и обратной связью с симпатической нервной системой. Прямая связь дает возможность осуществления широкого многообразия эффекторных реакций, а обратная – возможность модуляции свойств терморецепторов в соответствие с функциональным состоянием организма (Козырева, 1991).

Таким образом, накоплен определенный материал, свидетельствующий о наличии изменений в функционировании центральных и периферических терморецепторов под влиянием как острого, так и длительного (адаптация) действия холода на организм, однако механизмы этих изменений на сегодняшний день остаются до конца не изученными и требуют дальнейших исследований. Вовлечен ли генетический уровень регуляции в поддержание температурного гомеостаза при изменении внешних температурных условий кратковременных и длительных остается неизвестным

1.3. Молекулярные механизмы терморцепции

Новейшие исследования с использованием методов генетической модификации и клонирования позволили выявить высокую температурную зависимость транспорта ионов через клеточную мембрану у группы мембранных белков (TRP), образующих ионные каналы, что дало возможность рассматривать эти белки как молекулярную основу термочувствительности (Patapoutian et al., 2003; Story et al., 2003).

TRP (*Transient Receptor Potential*) ионные каналы – это каналы, через которые может осуществляться реакция клетки на различные внешние стимулы (Вязовская и др., 2009). Ионные каналы TRP служат сенсорами для широкого спектра физических и химических раздражителей (Clapham et al., 2001; Clapham, 2003; Ramsey et al., 2006). Они отвечают на температурные, тактильные и болевые воздействия, осмолярность и другие стимулы (Clapham, 2003; MacDonald et al., 2006); вовлечены в механическую и вкусовую чувствительность, зрительное восприятие, пролиферацию (Bautista et al., 2007; Brayden et al., 2008; Lin, Corey, 2005; Venkatachalam, Montell, 2007). Кроме того, нарушение их деятельности может сигнализировать о наличии изменений в клетке или ее патологическом развитии (Zheng, 2013).

Большинство этих каналов пропускают через клеточную мембрану ионы кальция, а также некоторые другие катионы, главным образом натрия. В ответ на временное открытие ионного канала, которое назвали «транзиентным» (преходящим), генерируется импульс-потенциал (Pedersen et al., 2005). Впервые TRP каналы были обнаружены и исследованы в фоторецепторах дрозофилы (Cosens, Manning, 1969; Montell et al., 1985; Montell, Rubin, 1989).

По своей структуре TRP каналы представляют собой белок, чаще ансамбль гомологичных протеинов, располагающихся в мембране клетки (Рисунок 1.). Кроме плазматической мембраны, TRP ионные каналы также найдены во внутриклеточных мембранах (Dong et al., 2010). Эти белки имеют внутриклеточные амино- и карбокси- терминали, 6 трансмембранных доменов и петлю, расположенную между 5 и 6 сегментами (Minke, 2006), которая участвует в формировании поры канала, проницаемой для катионов (Schaefer, 2005). Несмотря на то, что каждый TRP канал характеризуется уникальной аминокислотной последовательностью, все они демонстрируют способность к тетрамеризации. Тетрамеризация основана на спонтанном образовании С-концевыми доменами четырех субъединиц структуры типа скрученной спирали, что является основополагающим в формировании функционально активной четвертичной структуры канала (Erler et al., 2006; Tsuruda et al., 2006;

Fujiwara et al., 2008). Субъединицы различных TRP каналов могут взаимодействовать между собой, образуя гетеромерные комплексы. Например, образование такого комплекса показано для TRPA1/TRPV1 (Salas et al., 2009).

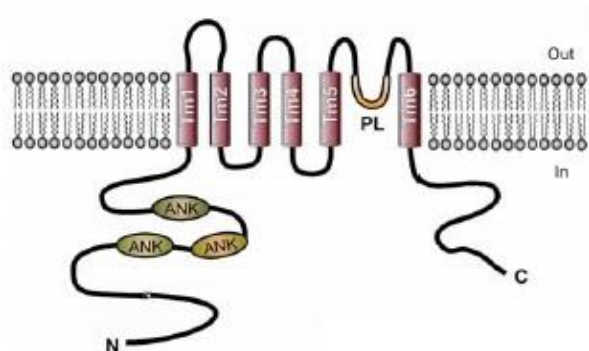


Рисунок 1. Структура TRP-канала:

Tm1-Tm6 – трансмембранные домены; PL – петля, участвующая в формировании поры канала; ANK – структурный домен (анкириновая цепочка). (O'Neil, Heller, 2005)

Известные на данный момент TRP ионные каналы составляют большое и гетерогенное суперсемейство, насчитывающее более 28 типов (Ramsey et al., 2006; Venkatachalam, Montell, 2007; Flockerzi, Nilius, 2014) и подразделяемое на подсемейства на основе полной гомологии и присутствию структурных доменов, таких как анкириновая цепочка (Montell, 2001; Minke, 2006). Анкирины – группа белков, входящих в состав плазматических мембран, обеспечивающих связи мембранных белков с цитоскелетом, и, по-видимому, участвующих в регуляции активности TRP каналов (Minke, 2006). Выделяют 7 подсемейств: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin transmembrane protein 1), TRPN (NOMPC, no mechanoreceptor potential C) (Pedersen et al., 2005; Ramsey et al., 2006; Flockerzi, Nilius, 2014).

К настоящему времени наиболее признанными являются шесть термочувствительных TRP ионных каналов: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 и TRPM8 (Таблица 2.) (Huang et al., 2006; Vay et al., 2012).

Таблица 2. Локализация и свойства термочувствительных TRP ионных каналов

Название	Преимущественная Локализация	Хромосомная локализация гена	Порог Активации (°С)	Нетермические агонисты	Блокаторы	Ссылки
1	2	3	4	5	6	7
TRPV1	Периферическая нервная система, головной мозг, спинной мозг, кожа, язык, мочевого пузырь, кишечник, ДСГ, ТГ	Человек 17p13.3 Крыса 10q24	при повышении температуры >43	Капсаицин, липоксигеназа, кислый рН, этанол, анандамид	Рутениевый красный, капсазепин	Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Ward et al., 2003; Trevisani et al., 2002; Ross, 2003
TRPV2	Периферическая нервная система, спинной мозг, ДСГ, ТГ, широко экспрессирован в разных тканях	Человек 17p11.2 Крыса 10q23	при повышении температуры >53	Фактор роста (мышь), каннабидиол, растяжение мембраны	Рутениевый красный	Caterina et al., 1999; Kanzaki et al., 1999; Muraki et al., 2003; Qin et al., 2008
TRPV3	Периферическая нервная система, ДСГ, ТГ, кератиноциты. Эпителий языка, носа, волосяной фолликул	Человек 17p13.3 Крыса 10q24	при повышении температуры >35	Камфора, карвакрол (орегано), тимол	Рутениевый красный	Xu et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2006; Latorre et al., 2009; Borbíró et al., 2011; Susan et al., 2013
TRPV4	Периферическая нервная система, кожа, почка, внутреннее ухо головной мозг, печень, трахея, сердце, гипоталамус, эндотелий, ТГ	Человек 12 q24.1 Крыса 12q16	при повышении температуры >24	Гипотонический раствор, анандамид, метаболит арахидоновой кислоты, апигенин, 4-альфа-форбол 12,13 дидеканоат, bisandrographolide A (BAA), ацетилхолин	Рутениевый красный	Strotmann et al., 2000; Wissenbach et al., 2000; Delany et al., 2001; Nilius, Droogmans, 2001; Nilius et al., 2001; Watanabe et al., 2002; Guler et al., 2002; Watanabe et al., 2003; Benham et al., 2003; Smith et al., 2006; Adapala et al., 2011; Ma et al., 2012; Bang et al., 2012
TRPM8	Периферическая нервная система, ДСГ, ТГ, простата (человек), скелетная и гладкая мускулатура, эпителий простаты, легких, мочевого пузыря	Человек 2q37.1 Крыса 9q35	при понижении температуры <28	Ментол, ицилин, эвкалиптол	Рутениевый красный, капсазепин	Tsavalier et al., 2001; Nealen et al., 2003; Tsuzuki et al., 2004; McKemy et al., 2002; Reid, Flonta, 2002; Peier et al., 2002; Stein et al., 2004; Mukerji et al., 2006; Macpherson et al., 2006; Vogt-Eisele et al., 2007; Voets et al., 2007; McCoy et al., 2011
TRPA1	Периферическая нервная система, ДСГ	Человек 8q13 Крыса 5q11	при понижении температуры <18	Изотиоцианат (горчица, хрен), коричный альдегид (корица), акролеин, аллицин (чеснок)	Рутениевый красный	Story, 2003; Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2005; Karashima et al., 2009

Примечание: ДСГ – дорсальные спинные ганглии, ТГ – тригеминальные ганглии; Хромосомная локализация генов, кодирующих белки TRP каналов у человека, указана по данным Venkatchalam, Montell (2007), у крысы – по данным электронной базы Ensemble (www.ensemble.org/index.html).

В ответ на температурное воздействие они способны значительно изменять ионную проницаемость и мембранный потенциал клетки с высоким коэффициентом Q_{10} (10-20) (Ramzey et al., 2006; Колесников, Быстрова, 2006; Latorre et al., 2007). Примечательно, что одни термочувствительные каналы могут активироваться при охлаждении мембраны, а другие – при ее нагревании по отношению к физиологическому среднему, обеспечивая клеткам, их экспрессирующим, возможность определять направление изменения температуры окружающей среды (Brauchi et al., 2004; Колесников, Быстрова, 2006). Все вместе они охватывают диапазон температур, воспринимаемых большинством млекопитающих. Также известно, что термочувствительные TRP каналы реагируют на природные пунгентные (острые) вещества – ментол (TRPM8), горчичное масло и корицу (TRPA1), капсаицин (TRPV1) (Hinman et al., 2006), камфору (TRPV3) (Xu et al., 2006). Есть данные, что эти вещества, ковалентно модифицируя белок канала, могут изменять его проницаемость (Hinman et al., 2006).

Восприятие холода может зависеть от активности ионных каналов, которые увеличивают свою проницаемость в ответ на охлаждение (Montell, 2003). В настоящее время в исследованиях на культуре тканей показано участие в этом нескольких типов ионных каналов (Viana et al., 2002; Jordt et al., 2004; McKemy, 2005). Основными являются TRPM8 и TRPA1 (McKemy et al., 2002; Voets et al., 2004).

TRPM8. Холодовой и ментоловый ионный канал TRPM8 имеет температурный порог активации менее 25-28 °С и обеспечивает ощущение неповреждающего холода. Кроме ментола TRPM8 может активироваться эвкалиптолом и ицилином – суперохлаждающим агентом, имеющим большую эффективность, чем ментол. Однако для воздействия ицилина необходимо повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Wei, Seid, 1983; McKemy et al., 2002). Наряду с охлаждающими агентами, которые активируют TRPM8, выделено несколько антагонистов. К ним относят капсазепин, ВСТС (N-(4- трет-бутилфенил)-4-(3-хлорпиридин-2-ил) тетрогидропиразин-1(2H) карбоксамид) и

thio-VCTC (Behrend et al., 2004; Madrid et al., 2006).

Показано, что TRPM8 экспрессируется на 15% сенсорных нейронов с малым диаметром заднекорешкового и тригеминального ганглиев (Pataroutian et al., 2003). Неален с соавторами (Nealen et al., 2003) показали, что TRPM8 экспрессируется на мелких пептидэргических заднекорешковых нейронах с низким порогом температурной активации при охлаждении (около 30°C). Вместе с тем, TRPM8 обнаружены и в несенсорных клетках: эпителиоцитах трахеи и клетках предстательной железы, где их функциональная роль остается неясной (Tsavaler et al., 2001). Увеличение экспрессии TRPM8 наблюдается при различных типах рака, в том числе простаты, молочной железы, легких и толстой кишки (Yee et al., 2010), это послужило поводом рассматривать этот ионный канал в качестве маркера рака (Bai et al., 2010).

TRPA1. Обнаружение холод-чувствительных, но ментол-нечувствительных нейронов предполагает возможность восприятия температуры ионными каналами, отличными от TRPM8 (Thut et al., 2003; Babes et al., 2004). Такими каналами оказались ионные каналы TRPA1. Они, по данным Стори с соавторами (Story et al., 2003), ответственны за восприятие болевого действия холода и активируются в диапазоне температуры ниже 17 °C. Установлено, что TRPA1 присутствует на тех сенсорных нейронах, которые не экспрессируют TRPM8. По-видимому, TRPA1 является сенсором холодового повреждения в ноцицептивных афферентах (McKemy, 2005). Ицилин, вызывающий холодовое ощущение, известный агонист TRPM8 (McKemy et al., 2002), активирует также и TRPA1, хотя и в меньшей степени (Story et al., 2003).

Восприятие тепла очень важно для живого организма. От холодовой смерти теплокровный организм отделяет температурный интервал примерно в 17-20 °C, а от тепловой 2-5 °C. Возможно поэтому, восприятие тепла осуществляется в широком диапазоне температур и при задействовании целого ряда TRP каналов.

Первые сведения о молекулах, обеспечивающих тепловое ощущение, связаны с клонированием капсаицин-чувствительного ваниллоидного рецептора TRPV1 – неселективного катионного канала, активирующегося при умеренно

горячих температурах, и его гомолога TRPV2, имеющего более высокий порог горячего. Эти каналы играют основную роль в нашем восприятии болевых ощущений в области высоких температур.

TRPV1. Чувствительный к капсаицину ваниллоидный ионный канал TRPV1 является наиболее изученным среди термочувствительных TRP каналов. Он принадлежит к семейству катионных каналов и активируется температурой выше 42°C (Weich et al., 2000). Ионный канал TRPV1 имеет высокую степень экспрессии на пептидэргических нейронах заднекорешковых и тригеминального ганглиев. Кроме сенсорных волокон TRPV1 обнаружен также на нейронах мозга, включая и спинной мозг, в коже, мочевом пузыре, на языке (Pataroutian et al., 2003). Его роль в восприятии тепла подтверждается данными на TRPV1-дефицитных мышцах, у которых значительно смещен порог теплового ответа (Caterina et al., 1997; Jordt et al., 2003). В настоящее время известно, что TRPV1 играет важную роль в поддержании нормальной температуры тела (Gavva et al., 2007; Gavva, 2008; Reilly et al., 2012).

TRPV2. Мембранный белок TRPV2 в культуре клеток млекопитающих показывает активацию теплом при температуре более 52 °C, превышающей болевой порог, и осмотическим набуханием клеток (Iwata et al., 2003), но не реагирует на капсаицин и повышенную кислотность среды (Caterina et al., 1999). Химические стимулы, в частности производные дифенила, также могут вызвать активацию TRPV2 (Hu et al., 2004; Chung et al., 2005). У мышей и крыс TRPV2 обнаруживается на сенсорных нейронах большого размера с Aδ болевыми волокнами и на нейронах среднего размера (Caterina et al., 1999). Кроме сенсорных нейронов TRPV2 выявлен также в мышечной ткани (Муслихов и др., 2010), в мозге и в селезенке (Kanzaki et al., 1999), что предполагает реакцию его и на физиологические термические стимулы кроме высокой температуры (Jordt et al., 2003).

TRPV3. Катионный канал TRPV3, хорошо проницаемый для Ca^{2+} , также оказался чувствительным к повышенной температуре и нечувствительным к капсаицину (Peier et al., 2002). По одним данным, ионные токи TRPV3

увеличиваются при температуре выше 39 °C (Smith et al., 2002), а по другим – он начинает слабо активироваться при теплых неболевых температурах около 33 °C (Peier et al., 2002). Как и в случае TRPV2, TRPV3-каналы активируются некоторыми производными дифенила, а также камфорой (Xu et al., 2006). В отличие от TRPV1 и TRPV2 экспрессия TRPV3 на сенсорных нейронах не столь однозначна. Есть данные о присутствии мРНК TRPV3 на сенсорных нейронах обезьяны (Xu et al., 2002), а также о том, что TRPV3 соэкспрессируется с TRPV1 на сенсорных нейронах человека (Smith et al., 2002). Однако в сенсорных нейронах мыши мРНК TRPV3 обнаружено не было (Peier et al., 2002), также у мышей не было обнаружено и реакции на агонист этого рецептора – камфору (Mogrich et al., 2005).

TRPV4. Ионный канал TRPV4 сначала был определен как осморептор, ответственный за изменение объема клетки (Nilius et al., 2001; Liedtke, Friedman, 2003), но в дальнейшем было обнаружено, что он может быть активирован непосредственно температурой выше 25°C без изменения осмолярности (Wissenbach, 2000). В настоящее время TRPV4 рассматривают как полимодальный канал, активирующийся различными стимулами (Nilius et al., 2003) и выполняющий ряд физиологических функций – термическая и механическая гипералгезия (Todaka et al., 2004; Grant et al., 2007), кожная терморегуляция, регуляция межклеточного соединения (Chung et al., 2003; Kida et al., 2012), рост астроцитов (Benfenati et al., 2007), участие в регуляции нейронной возбудимости гиппокампа (Shibasaki et al., 2007). TRPV4 экспрессируется в почке, мозге, внутреннем ухе, эндотелиальных клетках аорты (Liedtke, Friedman, 2003). Также показана его экспрессия на нейронах преоптической области гипоталамуса (Guler et al., 2002), которая ответственна за термогенез. Наличие экспрессии TRPV4 на нейронах гипоталамуса предполагает его вклад в центральные механизмы регуляции температуры. Кроме этого TRPV4 экспрессируется на эндотелиальных клетках, что может указывать на его возможный вклад в процесс локальной вазодилатации при обогреве (Watanabe et al., 2002).

TRPM3. Совсем недавно обнаружен ионный канал TRPM3, который также был отнесен к термочувствительным (Vriens et al., 2011; Straub et al., 2013; Ferrandiz-Huertas et al., 2014). На культуре клеток HEK293T показано, что TRPM3 реагирует на тепловой стимул при 40°C, но с коэффициентом Q_{10} меньшим, чем для остальных термочувствительных TRP ионных каналов (Vriens et al., 2011; Laing, Dhaka, 2015). Показана его экспрессия в соматосенсорных нейронах (Staaf et al., 2010; Vriens et al., 2011). TRPM3 экспрессируется также в головном мозге (Hoffmann et al., 2010; Zamudio-Bulcock et al., 2011), репродуктивной и сердечно-сосудистой системах, клетках гипофиза и гладких мышц, жировой ткани (Flockerzi, Nilius, 2014) и клетках поджелудочной железы (Wagner et al., 2008; Vriens et al., 2011). У TRPM3-дефицитных мышей отсутствует выраженная реакция избегания в ответ на повреждающее тепло, но не изменяется реакция на холодовые или механические стимулы (Vriens et al., 2011). На сегодняшний день физиологическая роль этого ионного канала недостаточно ясна, предполагают, что TRPM3 участвует в ощущении тепла, ноцицепции и тепловой гипералгезии (Ferrandiz-Huertas et al., 2014).

Ионные каналы TRPM2, TRPM4 и TRPM5 также показывают температурную чувствительность, но обычно не включаются в семейство термочувствительных TRP каналов, так как не экспрессируются в первичных соматосенсорных нейронах. Однако обнаружена экспрессия TRPM5 в первичных вкусовых рецепторах, где он играет важную роль в тепловой чувствительности (Talavera et al., 2005), а в последнее время появились свидетельства того, что TRPM2, TRPM4 и TRPM5 могут экспрессироваться и в соматосенсорных нейронах (Lechner et al., 2009; Staaf et al., 2010; Vay et al., 2012).

Физиологическую роль термочувствительных ионных каналов у млекопитающих исследовали с использованием генетического нокаута. Одними из первых, были поведенческие эксперименты на мышах-нокаутах по гену *Trpv1*, такие мыши демонстрировали пониженную чувствительность к капсаицину и болевым температурным стимулам (Caterina et al., 2000).

Ионный канал TRPV2 широко экспрессируется в разных тканях и, как

предполагается, играет определенную роль в болевой чувствительности (Caterina et al., 1999). Однако конкретная физиологическая и патологическая роль TRPV2 в тепловой ноцицепции остается невыясненной, так как мыши-нокауты по TRPV2^{-/-} не показали никаких очевидных изменений в температурной чувствительности (Link et al., 2010; Park et al., 2011).

Мыши с нокаутом гена *Trpv3* оказались неспособными различать температуру в диапазоне его активации 33-39 °С, кроме того, было обнаружено, что у них снижена чувствительность к болевым тепловым стимулам (Moqrich et al., 2005). Исходя из этого, авторами был сделан вывод, что TRPV3 принимает участие в формировании термического поведения в неболевом тепловом диапазоне и реакциях на болевые уровни термораздражений (более 50°C) (Moqrich et al., 2005). Считается, что TRPV3 также может участвовать в тепловой гипералгезии, так как показана его высокая экспрессия в кератиноцитах (Huang et al., 2008, Huang, Chung, 2013).

Мыши с нокаутом TRPV4^{-/-} предпочитали более высокие температуры окружающей среды на несколько градусов, что свидетельствовало о понижении чувствительности к нагреванию (Lee et al., 2005), также показана роль TRPV4 в тепловой гипералгезии (Todaka et al., 2004). Ионный канал TRPV4 участвует в поведенческих реакциях термопреферендума в безболевым диапазоне и в реакциях при умеренно горячих температурах (Todaka et al., 2004).

Следует отметить, что при снижении термочувствительности у TRPV1-, TRPV3- или TRPV4-дефицитных мышей она полностью не исчезает, что свидетельствует о наличии функционального резерва (Lee et al., 2005).

Исследования на TRPM8-дефицитных мышцах показали, что этот ионный канал является основным холодным сенсором в области неболевых температур (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Имеются данные, свидетельствующие о вкладе ионного канала TRPM8 в формирование температурного афферентного сигнала для инициации холодозащитных реакций, а также вовлеченности TRPM8 в регуляцию общего метаболизма (Kozyreva et al., 2010).

Что касается физиологической роли ионного канала TRPA1, то первоначально считалось, что TRPA1-дефицитные мыши проявляют нормальную чувствительность к температуре (Bautista et al., 2006). Однако другими исследователями (Kwan et al., 2006; Karashima et al., 2009) было показано, что дефицит по TRPA1 приводит к нарушению чувствительности в области холодных болевых температур. Имеющиеся данные указывают, что TRPA1 и TRPM8 вовлечены в механизмы формирования термочувствительности в области холодных болевых и неболевых температур, соответственно.

Таким образом, в настоящее время TRP ионным каналам придается значение первичных детекторов изменений температуры окружающей среды у теплокровных животных. Однако подавляющее большинство исследований, направленных на выяснение свойств этих ионных каналов при температурных воздействиях, проведены *in vitro* на культурах тканей, и к настоящему времени еще нет достаточно точного понимания физиологического значения этих каналов. Поэтому вопрос, касающийся температурной чувствительности, как на периферии, так и в центральных структурах, и участия в этом различных TRP ионных каналов, остается открытым и требует внимания исследователей. Еще более важно понять возможность участия TRP ионных каналов в процессах изменения температурной чувствительности теплокровного организма при смене температурных условий его обитания.

1.4. Артериальная гипертензия. Модели артериальной гипертензии

Артериальная гипертензия, основным симптомом которой является стойкое повышение артериального давления от 140/90 мм. рт.ст. и выше, – одно из самых распространенных в настоящее время заболеваний. По данным ВОЗ повышенное артериальное давление наблюдается у трети взрослого населения планеты. Она является одной из главных причин появления таких осложнений как инсульт, инфаркт миокарда и почечная недостаточность (WHO, 2013).

Гипертоническая болезнь (эссенциальная гипертония, первичная артериальная гипертензия) составляет около 90-95% всех случаев артериальной

гипертензии у людей (Garcia et al., 2003; Ressler, 2010). Этиология этого заболевания до сих пор остается неясной. На сегодняшний день многие исследователи полагают, что эссенциальная гипертензия является результатом взаимодействия наследственной предрасположенности к гипертензивным реакциям и внешних воздействий (психосоциальный стресс, диета с избытком соли и холестерина и т.д.). Генетический вклад в изменение артериального давления оценивается в 30-50% (Garcia et al., 2003; Ressler, 2010). За последнее десятилетие многие гены были включены в список генов-кандидатов гипертонической болезни. Часто генетические и средовые факторы взаимодействуют таким образом, что генетическая предрасположенность к повышенному артериальному давлению проявляется лишь при определенных условиях среды (Schork, 1997).

Таким образом, артериальная гипертензия является сложным, в большинстве случаев полигенным заболеванием, в развитии которого наряду с генетической предрасположенностью существенную роль играют воздействия определенных факторов среды.

Модели артериальной гипертензии.

В настоящее время для исследования патологий человека широко используются экспериментальные модели животных, что открывает новые возможности для комплексного изучения генетико-физиологических механизмов, лежащих в основе того или иного заболевания. Для исследования механизмов, приводящих к повышению артериального давления, выяснения роли генотипа и факторов окружающей среды в патогенезе гипертонической болезни, были созданы биологические модели артериальной гипертензии на животных.

Модель SHR. Для исследования механизмов формирования гипертонической болезни человека широко используется полученная для этой цели линия крыс с генетически обусловленной артериальной гипертензией SHR (spontaneously hypertensive rats) (Okamoto, Aoki, 1963), которая получена путем селекции из крыс линии Wistar-Kyoto (WKY). У крыс этой линии артериальное давление повышается спонтанно и мало зависит от средовых факторов. Линия

крыс SHR рассматривается в качестве модели эссенциальной гипертонии человека (Cierral et al., 1987), так как имеет сходные с ней морфологические и функциональные изменения органов и тканей (Постнов, 1972). Отмечена предрасположенность крыс этой линии к развитию ишемии и инсульта (Okamoto et al., 1974). Однако существует ряд недостатков (Nabika et al., 1991; Lezin et al., 1992; Johnson et al., 1992; Yao, Nabika, 2012), в том числе генетическая гетерогенность сублиний SHR (Zhang-James et al., 2013), что ограничивает использование данной линии в исследовании артериальной гипертензии.

Модель Dahl. Крысы линии Dahl подразделяются на соль-чувствительные (DS) и соль-резистентные (DR) на основе повышения их артериального давления на фоне высокосолевого (8% NaCl) диеты (Dahl et al., 1962). Крысы DS становятся гипертензивными и при нормальном, и даже при низком уровне соли, но только в возрасте нескольких месяцев. В отличие от них, крысы DR остаются нормотензивными даже при высокосолевого диете (Rapp, 1982; Bashyam, 2007).

Модель DOCA. DOCA соль-чувствительные крысы являются моделью сердечно-сосудистых заболеваний, особенно гипертонии и сердечной недостаточности (Doggrell, Brown, 1998). Выведены на основе повышения артериального давления в ответ на нефрэктомия, воздействие DOCA (дезоксикортикостерон ацетат) и солевую нагрузку 1% NaCl в питье (de Champlain et al., 1967, 1969; Schenk, McNeill, 1992). У них отмечаются большинство изменений характерных для заболеваний сердечно-сосудистой системы человека, включая гипертензию, фиброз, электрические нарушения проводимости и гипертрофия сердца и т.д. (Loch et al., 2006). В исследовании гипертензии эта линия используется как ренин-независимая модель (Li et al., 1996).

Модель НИСАГ. В результате многолетнего отбора из крыс линии Wistar в Институте Цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) была получена линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) (Маркель, 1985; Markel, 1992; Markel et al., 1999). В отличие от других селекционных моделей гипертензии, у которых имеется либо спонтанное повышение артериального давления, как у крыс линии SHR, либо при

воздействии высокосолевой диеты, как у крыс линий DOCA salt-sensitive и Dahl salt-sensitive, у крыс линии НИСАГ гипертензивный статус наиболее полно реализуется в условиях мягкого эмоционального стресса.

Данная линия (НИСАГ) характеризуется повышенным артериальным давлением. Систолическое базальное АД в среднем составляет 160-170 мм.рт.ст. у самцов и 145-150 мм.рт.ст. у самок. Систолическое АД при стрессе повышается по сравнению с базальным уровнем и составляет в среднем 200 и 175 мм.рт.ст. у самцов и самок соответственно (Markel, 1992). Крысы линии НИСАГ являются оригинальной экспериментальной моделью генетически обусловленной стресс-зависимой артериальной гипертензии. Нужно отметить, что эта линия крыс является признанной в мире оригинальной моделью гипертонической болезни человека (Rapp, 2000).

Крысы линии НИСАГ характеризуются повышенной эмоциональной возбудимостью, что проявляется в выраженной межсамцовой агрессии и повышенной поведенческой активности в тесте открытого поля (Маркель, 1986; Markel et al., 1989; Маркель и др., 2002). Отмечены изменения в концентрации и скорости обмена норадреналина, дофамина (Маркель и др., 2006) и серотонина в отделах мозга, участвующих в регуляции артериального давления и стресс-реактивности (Маркель и др., 2002). Изменены концентрации и соотношения α_1 -, α_2 - и β -адренорецепторов в гипоталамусе и продолговатом мозге (Маркель, Шишкина, 1992).

Показано, что у крыс этой линии стресс-зависимая гипертензия обусловлена изменениями функций гипофизарно-адренортикальной и симпатoadреналовой систем (Маркель и др., 2006). Это находит выражение в увеличении концентрации адреналина в мозговом слое надпочечников и повышении активности основных ферментов его биосинтеза – тирозингидроксилазы, дофамин- β -гидроксилазы и фенилэтанолламин-N-метилтрансферазы (Шорин и др., 1990; Маханова и др., 1997). У них также повышена чувствительность артериальных сосудов к действию норадреналина, по сравнению с нормотензивными крысами (Балакирева и др., 1998). Отмечена гиперплазия мозгового вещества надпочечников у

взрослых животных с выраженной артериальной гипертензией (Бузуева и др., 2006). Наиболее характерные структурные изменения в надпочечниках крыс НИСАГ описаны в клубочковой зоне коры, продуцирующей минералокортикоиды (Бузуева и др., 1998; Бузуева и др., 2000).

Крысы гипертензивной линии НИСАГ характеризуются рядом морфофизиологических показателей, характерных для развития этой патологии (Маркель и др., 1992; Максимов и др., 1999; Markel et al., 1999; Бузуева и др., 2000; Хворостова и др., 2001; 2003; Amstislavsky et al., 2005; Антонов и др., 2010). Это, прежде всего, повышенный уровень артериального давления в покое и при стрессе, гипертрофия левого желудочка сердца, характерные изменения сосудов (Шмерлинг и др., 1996; Коростышевская и др., 2001), увеличенная толщина стенок мелких артерий (Маркель и др., 1985, Максимов и др., 1999; Markel, 1992). Отмечена склонность к возникновению инфарктов миокарда, которые легко могут быть спровоцированы инъекцией адреналина (Якобсон и др., 1995).

У крыс НИСАГ найдены также биохимические изменения на уровне клеточных мембран и связанные с этим нарушения транспортных функций: снижение активности фермента – почечной Na,K-АТФазы, регулирующего транспорт ионов Na^+ и K^+ (Лопина и др., 1991). Обнаружены изменения в электролитном составе в разных тканях и плазме крови (Антонов и др., 1998; Ефремов и др., 1997; Федосеева и др., 2011), в частности повышена концентрация натрия в плазме крови (Федосеева и др., 2011), что характерно для гипертонической болезни. Показаны также изменения в метаболизме кальция (Постнов и др., 1980).

Линия крыс НИСАГ моделирует такое состояние, при котором имеется выраженная генетическая наследственная предрасположенность к развитию артериальной гипертензии в условиях даже мягкого эмоционального стресса. Поскольку, одним из важнейших факторов формирования артериальной гипертензии человека является психоэмоциональный стресс, крысы линии НИСАГ представляют собой одну из наиболее подходящих моделей для изучения развития гипертонической болезни.

1.5. Терморегуляция при артериальной гипертензии

Температуру рассматривают как один из факторов, способных оказывать воздействие на величину артериального давления. В связи с этим, многие исследователи отмечают наличие ассоциации между колебаниями артериального давления и температурой окружающей среды (Isezuo, 2003; Modesti et al., 2006; Murakami et al., 2011; Chen et al., 2013), а также связь между изменениями температуры окружающей среды и увеличением частоты возникновения гипертонической болезни (Marshall et al., 1988).

Данные, касающиеся функционирования терморегуляторной системы при артериальной гипертензии, немногочисленны и противоречивы. По некоторым данным температура «ядра» у гипертензивных крыс линии SHR выше на 1°C, чем у нормотензивных, что обусловлено повышенной теплопродукцией, которая не компенсируется повышенной теплопроводностью тканей и испарительной, респираторной теплоотдачей (Collins, Hunter, 1987; Price, Wilmoth, 1990). Надо отметить, что другие авторы не обнаружили подобных различий. По данным Berkey с соавторами (Berkey et al., 1990), гипертензивные крысы SHR не имеют повышенную температуру «ядра», но при тепловом стрессе температура тела у этих животных значительно увеличивается по сравнению с нормотензивными крысами. В моделях теплового стресса отмечается нарушение теплового баланса у гипертензивных крыс SHR (Wright et al., 1977; Barney et al., 1999). Показано также, что при умеренных физических нагрузках в тепле крысы SHR демонстрируют существенные различия в теплопродукции и теплоотдаче в сравнении с нормотензивными (Campos et al., 2014). O'Donnell и Volicer (1981) отмечают, что у этих крыс наблюдается дисфункция терморегуляторной системы, которая имеет центральное происхождение.

На линии мышей со спонтанной гипертензией (линия SHM) показано, что изменение у них тепловой чувствительности связано с нарушением синтеза белков теплового шока (белков стресса), что сопровождается повышенной экспрессией гена основного стрессового белка HSP70 (Malo et al., 1988; Hamet et al., 1994). В отличие от теплового стресса, приводящего к повышению

артериального давления, хроническое действие тепла снижает базальное давление у мышей линии SHM до уровня нормотензивных животных. Однако после прекращения теплового воздействия, базальное давление возвращается к исходному, свойственному гипертоникам, уровню (Malo et al., 1990).

Эпидемиологические и клинические исследования показали, что вероятность развития сердечно-сосудистых заболеваний значительно увеличивается в зимний период и холодную погоду (Marshall et al., 1988; Hopstock et al., 2011; Luo et al., 2012). Холодовое воздействие усугубляет течение гипертонической болезни через взаимодействие симпатoadrenalовой и ренин-ангиотензиновой систем (Luo et al., 2012). Под действием холода увеличивается активность симпатической нервной системы (Watanabe et al., 2002; Sun, 2010). Ренин-ангиотензиновая система играет важную роль в инициации и поддержании высокого кровяного давления в модели холодовой гипертензии (Peng, Philips, 2001; Sun et al., 2003).

Воздействие холода приводит к повышению систолического артериального давления (Blumberg et al., 2001; Peng, Philips, 2001), о чем свидетельствует и холодовой прессорный тест (Toto-Moukouo, 1993). У гипертензивных крыс SHR увеличение артериального давления и уровня катехоламинов в плазме крови под действием холода более выражено, чем у нормотензивных (Picotti, 1982; Chambers et al., 2000). Длительное действие холода способствует развитию холодовой гипертензии (Fregly et al., 1989; Sun et al., 2003). При этом также наблюдается повышение концентрации адреналина и норадреналина в плазме крови (Stein et al., 1998). Центральные α_1 -адренорецепторы и кортикотропин, участвующие в стимуляции гемодинамического ответа на холод, могут быть ответственны за развитие гипертензии (Tan et al., 2003). В экспериментах с блокадой α_1 – и β – адренорецепторов показан их вклад в формирование терморегуляторных реакций при действии холода, различающийся у гипертензивных и нормотензивных животных (Ткаченко, Козырева, 2010).

В экспериментах на крысах линии НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией были исследованы

терморегуляторные реакции в ответ на охлаждение. Обнаружено, что гипертензивные крысы по сравнению с нормотензивными более чувствительны к холодovому воздействию – для них характерно снижение температурных порогов сосудистой и метаболической реакций, а также повышение величины сосудистой реакции при быстром охлаждении (Ломакина и др., 2002).

Приведенные выше данные позволяют выдвинуть предположение о различии в температурной чувствительности у нормо- и гипертензивных животных. Однако сведения о функционировании терморегуляторной системы при артериальной гипертензии немногочисленны и противоречивы. Остаются не до конца выясненными механизмы поддержания температурного гомеостаза, в том числе возможное участие термочувствительных TRP ионных каналов в системе температурного гомеостаза в норме и при артериальной гипертензии, в термoneйтральных условиях, а также при действии низких температур на организм.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Экспериментальные животные

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar, нормотензивной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и линии с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ), полученной путем многолетнего отбора в ИЦиГ СО РАН (Маркель, 1985; Markel, 1992). Среднее систолическое давление у крыс линии НИСАГ составляло $174,5 \pm 1,47$ мм.рт.ст., у нормотензивной линии WAG $123,5 \pm 2,15$ мм.рт.ст. Вес животных – 250-350 грамм. Всего в работе было использовано 159 животных.

Животные содержались в стандартных условиях вивария, в индивидуальных клетках, со свободным доступом к воде и корму. Содержание экспериментальных животных и все процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными от 24 ноября 1986 (86/609/ЕЕС).

2.2. Длительное температурное воздействие (адаптация к холоду)

Адаптация животных к холоду проводилась в течение 5 недель при температуре окружающей среды $+4+6$ °С и освещении 12 часов – свет / 12 часов – темнота (Hart, 1964). Контрольные животные в течение этого времени находились в стандартных условиях вивария при температуре $+20+22$ °С. Все животные содержались в индивидуальных клетках, со свободным доступом к воде и корму. По истечении срока адаптации животные были декапитированы для получения проб структур мозга – фронтальной коры, гипоталамуса, среднего мозга и гиппокампа.

2.3. Острое температурное воздействие

В экспериментах использовались два типа низкотемпературного воздействия, различающихся по скорости изменения температуры кожи живота: быстрое и медленное глубокое охлаждение, отличающиеся наличием (быстрое

охлаждение) или отсутствием (медленное) динамической активности холодочувствительных афферентов кожи. В качестве контроля использовались животные, прошедшие всю процедуру эксперимента, но без холодового воздействия. Для устранения эмоционально-стрессорной компоненты, во время проведения опытов все животные были наркотизированы (этамилал-натрий (нембутал) в дозировке 50 мг/кг).

Схема проведения быстрого и медленного охлаждения. Эксперименты проводились при температуре окружающей среды $+21+24^{\circ}\text{C}$. Во время эксперимента животные были наркотизированы. После наступления наркотического сна удалялась шерсть в области живота, присоединялись термопары и регистрационные датчики. Животное помещалось на термостатируемый столик с поддерживаемой температурой 38°C . В термонейтральных условиях регистрировались исходные терморегуляторные параметры, после чего животные подвергались воздействию.

Область живота площадью 25 см^2 охлаждалась с помощью термоды. При быстром охлаждении скорость снижения температуры кожи в области приложения холодового стимула составила $0,1^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, что обеспечивало присутствие динамической активности кожных холодовых рецепторов. При медленном охлаждении скорость снижения температуры кожи в области приложения холодового стимула составила $0,005-0,008^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, что исключало появление динамической активности кожных холодовых рецепторов. Быстрое и медленное охлаждение продолжалось до снижения глубокой (ректальной) температуры тела на 3°C . Длительность быстрого охлаждения составила около 10-15 мин, медленного – около 20-25 мин.

В течение эксперимента непрерывно регистрировали терморегуляторные параметры: ректальная температура, температура изолированного от среды участка кожи ушной раковины, температура кожи хвоста, внутрикожная температура охлаждаемой поверхности живота, общее потребление кислорода, концентрация CO_2 в выдыхаемом воздухе и электрическая активность мышц шеи. Анализ и обработка результатов осуществлялась с помощью приборов и

программы AcqKnowledge (BIOPAC Systems, Inc., США).

Изменение температуры кожи живота позволяло определить скорость охлаждения и оценить пороговую кожную температуру возникновения термозащитных реакций. По ректальной температуре судили об изменении глубокой температуры тела и рассчитывали пороговую глубокую температуру эффекторных реакций. Метаболическая реакция организма оценивалась по изменению общего потребления кислорода, который отражает общий термогенез (сократительный и несократительный) и по изменению электрической активности мышц, отражающей сократительный термогенез. Концентрация углекислого газа в выдыхаемом воздухе позволяла производить вычисление дыхательного коэффициента (CO_2/O_2), характеризующий преимущественный субстрат окисления. Увеличение дыхательного коэффициента свидетельствует о преимущественном использовании углеводов в качестве субстрата окисления, снижение этого показателя отражает переход на липидный обмен. О констрикторной реакции кожных сосудов и изменении теплоотдачи судили по кожной температуре ушной раковины и хвоста.

За начало изменения кожных и ректальной температур принималось их снижение на $0,1^\circ\text{C}$, за начало метаболической реакции – изменение потребления кислорода на $1 \text{ мл/мин}\cdot\text{кг}$, общего выделения углекислого газа – $1 \text{ мл/мин}\cdot\text{кг}$, для мышечной активности – 1 мкВ .

2.4. Метод аппликации ментола

В наших экспериментах выполнялась аппликация 1% суспензии ментола в физиологическом растворе. В качестве контроля – аппликация физиологического раствора. При выборе контроля руководствовались тем, что в эксперименте физиологический раствор являлся растворителем для ментола. Аппликация осуществлялась на кожу живота, в области последующего приложения холодого стимула.

Аппликация ментола производилась на предварительно подстриженную область живота крысы площадью 25 см^2 . Во время аппликации

наркотизированное животное находилась на термостатируемом столике, температура которого поддерживалась на уровне 38 °С. Между поверхностью живота и термостатируемым столиком располагался трехслойный пакет беззольного фильтра и один слой полиэтилена, отделяющий пакет фильтров от столика. Полиэтилен использовался для предотвращения попадания вещества на поверхность столика. На пакет фильтров наносился 1 мл вещества для аппликации. Вещество предварительно разогревали в водяной бане до 38 °С – температуры, близкой к температуре кожи живота и термостатируемого столика. Продолжительность аппликации составляла 20 мин. Сразу после аппликации трехслойный пакет беззольных фильтров и полиэтилен удаляли и на их место подкладывали на 2 минуты один слой чистого беззольного фильтра для снятия (впитывания) остатков апплицируемого вещества с поверхности кожи живота. Через 5 минут после удаления фильтра с остатками вещества начинали охлаждение. Охлаждение проводилось по описанной выше схеме.

На рисунке 2. представлена схема проведения острого охлаждения с предварительной аппликацией 1% суспензии ментола в физиологическом растворе или физиологического раствора (контроль).

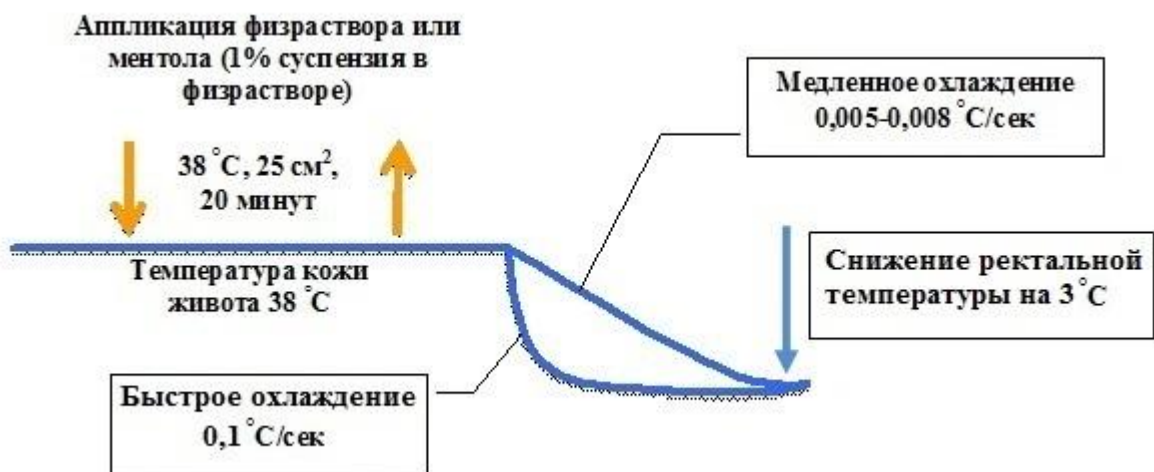


Рисунок 2. Схема проведения быстрого и медленного глубокого охлаждения с предварительной аппликацией 1% суспензии ментола в физиологическом растворе или физиологического раствора (контроль)

2.5. Определение экспрессии генов

После окончания эксперимента животных декапитировали и забирали биологический материал: структуры головного мозга – гипоталамус, фронтальную кору, гиппокамп, средний мозг; в качестве периферического органа была взята селезенка. Пробы, помещенные в стерильные пробирки «Эппендорф», замораживали жидким азотом и хранили при -70°C до выделения суммарной РНК.

Суммарная РНК была выделена экстракцией фенолом, гуанидинизоцианатом и хлороформом по методу Chomczynski, Sacchi (1987). Пробы суммарной РНК разводили дистиллированной водой, обработанной диэтилпиноксикарбонатом (DEPC), до концентрации 0,15 мкг/мкл и хранили при температуре -70°C .

Экспрессию генов определяли количественным методом ОТ-ПЦР (Науменко, Куликов, 2005; Kulikov et al., 2005; Kulikov, Naumenko, 2007). Метод основан на том, что на матричной РНК, выделенной из интересующей ткани, с помощью реакции обратной транскрипции (ОТ) нарабатывают комплементарную к ней ДНК, с которой уже и работают методом ПЦР – увеличивают количество нужных фрагментов до величин, поддающихся регистрации.

В работе были использованы следующие реактивы:

1. Таq ДНК полимеразы («СибЭнзим», Россия);
2. MMLV обратная транскриптаза («Биосан», Россия);
3. dNTP – набор трифосфатов («СибЭнзим», Россия);
4. Tris («Sigma», США);
5. HCl («Реахим», Россия);
6. Triton X-100 («Panreac», Испания);
7. SDS («Applichem», Darmstadt);
8. EDTA («Applichem», Darmstadt);
9. KCl («Panreac», Испания);
10. NaCl («Реахим», Россия);
11. MgCl₂ («Panreac», Испания);

12. MnCl₂ («Aldrich», Германия);
13. DTT (Германия);
14. Гуанидинизоцианат («Helicon», Россия);
15. DEPC («Applichem», Darmstadt);
16. Бромистый этидий (1%) («Applichem», Darmstadt);
17. Агароза («Helicon», Россия);
18. Краситель «Оранжевый G» («Panreac», Испания);
19. Сахароза («Диам», Россия);
20. ДНК маркер pBlueSK/MspI («Биосан», Россия);
21. Фенол («Реахим», Россия);
22. Хлороформ («Реахим», Россия);
23. Изопропанол («Реахим», Россия);
24. Этанол 75% («Реахим», Россия);
25. Борная кислота («Panreac», Испания).

Все праймеры (Таблица 3.), использованные в настоящем анализе, были разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide, и синтезированы в компании «Биосинтез» (Россия). Для ионного канала TRPV1 у крыс описано несколько сплайсинговых вариантов мРНК (Schumacher et al., 2000; Tian et al., 2006). В нашей работе праймеры для гена *Trpv1* были подобраны по последовательности, соответствующей 13 экзону канонического *Trpv1*, так, что могут отжигаться на всех известных сплайсинговых вариантах. Таким образом, измеренная нами экспрессия гена *Trpv1*, представляет собой суммарную экспрессию всех известных сплайсинговых вариантов *Trpv1*.

Для определения числа копий геномной ДНК в пробах использовали праймер для гена триптофангидроксилазы-1 (*Tph1*). Выбор этого гена обусловлен тем, что он не экспрессируется в головном мозге (Walther et al., 2003). Амплифицируемый участок гена *Tph1* может включать в себя интрон. ПЦР продукт будет иметь длину 283 пар нуклеотидов (с интроном), если он амплифицируется на ДНК. При синтезе молекулы РНК на молекуле ДНК как на

матрице участки, соответствующие интронам, удаляются. Поэтому длина ПЦР продукта, синтезированного на молекуле РНК, будет равна 134 пар нуклеотидов. Это позволяет однозначно различить продукты ПЦР геномной ДНК и РНК.

В настоящем анализе в качестве внешнего стандарта использовали геномную ДНК крысы известной концентрации. В качестве внутреннего стандарта – гены «домашнего хозяйства» – ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*) и ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Уровень мРНК интересующего нас гена пересчитывался на уровень мРНК гена *Polr2a* или *Ppia* и выражался в числе копий мРНК соответствующего гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства».

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности, характеристики праймеров, использованные для количественного определения уровня мРНК термочувствительных TRP ионных каналов в мозге и селезенке крыс

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)	Количество циклов амплификации
<i>Trpv1</i>	F 5'-ATGGAGTCCACACCACACAAG R 5'-TGAGCATGTTGAGCAGAAGG	60	211	34
<i>Trpv2</i>	F 5'-CCAAGCCCCTCGTCAATGCCC R 5'-GAGGTGAACATCCGCTCCATTCTCTAC	60	131	30
<i>Trpv3</i>	F 5'-CATGTACCAACCAGCCTGAG R 5'-GCGTGAGACCGTCATTGTT	56	222	35
<i>Trpv4</i>	F 5'-TCTGGTCAC CCTCCTGAATC R 5'-CTTGCTCTCCTTGGACACCT	63	298	36
<i>Trpm8</i>	F 5'-GAAGCCCATTGACAAGCACAAG R 5'-ACGAAGACCAGGGCATAGAG	64	189	36
<i>Trpa1</i>	F 5'-TTTGGAAAAGCAGCACGAG R 5'-TGGGTGGCTAATAGAACAATGTG	60	193	36
<i>Polr2a</i>	F 5'-TTGTCGGGCAGCAGAACGTG R 5'-CAATGAGACCTTCTCGTCTCC	64	186	29
<i>Ppia</i>	F 5'-CCGACTGTGGACAACCTAAT R 5'-ACTTGAAGGGGAATGAGGAAA	61,5	168	28
<i>Tph1</i>	F 5'-GAAAGTATTTTCGCAGAGCTGG R 5'-GGCGTGGGTTGGGTAGAGTTTGT	62	283 с интроном 134 без интрона	38

Реакция обратной транскрипции (RT). Обратная транскрипция выполнена по следующей схеме (Науменко, Куликов, 2005). Общая РНК (8 мкл, или 1,2 мкг) была смешана со 180 нг случайного праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкмольями стерильного KCl в объеме 16 мкл, денатурирована при 94 °С в течение 5 минут, после чего был проведен отжиг при 41°С в течение 15 минут, затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (150 ед.), буфер Tris-HCl (pH=8.3, 0,225 мкмоль), смесь трифосфатов dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и MnCl₂ (0,03 мкмоль). Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41 °С в течение 60 минут. Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20 °С.

Для проведения ПЦР аликвота кДНК объемом в 2 мкл была смешана с 2 мкл PCR буфера (Tris-HCl 0,67 М, (NH₄)₂SO₄ 0,17 М, Triton X-100 0,1 %), 0,3 мкл MgCl₂ (0,1 М), 1 мкл dNTP (4 мМ), 2,5 мкл смеси прямого и обратного праймеров (4 мкМ каждый), 1 ед. активности Taq полимеразы и общий объем доведен до 20 мкл водой, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC).

Полимеразная цепная реакция была выполнена по следующему протоколу:

- 1). Исходная денатурация – 2 мин при 94°С;
- 2). Амплификация на протяжении n циклов (Таблица 3.):
10 сек при 94°С – денатурация;
30 сек при соответствующей температуре – отжиг праймера;
15 сек при 72°С – элонгация;
- 3). Конечная элонгация – 2 мин при 72 °С.

Параллельно амплифицировалась геномная ДНК крысы известной концентрации, использовавшаяся как внешний стандарт.

Продукты амплификации (20 мкл) смешивали с 5 мкл смеси для нанесения (0,35 % оранжевого G в 30 % сахарозе) и проводили электрофорез в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, и 0,5×ТБЕ буфере при напряжении 160 V в течение тридцати минут. ПЦР-продукты образцов и

стандартов фотографировались цифровой камерой с помощью установки Gel Doc (Bio-Rad). Интенсивность флуоресценции полос ПЦР-продукта была измерена при помощи программы Scion Image (Scion Corporation, www.scioncorp.com). ПЦР-продукты образцов были калиброваны относительно соответствующих стандартов (Рисунок 3.), что позволило оценить число копий кДНК интересующего нас гена.

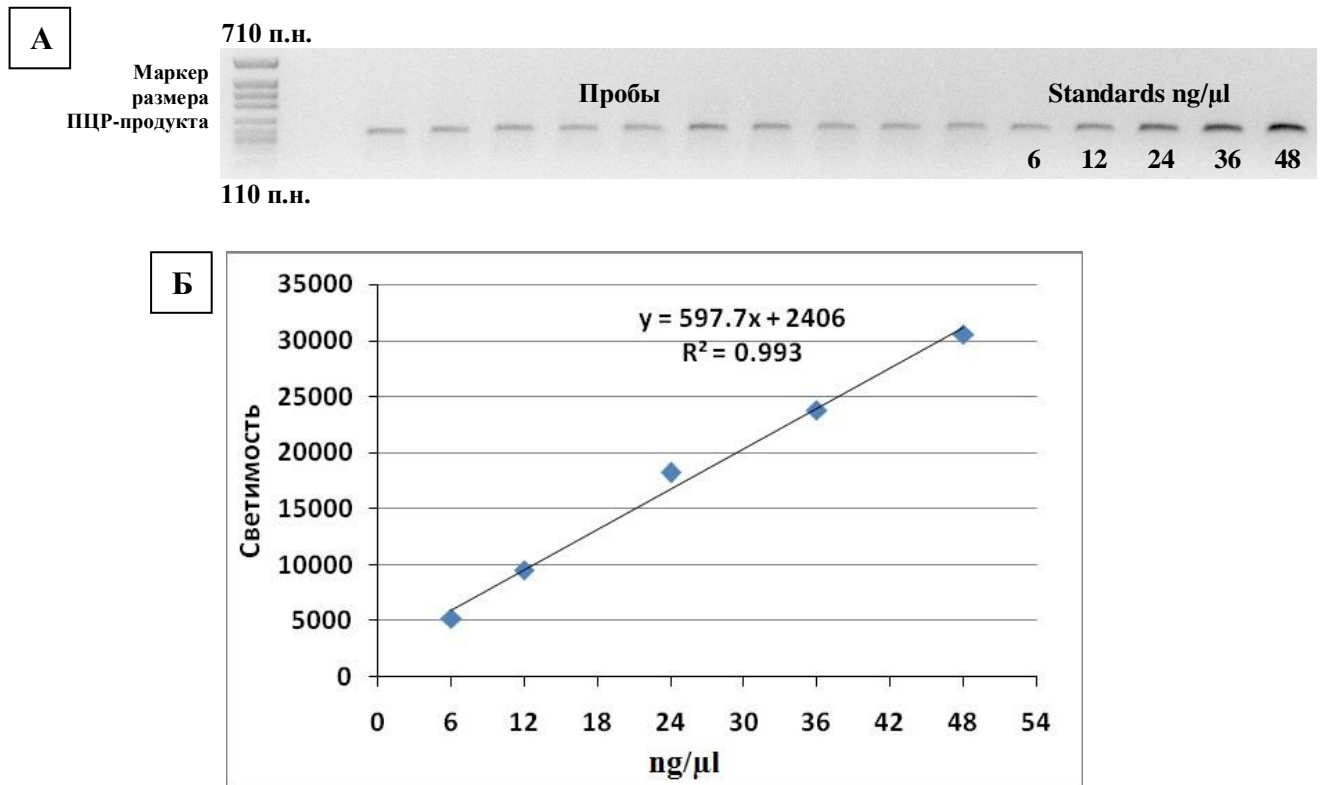


Рисунок 3. ПЦР-продукты образцов и соответствующих стандартов:

А. Фото полос ПЦР продукта исследуемых проб и стандартов.

Б. Зависимость светимости ПЦР-продукта стандартов от количества геномной ДНК в пробе. R^2 – коэффициент линейной аппроксимации этой зависимости.

Уравнение зависимости светимости ПЦР продукта стандартов от количества геномной ДНК и коэффициент линейной аппроксимации рассчитывались с помощью программы Microsoft Excel. Для дальнейшего анализа использовались только те гели, в которых коэффициент линейной аппроксимации (R^2) зависимости светимости ПЦР продукта стандартов от количества кДНК в пробе был не ниже 0,97. Концентрацию кДНК в исследуемых пробах определяли

по уравнению: $y = ax + b$, где y – интенсивность свечения соответствующей пробы, x – значение концентрации кДНК в пробах. Коэффициенты a и b определялись эмпирически для каждого геля.

Определение экспрессии, как гена «домашнего хозяйства», так и любого из генов TRP ионных каналов, проводилось не менее чем в трех повторах для каждой пробы. Величину экспрессии данного гена в данной пробе определяли как среднее между значениями. Эти средние значения для каждой пробы использовались в дальнейшем для вычисления групповых средних и статистической обработки результатов.

2.6. Статистический анализ данных

Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ Statistica 8 и программы Microsoft Excel. Результаты представлены как $M \pm m$ (среднее значение \pm ошибка среднего значения). Достоверность результатов оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента для независимых переменных. Межгрупповые сравнения проводились с помощью многофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием post-hoc тест Фишера.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА

3.1.1. Термочувствительные TRP ионные каналы в структурах мозга

Наши исследования показали, что в центре терморегуляции – гипоталамусе экспрессируются гены как теплочувствительных TRP ионных каналов, активирующихся при температуре выше 30°C, так и холодочувствительных, активирующихся при более низких температурах. Для генов теплочувствительных TRP каналов зарегистрированный уровень экспрессии составил от $11,6 \pm 1,04$ копий/100 копий *Polr2a* (для TRPV3) до $233,3 \pm 11,96$ копий/100 копий *Polr2a* (для TRPV2). Гены холодочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8 в гипоталамусе крыс экспрессируются значительно слабее: уровни их мРНК оказались $6,3 \pm 0,82$ и $1,2 \pm 0,09$ копий/100 копий *Polr2a*, для TRPA1 и TRPM8, соответственно (Рисунок 4.).

Профиль экспрессии генов термочувствительных TRP каналов в других исследованных отделах имеет сходный вид с профилем экспрессии этих генов в гипоталамусе. Отмечается хорошо выраженная экспрессия большинства генов теплочувствительных TRP ионных каналов и незначительная экспрессия холодочувствительных (Рисунок 4.).

Во всех исследованных структурах мозга наблюдается довольно высокая экспрессия гена *Trpv2* (*обратите внимание на масштаб шкалы графиков!*). В гипоталамусе, фронтальной коре и среднем мозге уровень мРНК *Trpv2* в 4-5 раз превышал ($p < 0,001$) уровень мРНК ближайшего к нему по уровню экспрессии гена в этом отделе ионного канала (TRPV4 – для гипоталамуса; TRPV1 и TRPV3 – для фронтальной коры; TRPV3 – для среднего мозга). В гиппокампе же уровень мРНК *Trpv2* оказался выше ($p < 0,001$) ближайших к нему уровней мРНК *Trpv3* и *Trpv1* в 8 и 10 раз, соответственно (Рисунок 4.).

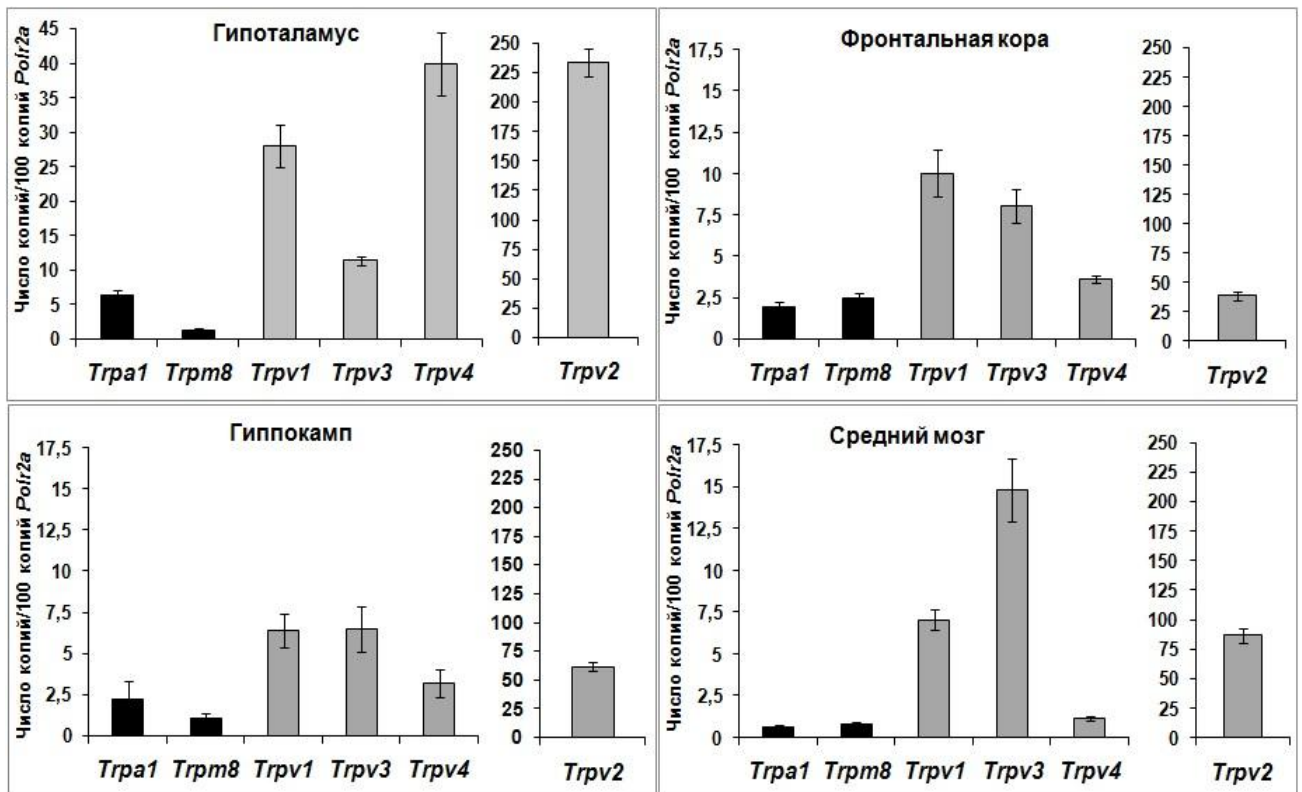


Рисунок 4. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в исследованных отделах мозга крыс. $n=10$

Сравнение экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в отделах мозга крыс показало, что в гипоталамусе этот показатель выше, чем в других исследованных структурах для генов термочувствительных TRP каналов – TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV4 (Рисунок 5.). Особенно четко это прослеживается при сравнении уровней мРНК *Trpv4*, – если в гипоталамусе уровень мРНК *Trpv4* равнялся $39,9 \pm 4,55$ копии/100 копий *Polr2a*, то для всех остальных отделов он был на порядок ниже ($p < 0,001$).

Иное соотношение наблюдалось для TRPV3 и TRPM8. Уровень экспрессии гена *Trpv3* в среднем мозге оказался сопоставим с уровнем экспрессии этого гена в гипоталамусе ($p > 0,05$) и превышал значения этого показателя в других отделах ($p < 0,001$). Уровень экспрессии гена *Trpv3* в гипоталамусе также превышал этот показатель во фронтальной коре и гиппокампе ($p < 0,05$) (Рисунок 6.).

Наиболее высокая экспрессия гена *Trpm8* зарегистрирована во фронтальной коре ($p < 0,01$). В гипоталамусе уровень экспрессии гена *Trpm8* достоверно не отличался от такового в гиппокампе и среднем мозге ($p > 0,05$) (Рисунок 7.).

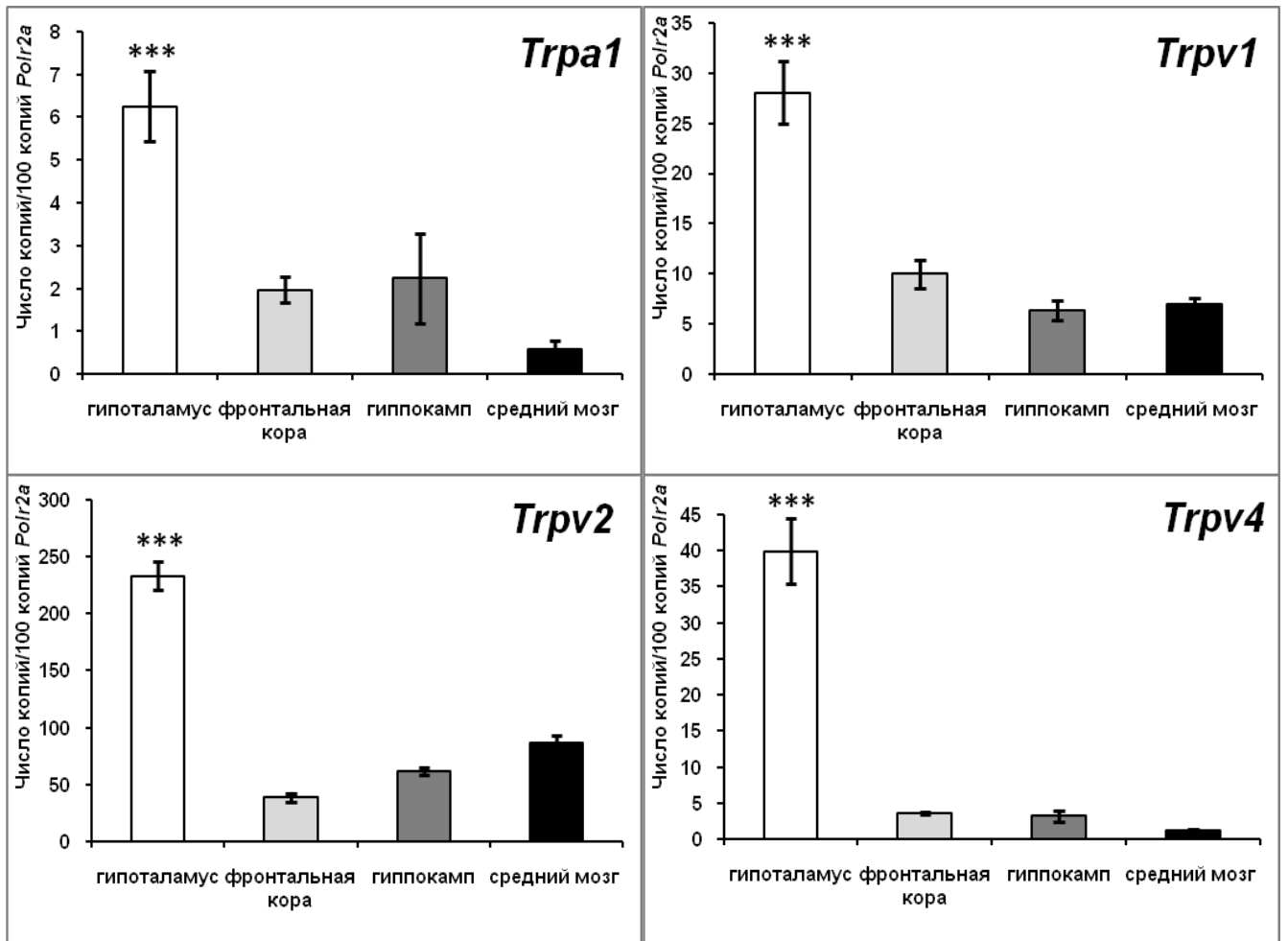


Рисунок 5. Уровень мРНК генов *Trpa1*, *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4* в различных структурах мозга крыс. $n=10$, $***p<0,001$ – относительно исследованных структур мозга.

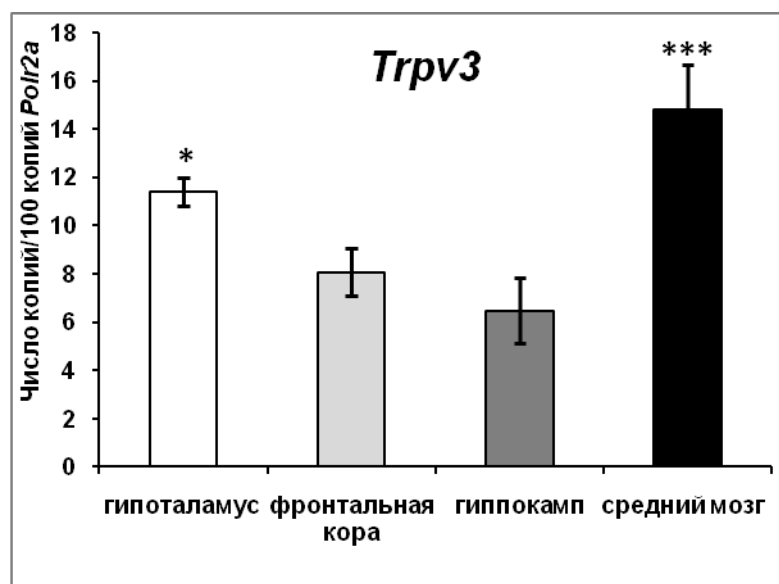


Рисунок 6. Уровень мРНК гена *Trpv3* в исследуемых структурах мозга крыс. $n=10$, $*p<0,05$, $***p<0,001$ – относительно фронтальной коры и гиппокампа.

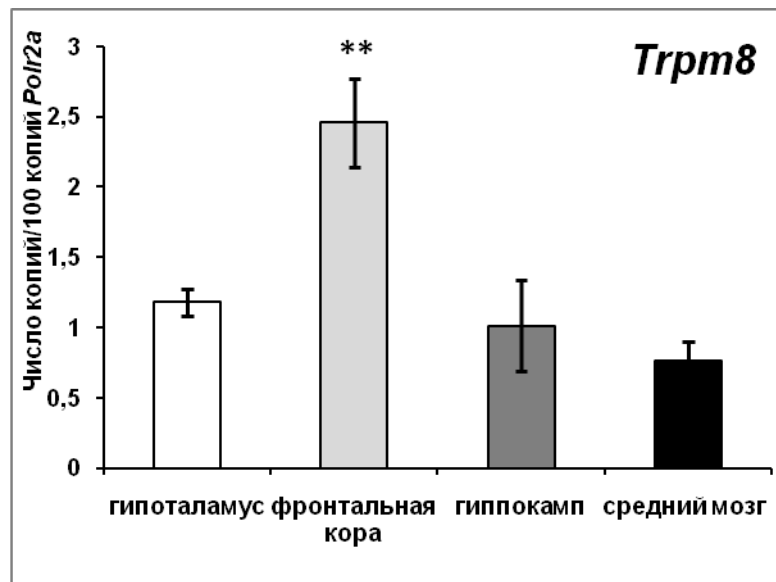


Рисунок 7. Уровень мРНК гена *Trpm8* в исследуемых структурах мозга крыс. $n=10$, $**p<0,01$ – относительно исследованных структур мозга.

Итак, во всех исследованных структурах экспрессируются гены всех 6 типов термочувствительных TRP ионных каналов. Уровень экспрессии генов холодочувствительных TRP ионных каналов ниже по сравнению с экспрессией генов теплочувствительных TRP ионных каналов. В исследованных структурах мозга отмечается высокий, значительно превышающий экспрессию генов всех остальных исследованных TRP ионных каналов, уровень экспрессии гена *Trpv2*.

3.1.2. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса

Известно, что гипоталамус не является структурой однородной, его передний (термодетекторный) и задний (интегративный) отделы функционально различны.

Нами было обнаружено, что гены как теплочувствительных, так и холодочувствительных TRP ионных каналов экспрессируются в переднем и заднем отделах гипоталамуса. Для генов *Trpv2*, *Trpv3* и *Trpv4* не обнаружено различий в экспрессии в разных отделах гипоталамуса ($p>0,05$). Уровень их мРНК составлял $48,7\pm 2,21$ и $45,9\pm 2,86$ ($F_{1,35}=0,25$, $p>0,05$), $0,7\pm 0,15$ и $0,9\pm 0,06$ ($F_{1,35}=3,51$, $p>0,05$), $0,16\pm 0,03$ и $0,17\pm 0,02$ ($F_{1,35}=3,31$, $p>0,05$) копий/100 копий *Pp1a* для

переднего и заднего отдела гипоталамуса соответственно. Уровень экспрессии гена *Trpv2* в обоих отделах гипоталамуса на порядок превышает уровень экспрессии генов других исследованных термочувствительных TRP ионных каналов. Аналогичная закономерность была обнаружена и в исследованиях целого гипоталамуса.

Различия в экспрессии генов наблюдается для *Trpa1*, *Trpv1* и *Trpm8*. Показано, что в переднем отделе гипоталамуса уровень мРНК гена *Trpm8* втрое выше ($F_{1,35}=33,61$, $p<0,001$), чем в заднем (Рисунок 8.), в то время как уровень мРНК генов *Trpa1* ($F_{1,35} =14,12$, $p<0,01$) и *Trpv1* ($F_{1,36} =354,8$, $p<0,001$) в заднем отделе гипоталамуса в 3-5 раз превышает этот показатель в переднем (Рисунок 9).

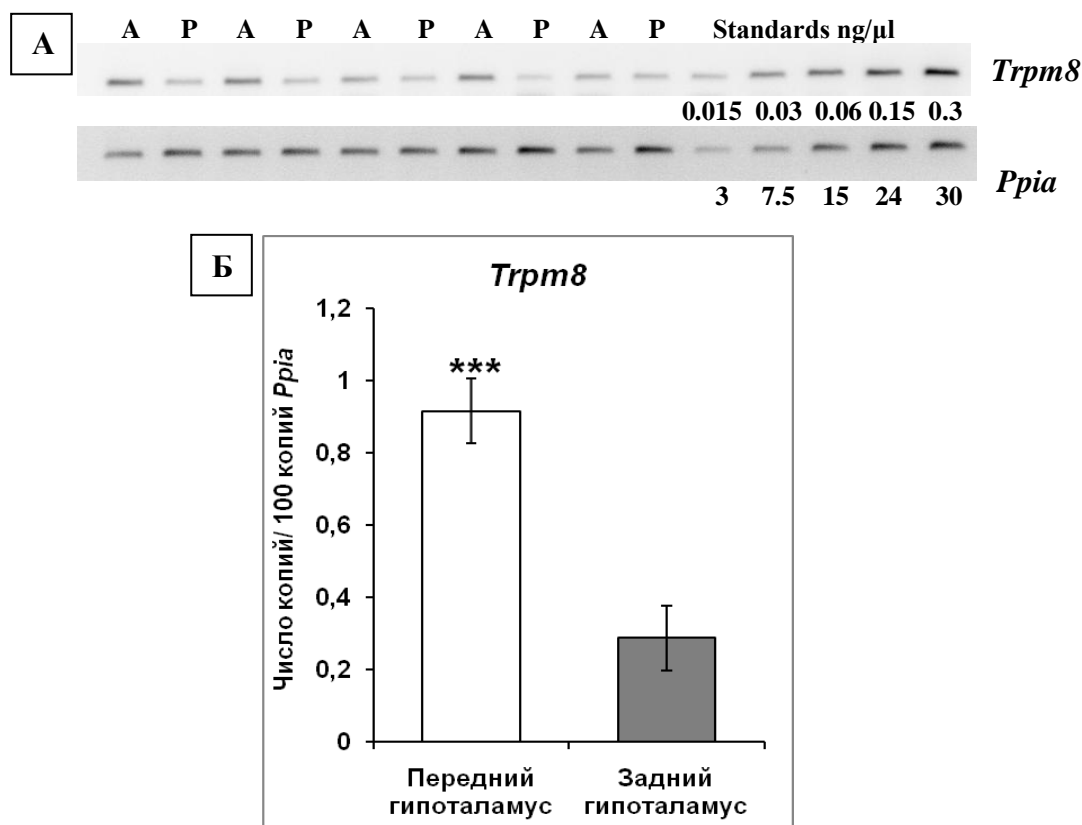


Рисунок 8. Экспрессия гена ионного канала TRPM8 в функционально различных отделах гипоталамуса нормотензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpm8* (36 циклов амплификации), и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где А (anterior) – передний и Р (posterior) – задний отделы гипоталамуса. **Б.** Уровень мРНК гена *Trpm8*. $n=10$, $***p<0,001$

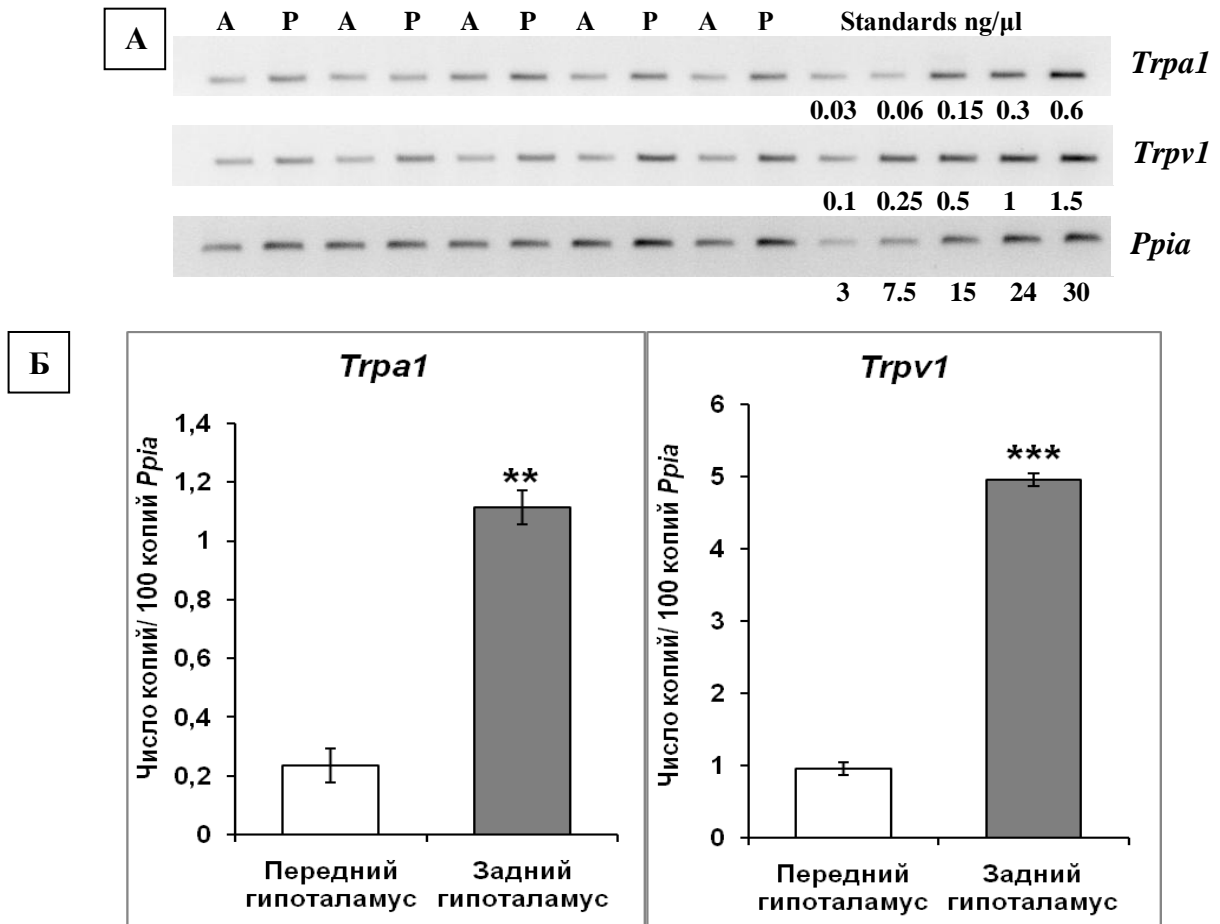


Рисунок 9. Экспрессия генов *Trpa1* и *Trpv1* в функционально различных отделах гипоталамуса нормотензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемых генов – *Trpa1* (36 циклов амплификации), *Trpv1* (34 цикла амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где А (anterior) – передний и Р (posterior) – задний отделы гипоталамуса. **Б.** Уровень мРНК генов *Trpa1* и *Trpv1*. $n=10$, $**p<0,01$; $***p<0,001$

Таким образом, гены всех 6 типов термочувствительных TRP ионных каналов экспрессируются в центре терморегуляции – гипоталамусе. В функционально различных отделах гипоталамуса – переднем и заднем, наблюдается различие в экспрессии генов ионных каналов TRPV1, TRPA1 и TRPM8. В переднем гипоталамусе повышена экспрессия холодочувствительного ионного канала TRPM8. В заднем гипоталамусе наблюдается более высокая экспрессия для генов теплочувствительного ионного канала TRPV1 и реагирующего на болевые низкие температуры ионного канала TRPA1.

3.2. ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

3.2.1. Влияние длительной адаптации организма к холоду на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в различных структурах мозга

При сравнении показателей разных экспериментальных групп в качестве эндогенного стандарта использовали один из генов «домашнего хозяйства» – ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*). Уровень мРНК *Polr2a* в контрольной и экспериментальной группах достоверно не различался (Таблица 4).

Таблица 4. Уровень мРНК гена *Polr2a* (ng/ μ l) в исследуемых структурах мозга контрольных и адаптированных к холоду крыс

Воздействие	Структуры мозга			
	Гипоталамус	Фронтальная кора	Гиппокамп	Средний мозг
Контроль, ($n=10$)	12,6 \pm 1,10	15,6 \pm 0,88	7,8 \pm 0,55	14,1 \pm 0,53
Адаптация к холоду, ($n=10$)	12,2 \pm 1,13	14,98 \pm 1,27	8,1 \pm 0,48	14,7 \pm 1,11
P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Исследование экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в отделах мозга адаптированных к холоду крыс показало, что уровни их мРНК в таких отделах мозга как фронтальная кора, гиппокамп и средний мозг достоверно не отличаются от соответствующих показателей у контрольных животных. В гипоталамусе аналогичный результат был получен для генов теплочувствительных ионных каналов TRPV1, TRPV2, TRPV4 и холодочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8 (Таблица 5.).

Таблица 5. Уровень мРНК генов термочувствительных ионных каналов TRPA1, TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4 в исследуемых структурах мозга контрольных и адаптированных к холоду крыс

	Гипоталамус		Фронтальная кора		Гиппокамп		Средний мозг	
	Контроль	Адаптация	Контроль	Адаптация	Контроль	Адаптация	Контроль	Адаптация
<i>Trpa1</i>	6,3±0,82	6,6±1,43	1,97±0,31	2,1±0,36	2,2±1,04	1,4±0,68	0,6±0,20	0,7±0,24
<i>Trpm8</i>	1,2±0,09	1,2±0,16	2,5±0,32	2,5±0,29	1,01±0,33	1,1±0,31	0,8±0,13	0,7±0,14
<i>Trpv1</i>	28,1±3,14	24,3±3,61	10,1±1,41	11,2±1,76	6,4±0,99	9,6±1,42	7,1±0,59	5,0±0,84
<i>Trpv2</i>	233,3±11,96	252,3±18,43	38,9±3,83	44,7±3,36	62,1±3,35	54,9±3,02	86,6±6,21	88,4±3,88
<i>Trpv3</i>	11,4±0,60	7,9±0,63^{***}	8,1±0,99	6,7±0,86	6,5±1,36	7,6±1,39	14,8±1,85	11,4±1,26
<i>Trpv4</i>	39,9±4,55	37,5±3,01	3,6±0,22	3,5±0,41	3,2±0,83	2,5±0,78	1,2±0,12	1,1±0,17

Примечание: данные представлены как количество копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Polr2a*. $n=10$, $***p<0,001$ – достоверное отличие от контроля.

В отличие от всех остальных исследованных генов уровень экспрессии гена *Trpv3* оказался подвержен влиянию внешних температурных воздействий. После длительной адаптации к холоду достоверно ($p < 0,001$) уменьшилась его экспрессия в гипоталамусе с $11,4 \pm 0,60$ до $7,98 \pm 0,63$ копий/100 копий *Polr2a* (Рисунок 10.).

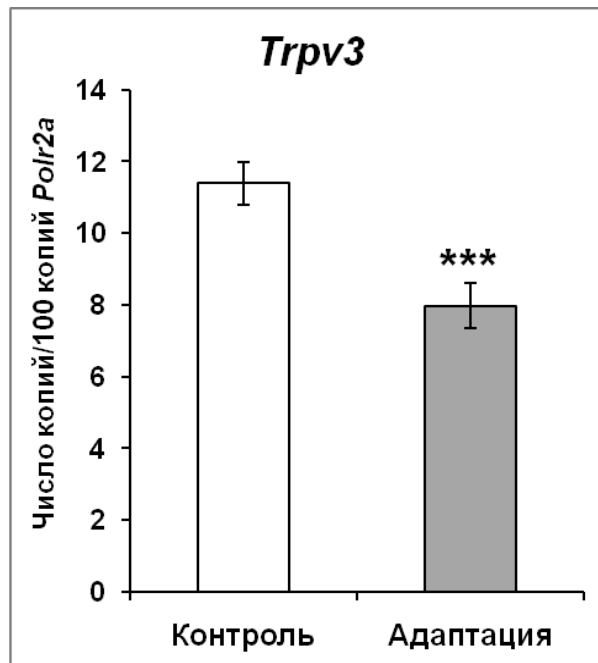


Рисунок 10. Уровень мРНК гена *Trpv3* в гипоталамусе контрольных и адаптированных к холоду крыс. $n=10$, *** $p < 0,001$

Итак, длительное действие холода не изменяло экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гиппокампе, среднем мозге и фронтальной коре. При длительном воздействии низких температур снижение мРНК ионного канала TRPV3 является специфичным для гипоталамуса.

3.2.2. Влияние острого охлаждения на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса

В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали один из генов «домашнего хозяйства» – ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Уровень мРНК *Ppia* в экспериментальных группах и отделах гипоталамуса достоверно не различался (Таблица 6.).

Таблица 6. Уровень мРНК гена *Ppia* (ng/ μ l) в переднем и заднем отделах гипоталамуса контрольных и экспериментальных животных

Воздействие	Отдел гипоталамуса		P
	Передний	Задний	
Контроль, (n=6)	22,1 \pm 3,42	18,7 \pm 1,71	>0,05
Быстрое глубокое охлаждение, (n=6)	21,4 \pm 4,22	20,3 \pm 2,52	>0,05
Медленное глубокое охлаждение, (n=7)	20,8 \pm 3,39	18,7 \pm 1,52	>0,05

Как видно из таблицы 7, быстрое глубокое охлаждение не оказывает влияния на экспрессию исследованных генов, как в переднем, так и заднем гипоталамусе.

Таблица 7. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в переднем и заднем отделах гипоталамуса крыс в термонеutralных условиях (контроль) и при глубоком охлаждении – быстром и медленном

Воздействие	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Передний отдел гипоталамуса						
Контроль, (n=6)	0,5 \pm 0,10	0,49 \pm 0,12	1,82 \pm 0,25	101,7 \pm 11,32	2,93 \pm 0,99	0,26 \pm 0,06
Быстрое глубокое охлаждение, (n=6)	0,45 \pm 0,07	0,49 \pm 0,11	1,59 \pm 0,33	82,8 \pm 10,79	2,04 \pm 0,56	0,24 \pm 0,07
Медленное глубокое охлаждение, (n=7)	0,56 \pm 0,11	0,38 \pm 0,06	1,63 \pm 0,33	83,6 \pm 16,03	2,37 \pm 0,67	0,19 \pm 0,06
Задний отдел гипоталамуса						
Контроль, (n=6)	1,5 \pm 0,30	0,23 \pm 0,04	3,4 \pm 0,57	102,0 \pm 4,54	2,9 \pm 0,52	0,3 \pm 0,09
Быстрое глубокое охлаждение, (n=6)	2,3 \pm 0,58	0,27 \pm 0,07	3,5 \pm 0,57	91,9 \pm 5,64	4,0 \pm 0,53	0,23 \pm 0,08
Медленное глубокое охлаждение, (n=7)	1,9 \pm 0,54	0,13 \pm 0,04	2,6 \pm 0,49	124,8 \pm 30,68	4,7\pm0,49*	0,2 \pm 0,04

Примечание: данные представлены как количество копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Ppia*. * $p < 0,05$ – достоверное отличие от контроля.

Медленное глубокое охлаждение, не оказывая влияния на экспрессию генов в переднем гипоталамусе, изменяет экспрессию гена *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса – его экспрессия достоверно увеличивается 1,5 раза. (Рисунок 11.).

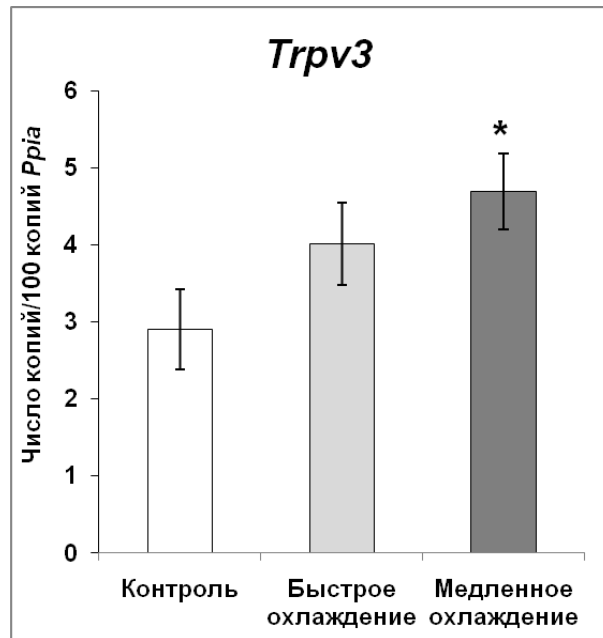


Рисунок 11. Уровень мРНК гена *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса крыс в термонейтральных условиях (контроль) и при остром охлаждении – быстром и медленном. $n=6-7$, $*p<0,05$ – относительно контроля

Таким образом, при действии острого холода изменение в экспрессии генов наблюдалось только в заднем отделе гипоталамуса в ответ на медленное глубокое охлаждение и затрагивало только ген ионного канала TRPV3.

3.2.3. Изменение экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов после острого охлаждения и восстановления глубокой температуры до исходного уровня

Особенностью данного эксперимента являлось то, что после стандартного холодого воздействия животное разогревалось, находясь в течение 1,5-2 часа на теплом термостатируемом столике с поддерживаемой температурой 38°C. За это время глубокая температура тела восстанавливалась до исходного уровня 38°C.

В качестве эндогенного стандарта использовался ген «домашнего

хозяйства» – ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы II (*Polr2a*). Уровень мРНК *Polr2a* в гипоталамусе составлял $10,9 \pm 0,73$ ng/ μ l, $10,9 \pm 0,73$ ng/ μ l и $10,3 \pm 0,39$ ng/ μ l у контрольных животных, при быстром и медленном глубоком охлаждении соответственно и достоверно не различался ($p > 0,05$).

Наше исследование показало, что экспрессия генов термочувствительных ионных каналов TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 и TRPA1 в гипоталамусе оставалась неизменной (Таблица 8.).

Таблица 8. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе крыс в термонеutralных условиях (контроль), после острого охлаждения и восстановления глубокой температуры до исходного уровня

Воздействие	Гены TRP ионных каналов					
	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Контроль, ($n=10$)	$3,8 \pm 0,63$	$0,45 \pm 0,07$	$4,4 \pm 0,37$	$108,4 \pm 10,16$	$2,9 \pm 0,17$	$4,2 \pm 1,10$
Быстрое глубокое охлаждение, ($n=10$)	$3,3 \pm 0,75$	$0,84 \pm 0,13^*$	$4,6 \pm 0,3$	$115,9 \pm 5,82$	$2,9 \pm 0,29$	$4,4 \pm 0,96$
Медленное глубокое охлаждение, ($n=10$)	$2,9 \pm 0,56$	$0,98 \pm 0,13^{**}$	$4,3 \pm 0,29$	$115,9 \pm 9,77$	$3,3 \pm 0,3$	$5,5 \pm 1,12$

Примечание: данные представлены как количество копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Polr2a*. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ – достоверное отличие от контроля.

Однако в отличие от всех остальных исследованных генов термочувствительных TRP ионных каналов уровень экспрессии гена *Trpm8* изменялся. После острого охлаждения и последующего восстановления глубокой температуры уровень мРНК гена *Trpm8* увеличивался в два раза (Рисунок 12.).

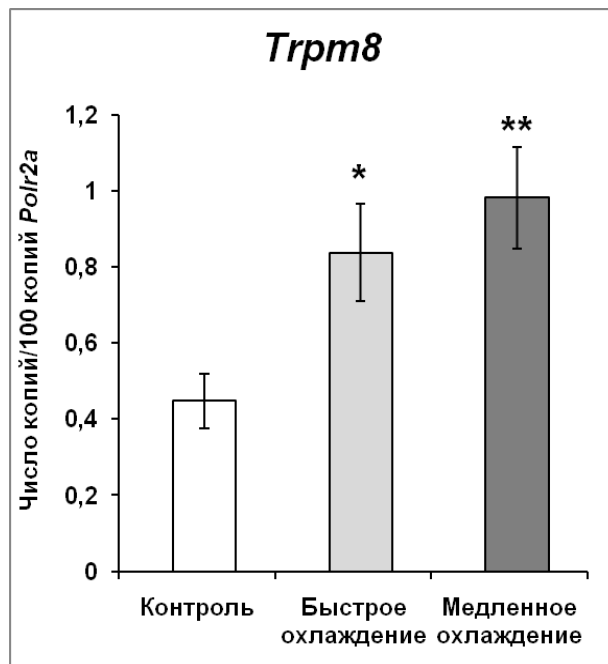


Рисунок 12. Уровень мРНК гена *Trpm8* в гипоталамусе в термонейтральных условиях (контроль), после острого охлаждения и восстановления глубокой температуры до исходного уровня. $n=10$, $*p<0,05$; $**p<0,01$ – относительно контроля

Таким образом, наши исследования показали, что острое охлаждение приводит к изменениям в экспрессии генов двух типов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе – TRPV3 и TRPM8. Эти изменения динамичны – если сразу после охлаждения наблюдается увеличение экспрессии гена ионного канала TRPV3, то спустя 1,5-2 часа активность (экспрессия) гена этого канала уже не изменена, но усиливается активность гена (экспрессия) ионного канала TRPM8. Изменение экспрессии генов зависит также от типа охлаждения: медленное охлаждение вызывает увеличение экспрессии генов как сразу после охлаждения (TRPV3), так и спустя 1,5-2 часа (TRPM8); быстрое же охлаждение вызывает только отставленное повышение экспрессии гена ионного канала TRPM8. Длительная адаптация организма к холоду приводит к специфичным для гипоталамуса изменениям – снижению экспрессии гена ионного канала TRPV3.

3.2.4. Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 агонистом ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе

В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали один из генов «домашнего хозяйства» – ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Уровень мРНК *Ppia* как в экспериментальных группах, так и отделах гипоталамуса достоверно не различался (Таблица 9.).

Таблица 9. Уровень мРНК гена *Ppia* (ng/ μ l) в функционально различных отделах гипоталамуса в термонейтральных условиях (контроль), при аппликации ментола и разных типах охлаждения

Воздействие	Отдел гипоталамуса		P
	Передний	Задний	
Контроль, ($n=6$)	22,1 \pm 3,42	18,7 \pm 1,71	>0,05
Аппликация ментола, ($n=8$)	19,9 \pm 3,07	17,2 \pm 1,26	>0,05
Быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, ($n=6$)	19,9 \pm 5,63	16,3 \pm 2,08	>0,05
Медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, ($n=6$)	18,3 \pm 2,65	19,2 \pm 3,02	>0,05

В Таблице 10. приведены данные об уровне мРНК генов термочувствительных TRP ионных в гипоталамусе крыс в термонейтральных условиях (контроль), после аппликации 1% суспензии ментола на кожу, а также после острого охлаждения на фоне аппликации.

В переднем отделе гипоталамуса ни аппликация ментола на кожу сама по себе, ни в сочетании с глубоким охлаждением как быстрым, так и медленным не вызывает изменений в уровне мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов.

Таблица 10. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса в термонеutralных условиях (контроль), при аппликации ментола и разных типах охлаждения

Воздействие	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Передний отдел гипоталамуса						
Контроль, (<i>n</i> =6)	0,5±0,10	0,49±0,12	1,82±0,25	101,7±11,32	2,93±0,99	0,26±0,06
Аппликация ментола, (<i>n</i> =8)	0,62±0,14	0,48±0,06	1,73±0,17	85,3±12,81	3,98±1,09	0,18±0,04
Быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =6)	0,67±0,13	0,56±0,11	1,87±0,24	99,1±18,39	3,7±1,41	0,19±0,07
Медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =6)	0,54±0,13	0,42±0,07	1,79±0,28	91,5±10,93	2,8±0,72	0,17±0,08
Задний отдел гипоталамуса						
Контроль, (<i>n</i> =6)	1,5±0,30	0,23±0,043	3,4±0,57	102,0±4,54	2,9±0,52	0,3±0,09
Аппликация ментола, (<i>n</i> =8)	1,34±0,09	0,2±0,05	2,9±0,55	121,1±14,36	4,3±0,62*	0,2±0,04
Быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =6)	1,5±0,28	0,3±0,05	3,03±0,68	106,9±12,72	2,9±0,15	0,3±0,09
Медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =6)	1,6±0,35	0,3±0,11	3,14±0,55	93,1±11,44	4,4±0,28	0,3±0,06

Примечание: данные представлены как количество копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Pria*. * $p < 0,05$ – достоверное отличие от контроля

В заднем отделе гипоталамуса аппликация ментола на кожу вызывает повышение экспрессии гена *Trpv3* (Рисунок 13.) сравнимое с его повышением при действии острого охлаждения (см. Рисунок 11.). Как быстрое, так и медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола не оказывают дополнительного влияния на экспрессию гена *Trpv3* (Рисунок 13.).

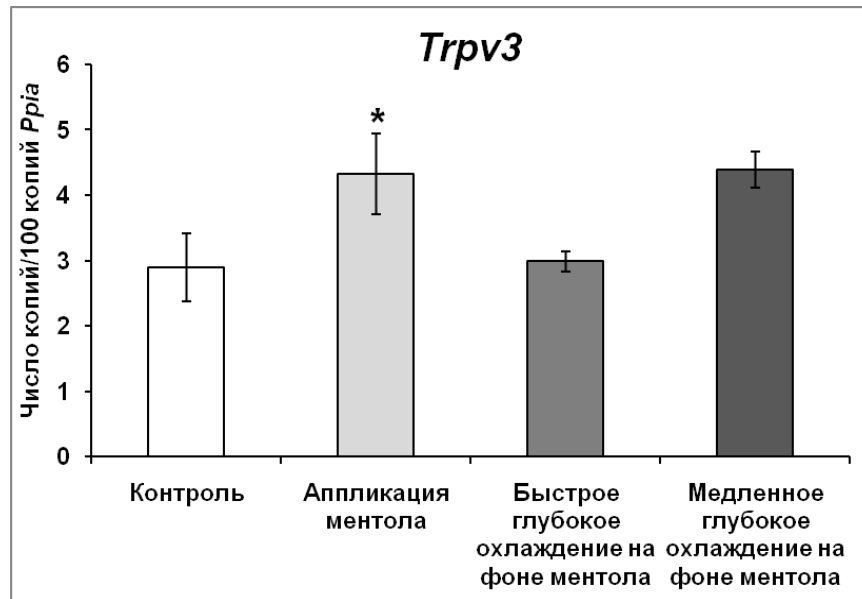


Рисунок 13. Уровень мРНК гена *Trpv3* в заднем отделе гипоталамуса в термонейтральных условиях (контроль), после аппликации ментола и охлаждения на фоне аппликации ментола. $n=6-8$, $*p<0,05$ – относительно контроля

Таким образом, под влиянием, как острого охлаждения, так и аппликации ментола на кожу, другими словами при активации периферического ионного канала TRPM8 как его агонистом, так и температурой, в гипоталамусе происходят сходные изменения в экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов – в заднем отделе гипоталамуса наблюдается повышение экспрессии гена ионного канала TRPV3.

3.3. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP ИОННЫХ КАНАЛОВ У КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Для выявления особенностей экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов при артериальной гипертензии были выбраны линии животных, выведенные и поддерживаемые в Институте цитологии и генетики – модель наследственной стресс-индуцируемой артериальной гипертензии, крысы линии НИСАГ и нормотензивная линия WAG (Маркель, 1985; Markel, 1992).

3.3.1. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса

У гипертензивных животных гены теплочувствительных и холодочувствительных TRP ионных каналов в разной степени экспрессируются в переднем и заднем отделах гипоталамуса. Для генов *Trpv2* и *Trpv3* не обнаружено различий в экспрессии. Уровень их мРНК составлял $45,7 \pm 1,68$ и $46,2 \pm 1,77$ ($F_{1,35}=0,25$, $p>0,05$), $0,6 \pm 0,12$ и $0,84 \pm 0,06$ ($F_{1,35}=3,51$, $p>0,05$) копий/100 копий *Ppia* для переднего и заднего отдела гипоталамуса соответственно. Уровень экспрессии гена *Trpv2* и в переднем, и в заднем гипоталамусе на порядок превышает уровень экспрессии генов других исследованных термочувствительных TRP ионных каналов, что, как описано выше, характерно и для нормотензивных животных.

Для генов *Trpa1* и *Trpv1* наблюдаются отличия в экспрессии в переднем и заднем отделах гипоталамуса, эти отличия аналогичны тем, что обнаружены у нормотензивных животных. Уровень мРНК генов *Trpa1* ($F_{1,35} = 14,12$, $p<0,05$) и *Trpv1* ($F_{1,36} = 354,8$, $p<0,001$) в заднем гипоталамусе был в 3-5 раз выше, чем в переднем (Рисунок 14.).

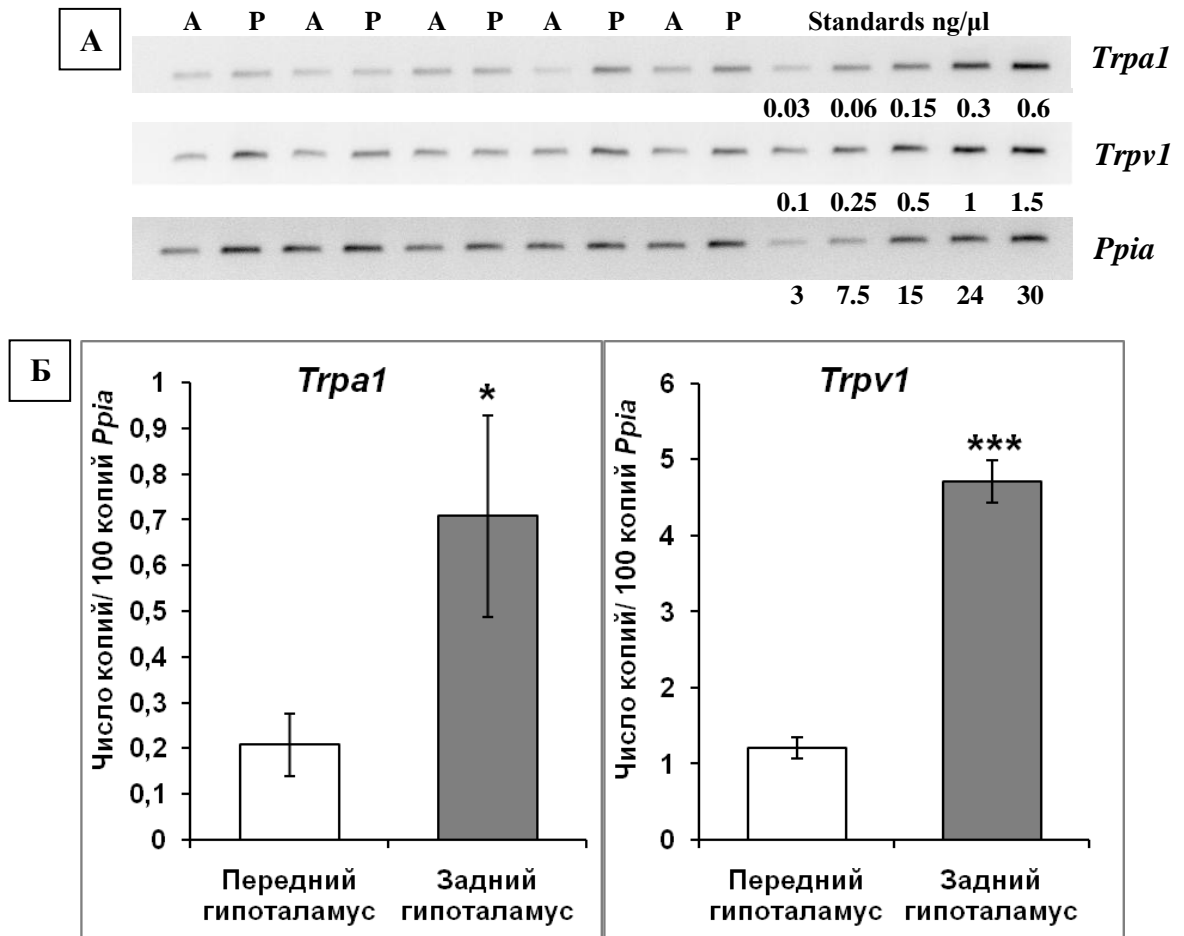


Рисунок 14. Экспрессия генов ионных каналов TRPA1 и TRPV1 в функционально различных отделах гипоталамуса гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемых генов – *Trpa1* (36 циклов амплификации), *Trpv1* (34 цикла амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где А (anterior) – передний и Р (posterior) – задний отделы гипоталамуса. **Б.** Уровень мРНК генов *Trpa1* и *Trpv1*. $n=10$, $*p<0,05$; $***p<0,001$

В отличие от нормотензивных, у которых не обнаружено различий в уровне мРНК гена *Trpv4* между передним и задним отделами гипоталамуса, у гипертензивных животных экспрессия гена *Trpv4* в заднем отделе гипоталамуса выше, чем в переднем (Рисунок 15.).

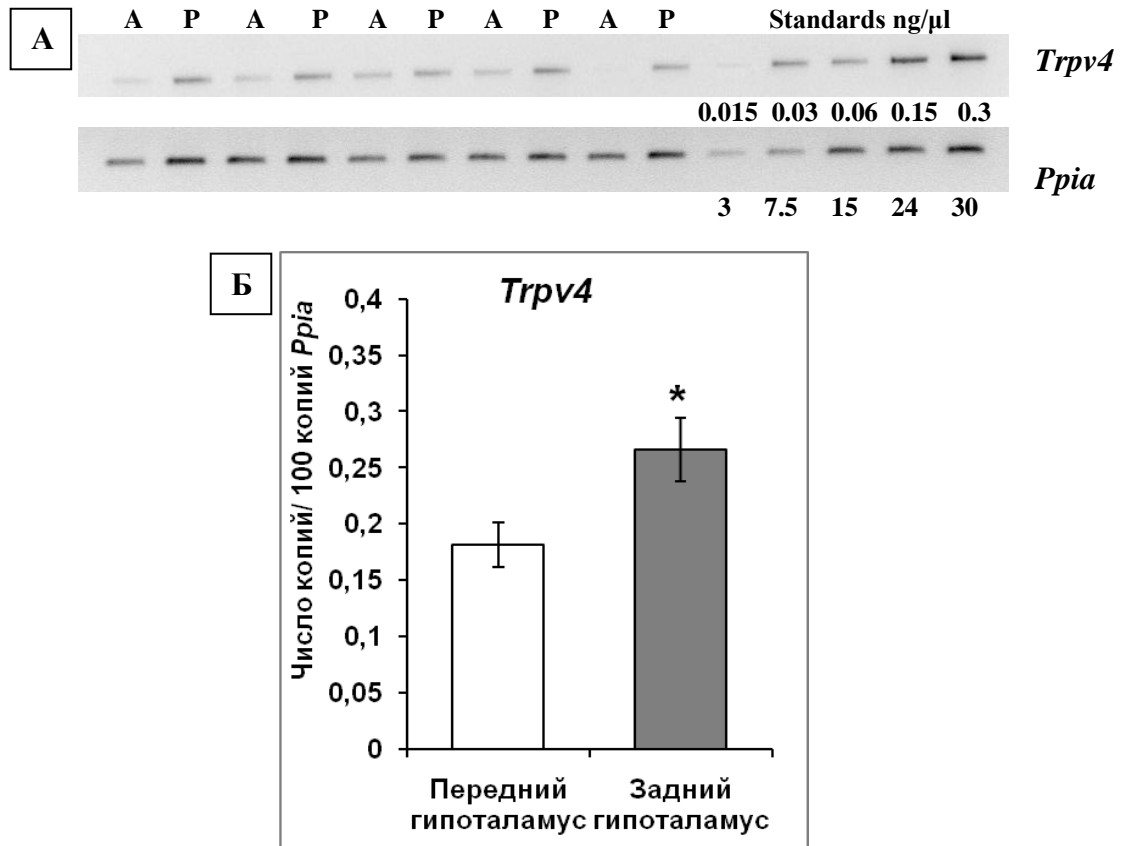


Рисунок 15. Экспрессия гена ионного канала TRPV4 в функционально различных отделах гипоталамуса гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpv4* (36 циклов амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где А (anterior) – передний и Р (posterior) – задний отделы гипоталамуса. **Б.** Уровень мРНК гена *Trpv4*. $n=10$, $*p<0,05$

Для гена *Trpm8* также показано различие в экспрессии в переднем и заднем отделах гипоталамуса, но противоположное, чем у *Trpa1*, *Trpv1* и *Trpv4*. В переднем гипоталамусе уровень матричной РНК гена *Trpm8* втрое выше, чем в заднем ($F_{1,35}=33,61$, $p<0,05$) (Рисунок 16.). Большая экспрессия гена *Trpm8* в переднем гипоталамусе наблюдалась и у нормотензивных животных.

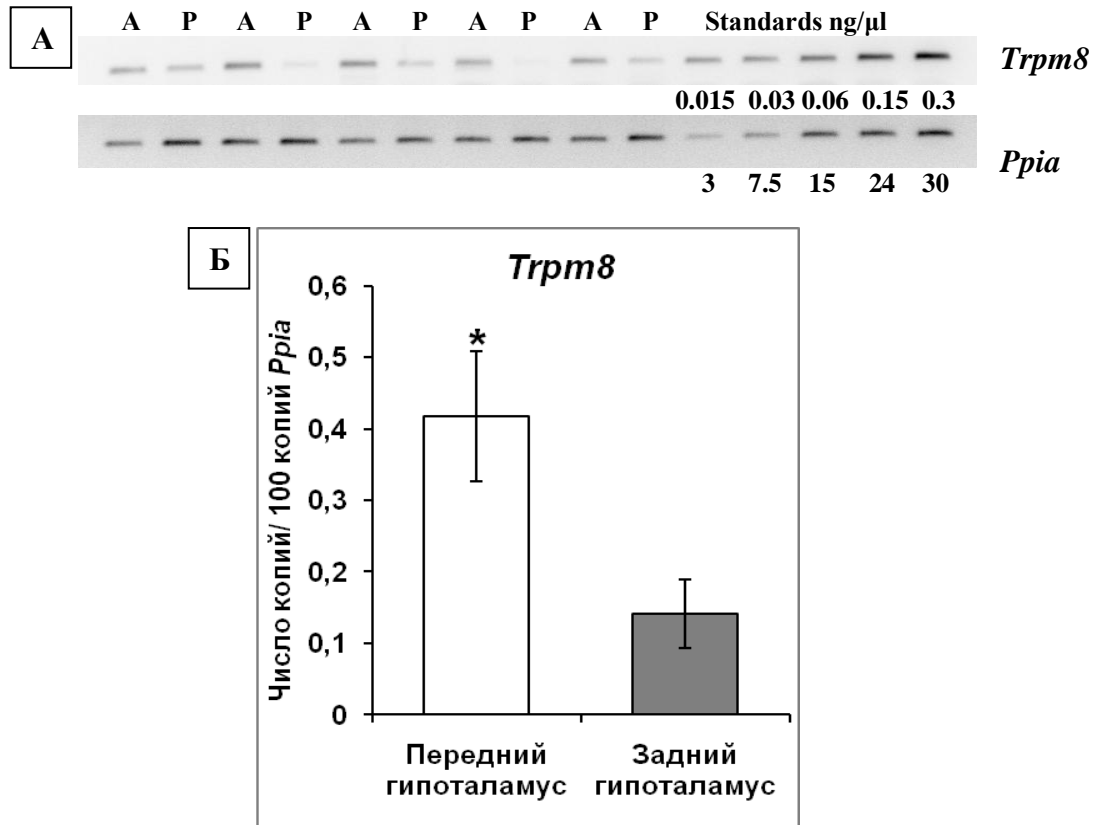


Рисунок 16. Экспрессия гена ионного канала TRPM8 в функционально различных отделах гипоталамуса гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpm8* (36 циклов амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где А (anterior) – передний и Р (posterior) – задний отделы гипоталамуса. **Б.** Уровень мРНК гена *Trpm8*. $n=10$, $*p<0,05$

Сравнение уровня мРНК термочувствительных TRP каналов в гипоталамусе у нормотензивных и гипертензивных животных выявило отличия по этому показателю для генов *Trpm8* и *Trpv4*. Уровень мРНК гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса у крыс гипертензивной линии НИСАГ оказался в два раза ниже ($F_{1,35}=17,0587$, $p<0,01$) по сравнению с этим показателем у крыс нормотензивной линии WAG (Рисунок 17.).

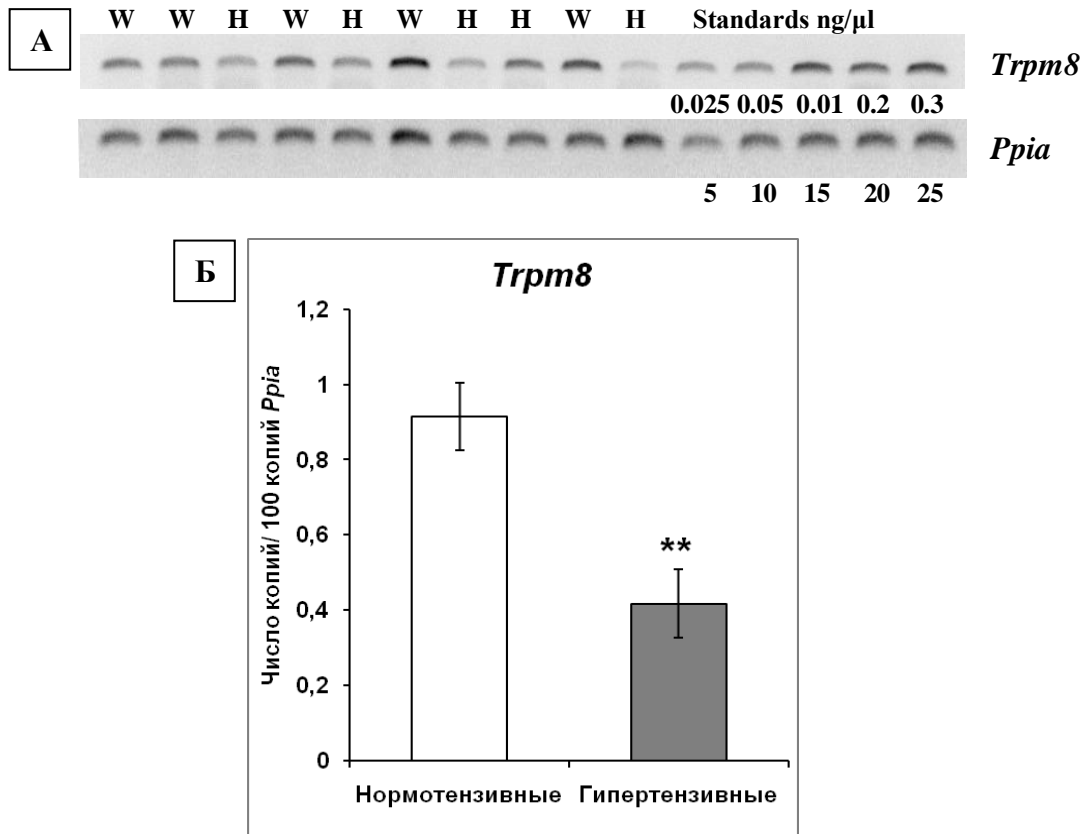


Рисунок 17. Экспрессия гена ионного канала TRPM8 в переднем отделе гипоталамуса нормо- и гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpm8* (36 циклов амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где Н – гипертензивная линия НИСАГ, W – нормотензивная линия WAG. **Б.** Уровень мРНК гена *Trpm8*. $n=10$, $**p<0,01$

Противоположный эффект наблюдается для гена *Trpv4*. У гипертензивных животных уровень мРНК гена *Trpv4* в заднем гипоталамусе превышает ($F_{1,34}=5,3137$, $p<0,05$) этот показатель у нормотензивных животных (Рисунок 18.).

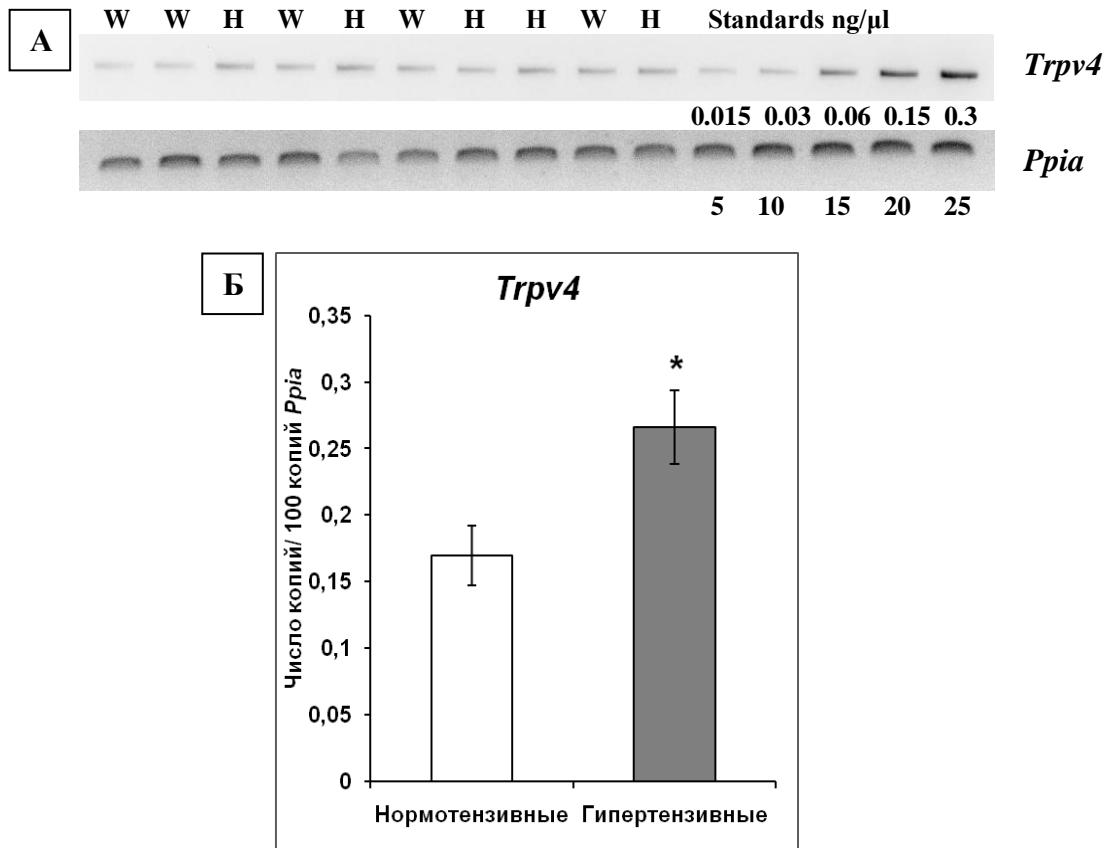


Рисунок 18. Экспрессия гена ионного канала TRPV4 в заднем отделе гипоталамуса нормо- и гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpv4* (36 циклов амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где Н – гипертензивная линия НИСАГ, W – нормотензивная линия WAG. **Б.** Уровень мРНК гена *Trpv4*. $n=10$, $*p<0,05$

Итак, различия в экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе у гипертензивных и нормотензивных животных представлены сниженной экспрессией гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 в переднем гипоталамусе и повышенной экспрессией теплочувствительного гена TRPV4 в заднем гипоталамусе.

3.3.2. Влияние острого охлаждения на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса

В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали один из генов «домашнего хозяйства» – ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Уровень мРНК *Ppia* как в экспериментальных группах, так и отделах гипоталамуса достоверно не различался (Таблица 11.).

Таблица 11. Уровень мРНК гена *Ppia* (ng/ μ l) в переднем и заднем отделах гипоталамуса контрольных и экспериментальных животных

Воздействие	Отдел гипоталамуса		P
	Передний	Задний	
Контроль, (<i>n</i> =10)	13,4 \pm 2,52	16,5 \pm 2,12	>0,05
Быстрое глубокое охлаждение, (<i>n</i> =10)	16,5 \pm 1,10	18,9 \pm 3,12	>0,05
Медленное глубокое охлаждение, (<i>n</i> =10)	17,7 \pm 2,32	18,8 \pm 1,98	>0,05

В Таблице 12. приведены данные об уровне мРНК генов термочувствительных TRP ионных в функционально различных отделах гипоталамуса гипертензивных крыс линии НИСАГ в термонеutralных условиях (контроль) и при остром охлаждении. Быстрое глубокое охлаждение не оказывает влияние на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в переднем и заднем отделах гипоталамуса (Таблица 12.).

Таблица 12. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в переднем и заднем отделах гипоталамуса гипертензивных животных в термонеutralных условиях (контроль) и при остром охлаждении – быстром и медленном

Воздействие	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Передний отдел гипоталамуса						
Контроль, (<i>n</i> =10)	1,49±0,53	0,15±0,03	2,02±0,65	97,7±11,08	1,8±0,44	0,11±0,05
Быстрое глубокое охлаждение, (<i>n</i> =10)	1,16±0,26	0,28±0,08	1,81±0,55	83,5±7,67	1,8±0,21	0,11±0,04
Медленное глубокое охлаждение, (<i>n</i> =10)	1,32±0,28	0,47±0,10**	1,92±0,33	76,3±9,96	1,5±0,32	0,2±0,06
Задний отдел гипоталамуса						
Контроль, (<i>n</i> =10)	2,2 ±0,43	0,22 ±0,07	4,9 ±1,05	98,1±12,58	1,5±0,18	0,3 ±0,05
Быстрое глубокое охлаждение, (<i>n</i> =10)	2,6 ±0,26	0,08 ±0,02	6,04±1,79	86,8±14,30	1,6±0,15	0,16±0,03
Медленное глубокое охлаждение, (<i>n</i> =10)	2,5 ±0,29	0,19 ±0,06	4,6 ±1,28	80,6 ±9,29	1,7±0,13	0,3 ±0,05

Примечание: данные представлены как число копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Ppia*. ** $p < 0,01$ – достоверное отличие от контроля

Медленное глубокое охлаждение вызывало увеличение экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса более чем в два раза (Рисунок 19.), уровень мРНК остальных генов TRP ионных каналов не изменялся. В заднем отделе гипоталамуса изменений в экспрессии генов термочувствительных ионных каналов не наблюдалось.

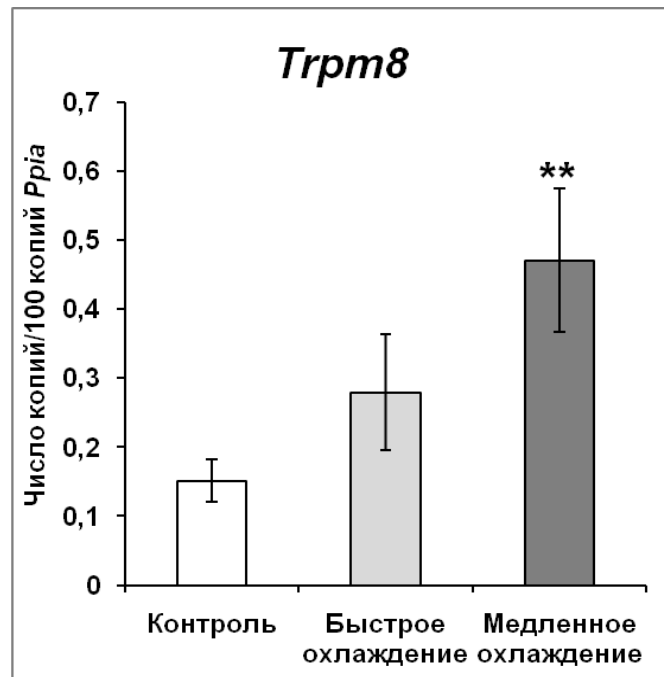


Рисунок 19. Уровень мРНК гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса гипертензивных животных в термонеutralных условиях (контроль) и при глубоком охлаждении – быстром и медленном. $n=10$, $**p<0,01$ – относительно контроля

Таким образом, у гипертензивных животных при остром охлаждении изменения в экспрессии генов исследованных TRP ионных каналов затрагивают только ген ионного канала TRPM8. Уровень мРНК гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса увеличивается в два раза только при медленном охлаждении, такое же по глубине быстрое охлаждение эффекта не оказывает.

3.3.3. Влияние активации периферического ионного канала TRPM8 агонистом ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе

В качестве эндогенного стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали один из генов «домашнего хозяйства» – ген пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Уровни мРНК *Ppia* в переднем и заднем гипоталамусе экспериментальных групп животных достоверно не различались (Таблица 13.).

Таблица 13. Уровень мРНК гена *Pria* (ng/ μ l) в переднем и заднем отделах гипоталамуса гипертензивных животных в термонеutralных условиях (контроль), при аппликации ментола и разных типах охлаждения

Воздействие	Отдел гипоталамуса		P
	Передний	Задний	
Контроль, ($n=10$)	13,4 \pm 2,52	16,5 \pm 2,12	>0,05
Аппликация ментола, ($n=10$)	19,7 \pm 2,92	15,9 \pm 2,10	>0,05
Быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, ($n=10$)	19,5 \pm 2,28	15,5 \pm 2,18	>0,05
Медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, ($n=10$)	18,7 \pm 2,01	15,2 \pm 2,33	>0,05

В Таблице 14. приведены данные об уровне мРНК генов термочувствительных TRP ионных в гипоталамусе гипертензивных крыс линии НИСАГ в термонеutralных условиях (контроль), после аппликации 1% суспензии ментола и после острого охлаждения на фоне аппликации.

Исследования показали, что в заднем отделе гипоталамуса ни аппликация ментола сама по себе, ни в сочетании с глубоким быстрым или медленным охлаждением не вызывает изменений в уровне мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов (Таблица 14.).

В ответ на аппликацию ментола на кожу наблюдается повышение экспрессии гена ионного канала TRPM8 в переднем отделе гипоталамуса (Рисунок 20.). Медленное глубокое охлаждение не вызывает дополнительного изменения в экспрессии генов TRP ионных каналов в переднем отделе гипоталамуса. Под влиянием быстрого глубокого охлаждения на фоне аппликации ментола наблюдается снижение экспрессии гена *Trpm8* до уровня контроля (Рисунок 20.).

Таблица 14. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в переднем и заднем отделах гипоталамуса гипертензивных животных в термонейтральных условиях (контроль), при аппликации ментола и разных типах охлаждения

Воздействие	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Передний отдел гипоталамуса						
Контроль, (<i>n</i> =10)	1,49±0,53	0,15±0,03	2,02±0,65	97,7±11,08	1,8±0,44	0,11±0,05
Аппликация ментола, (<i>n</i> =10)	1,27±0,29	0,4±0,07**	1,79±0,38	92,3±8,92	1,8±0,27	0,12±0,04
Быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =10)	1,89±0,42	0,18±0,04[#]	2,02±0,38	85,5±7,71	1,7±0,19	0,19±0,04
Медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =10)	1,08±0,25	0,5±0,14	2,1±0,36	85,6±7,22	2,44±0,39	0,3±0,09
Задний отдел гипоталамуса						
Контроль, (<i>n</i> =10)	2,2 ±0,43	0,22 ±0,07	4,9 ±1,05	98,1 ±12,58	1,5 ±0,18	0,3 ±0,05
Аппликация ментола, (<i>n</i> =10)	2,4 ±0,19	0,19 ±0,05	6,8 ±1,59	95,4 ±11,05	1,4 ±0,22	0,3 ±0,04
Быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =10)	2,7 ±0,33	0,19 ±0,06	4,2 ±0,69	100,2±11,11	1,97 ±0,29	0,3 ±0,05
Медленное глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола, (<i>n</i> =10)	2,3 ±0,42	0,15 ±0,04	5,3 ±0,94	87,3 ±9,93	1,8 ±0,19	0,3 ±0,05

Примечание: данные представлены как число копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Ppia*. ** $p < 0,01$ – достоверное отличие от контроля; # $p < 0,05$ – достоверное отличие от аппликации ментола

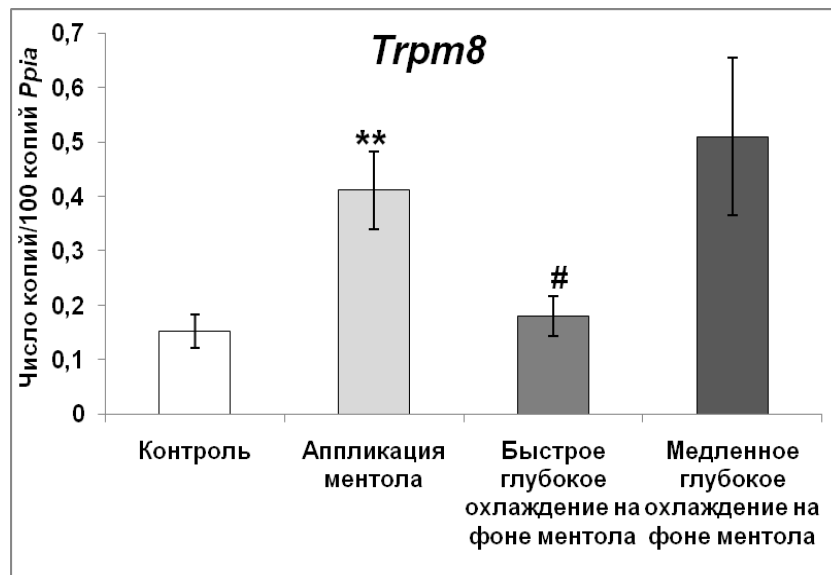


Рисунок 20. Уровень мРНК гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса гипертензивных животных в термонеutralных условиях (контроль), после аппликации ментола и охлаждения на фоне аппликации ментола. $n=10$, $**p<0,01$ – относительно контроля; $\#p<0,05$ – относительно аппликации ментола

Итак, у гипертензивных животных, имеющих исходно сниженную экспрессию гена *Trpm8* в гипоталамусе, активация периферического кожного ионного канала TRPM8 приводит к значительному (более чем в два раза) увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса. Экспрессия генов других TRP ионных каналов не претерпевает изменений ни в переднем, ни в заднем отделе гипоталамуса.

3.3.4. Экспрессия генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке – сравнение нормо- и гипертензивных животных

Показанные различия в экспрессии генов TRP ионных каналов в гипоталамусе ставили вопрос – имеются ли особенности в экспрессии генов этих каналов в периферических висцеральных органах при артериальной гипертензии.

При сравнении показателей разных экспериментальных групп в качестве эндогенного стандарта использовали – ген «домашнего хозяйства» – пептидил-пролил цис-транс изомеразы А (*Ppia*). Уровни мРНК *Ppia* составляли $6,22\pm 0,89$ ng/ μ l у нормотензивных крыс линии WAG и $5,71\pm 0,96$ ng/ μ l у гипертензивных

крыс линии НИСАГ и достоверно не различались ($p > 0,05$).

Наши исследования показали, что в органе иммунной системы – селезенке в разной степени экспрессируются гены как теплочувствительных, так и холодочувствительных TRP ионных каналов (Таблица 15.). Обращает на себя внимание довольно высокая экспрессия гена *Trpv2*, в десятки, а то и в сотни раз превышающая экспрессию других исследованных TRP ионных каналов. Эта особенность TRPV2 отмечалась и в исследованных нами структурах мозга.

Для генов теплочувствительных TRP ионных каналов – TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4, различий в экспрессии генов между гипертензивными и нормотензивными животными обнаружено не было (Таблица 15.).

Таблица 15. Уровень мРНК генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке у нормо- и гипертензивных животных

Линия животных	Гены TRP ионных каналов					
	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Нормотензивная линия WAG, ($n=10$)	1,6±0,21*	0,86±0,26**	0,7±0,14	189,2±37,53	3,1±0,59	0,24±0,09
Гипертензивная линия НИСАГ, ($n=10$)	0,9 ±0,18	0,0 ±0,00	0,6±0,15	155,8±14,01	2,3±0,61	0,37±0,16

Примечание: данные представлены как число копий исследуемого гена на 100 копий гена «домашнего хозяйства» *Ppia*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – достоверные различия между животными исследуемых линий

Для генов холодочувствительных TRP ионных каналов, наблюдаются различия в экспрессии у нормо-и гипертензивных животных. Уровень мРНК *Trpa1* у гипертензивной линии НИСАГ более чем в полтора раза ниже, чем у нормотензивной линии WAG (Рисунок 21.), а уровень мРНК гена *Trpm8* у гипертензивных животных, по-видимому, настолько мал, что не представляется возможным оценить степень его экспрессии (Рисунок 22.). Надо отметить, что уровень экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке у нормотензивных животных вполне сопоставим с их экспрессией в отделах гипоталамуса.

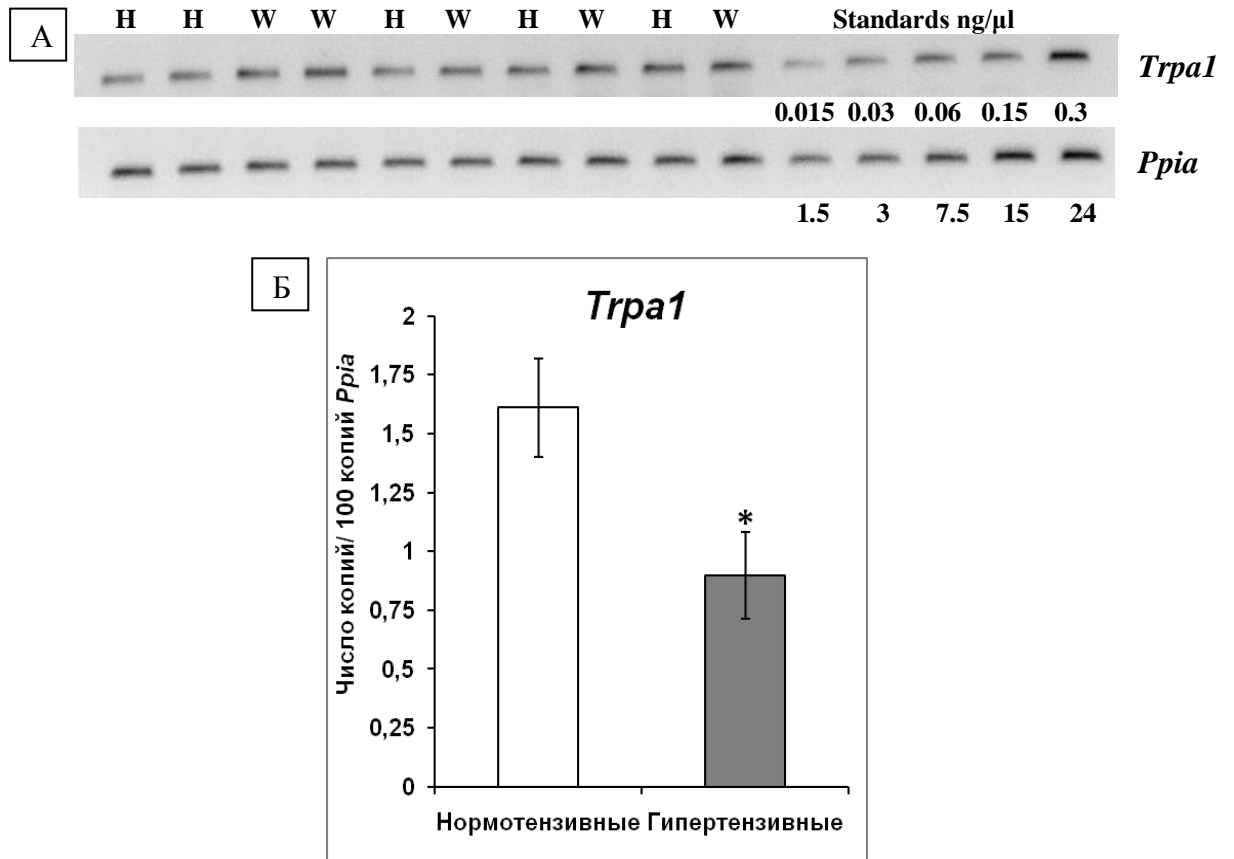


Рисунок 21. Экспрессия гена холодочувствительного ионного канала TRPA1 в селезенке нормо- и гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpa1* (36 циклов амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где Н – гипертензивная линия НИСАГ, W – нормотензивная линия WAG; **Б.** Уровень мРНК гена *Trpa1*. $n=10$, $*p<0,05$

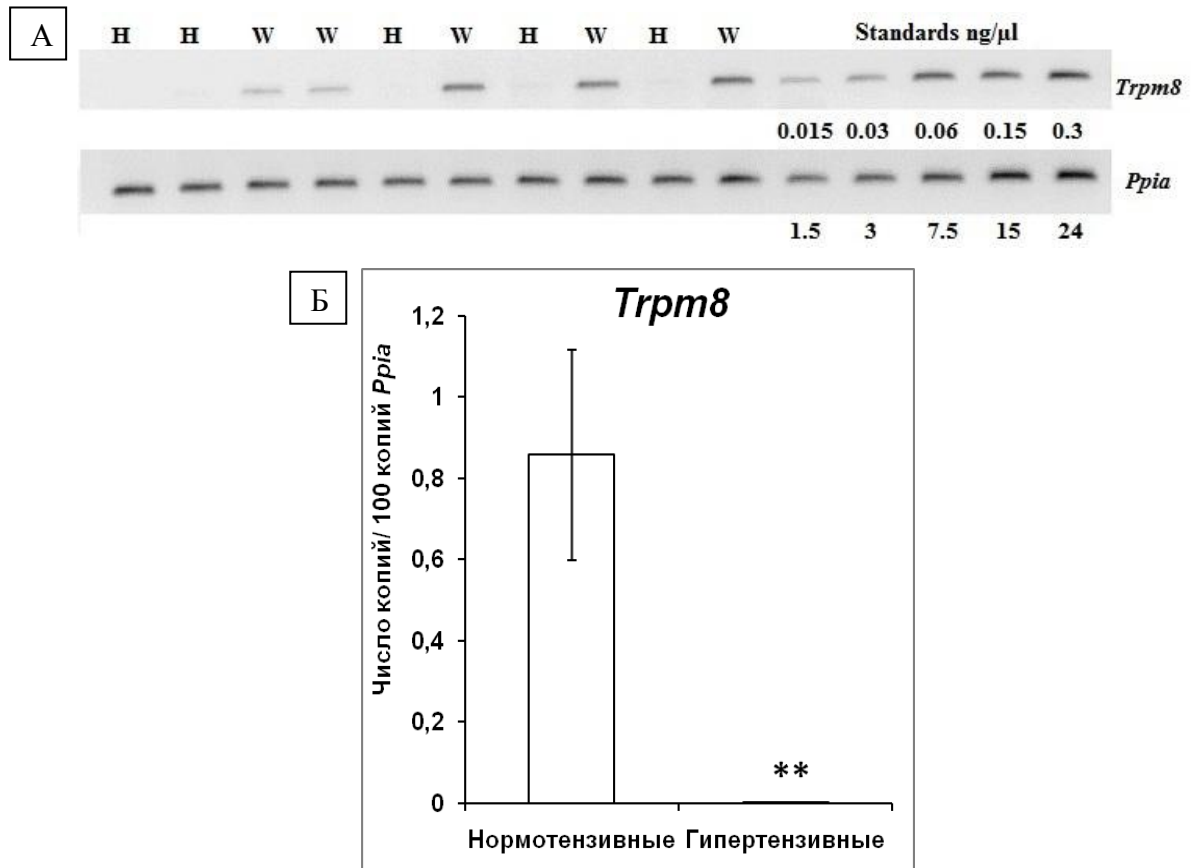


Рисунок 22. Экспрессия гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 в селезенке нормо- и гипертензивных животных.

А. Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемого гена – *Trpm8* (36 циклов амплификации) и гена «домашнего хозяйства» *Ppia* (28 циклов амплификации), где Н – гипертензивная линия НИСАГ, W – нормотензивная линия WAG; **Б.** Уровень мРНК гена *Trpm8*. $n=10$, $**p<0,01$

Таким образом, в висцеральном органе – селезенке, как и в структурах мозга при артериальной гипертензии выявляются изменения в экспрессии генов TRP ионных каналов. Обращает на себя внимание значительное снижение экспрессии гена ионного канала TRPM8 как в гипоталамусе, так и в селезенке.

3.4. ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ИОННОГО КАНАЛА TRPM8 МЕНТОЛОМ НА ТЕРМОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ МЕДЛЕННОМ ГЛУБОКОМ ОХЛАЖДЕНИИ

3.4.1. Влияние аппликации ментола на регистрируемые параметры в термонеutralных условиях

Исходные значения параметров температурного гомеостаза в термонеutralных условиях после аппликации физиологического раствора и 1% суспензии ментола в физиологическом растворе представлены в таблице 16. и 17. для нормо- и гипертензивных животных соответственно.

Таблица 16. Терморегуляторные показатели в термонеutralных условиях у нормотензивных крыс в контроле и при аппликации ментола

Показатели	Контроль (<i>n</i> =6)	Аппликация ментола (<i>n</i> =8)	P
Температура кожи уха, °C	30,0±0,17	29,6±0,17	>0,05
Температура кожи хвоста, °C	33,4±0,35	33,1±0,25	>0,05
Внутрикожная температура живота, °C	37,3±0,09	37,4±0,08	>0,05
Ректальная температура, °C	37,3±0,08	37,2±0,09	>0,05
Электрическая активность мышц, мкВ	1,3±0,08	1,4±0,11	>0,05
Общее потребление O ₂ , мл/мин*кг	24,5±0,75	24,0±0,64	>0,05
Выделение CO ₂ , мл/мин*кг	23,5±0,84	22,8±0,61	>0,05
Дыхательный коэффициент, ед.	0,955±0,0095	0,948±0,0101	>0,05

Таблица 17. Терморегуляторные показатели в термонеutralных условиях у гипертензивных крыс в контроле и при аппликации ментола

Показатели	Контроль ($n=10$)	Аппликация ментола ($n=10$)	P
Температура кожи уха, °C	28,5±0,14	28,6±0,23	>0,05
Температура кожи хвоста, °C	30,3±0,14	30,1±0,15	>0,05
Внутрикожная температура живота, °C	36,8±0,04	36,8±0,04	>0,05
Ректальная температура, °C	36,9±0,06	37,0±0,06	>0,05
Электрическая активность мышц, мкВ	1,2±0,06	1,4±0,09	>0,05
Общее потребление O ₂ , мл/мин*кг	18,6±0,32	18,9±0,35	>0,05
Выделение CO ₂ , мл/мин*кг	15,5±0,43	15,4±0,57	>0,05
Дыхательный коэффициент, ед.	0,837±0,0194	0,810±0,0227	>0,05

Как видно из представленных таблиц, в термонеutralных условиях не наблюдается физиологически значимых различий между контрольными животными и животными с аппликацией ментола.

3.4.2. Влияние аппликации ментола на параметры терморегуляторных реакций у нормотензивных крыс при медленном глубоком охлаждении

Медленное глубокое охлаждение вызывало комплекс реакций, направленных на сохранение температурного гомеостаза организма: снижалась температура кожи уха и хвоста (снижение теплоотдачи с поверхности тела), повышались потребление кислорода и выделение углекислого газа (повышение теплопродукции), увеличивалась сократительная активность мышц (возрастал сократительный термогенез). Снижение дыхательного коэффициента к концу охлаждения свидетельствовало о переходе на преимущественное использование липидов как субстрата окисления.

Активация ионного канала TRPM8 в коже (аппликация ментола) у нормотензивных животных вызывала ряд изменений в латентных периодах возникновения терморегуляторных реакций при медленном охлаждении. После аппликации ментола начинались раньше следующие реакции: констрикторная реакция сосудов кожи хвоста, повышение потребления кислорода и повышение выделения углекислого газа. Таким образом, ментол стимулировал развитие сосудистой и метаболической реакций и не оказывал влияние на возникновение сократительного термогенеза (Рисунок 23.).

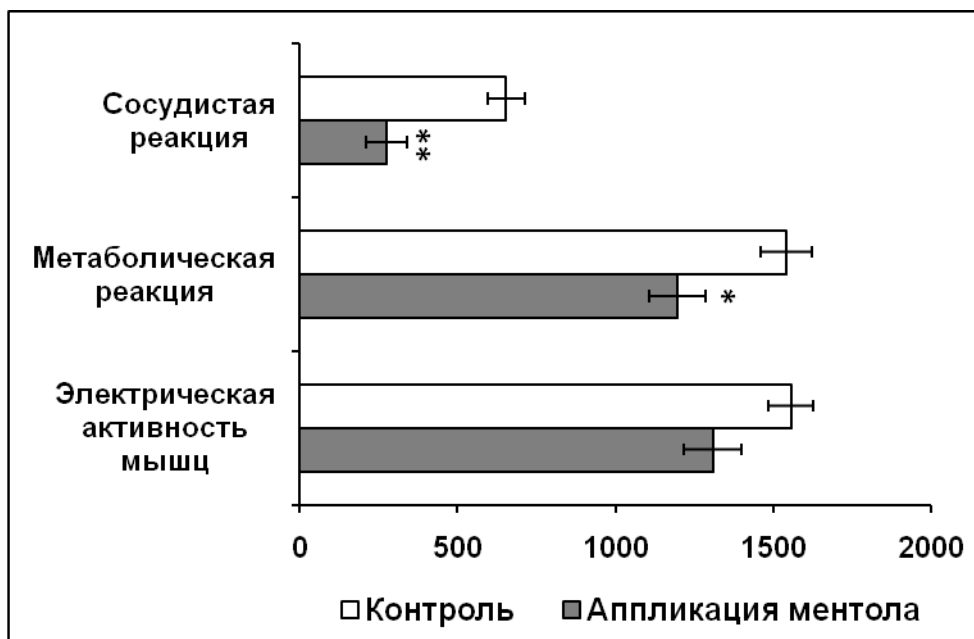


Рисунок 23. Латентные периоды (сек.) возникновения терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении в контроле и при аппликации ментола у нормотензивных крыс. $n=6-8$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ – относительно контроля

При инициации терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении наблюдались различия в порогах по ректальной температуре и температуре кожи живота (Рисунок 24.).

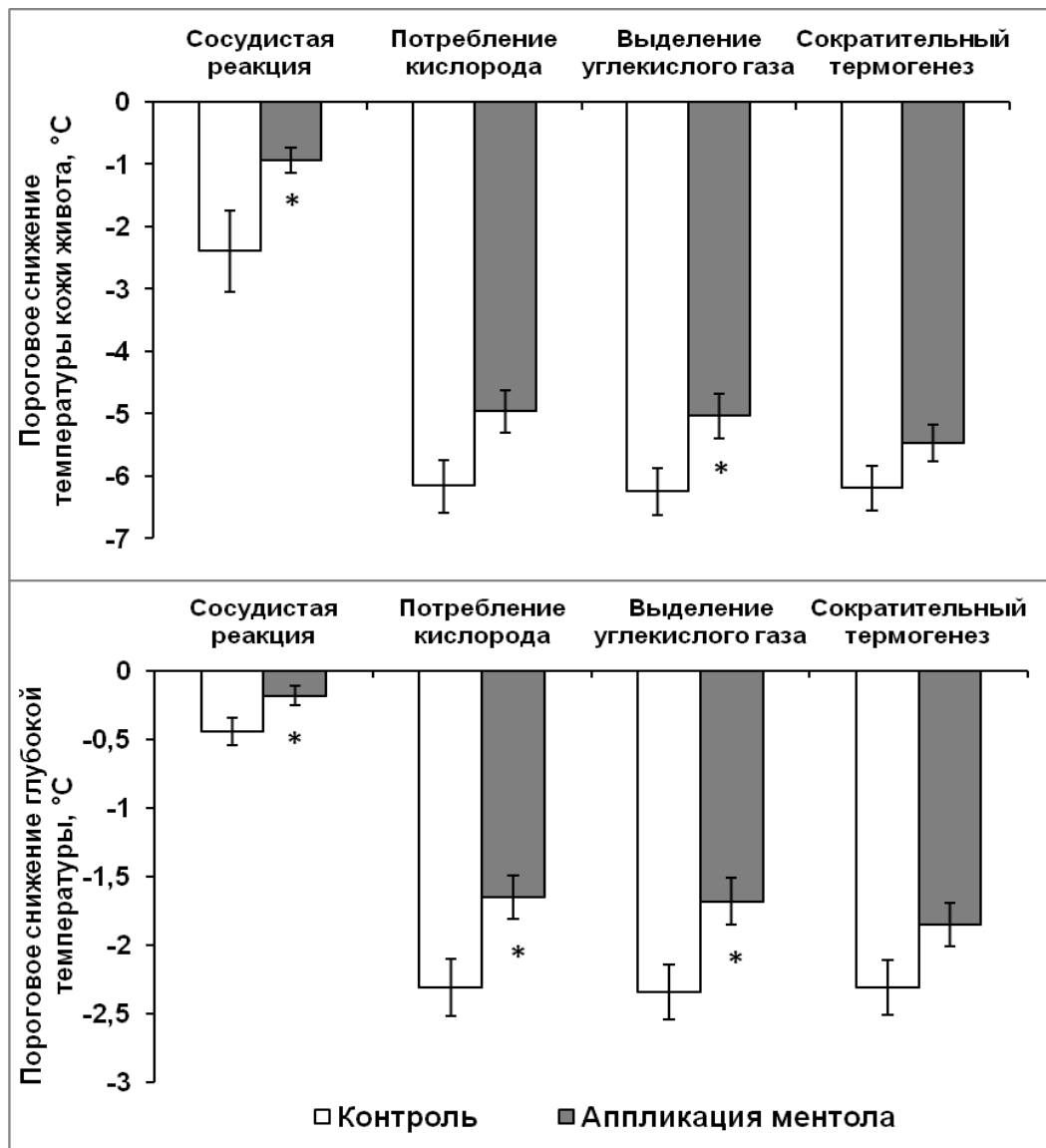


Рисунок 24. Пороговое снижение температуры кожи живота и ректальной температуры при медленном глубоком охлаждении в контроле и после аппликации ментола у нормотензивных крыс. $n=6-8$, $*p<0,05$ – относительно контроля

При аппликации ментола, в отличие от контроля, метаболическая реакция, характеризующаяся повышением потребления кислорода и выделения углекислого газа, а также сосудистая реакция развивались раньше и при меньшем падении ректальной и кожной температур (Рисунок 23, 24).

Максимальные изменения показателей, характеризующих теплопродукцию и теплоотдачу, у нормотензивных животных не зависели от того, подвергалось ли

животное предварительной аппликации ментола. Однако при аппликации ментола наблюдалось меньшее снижение дыхательного коэффициента (Таблица 18.).

Таблица 18. Максимальное изменение показателей, характеризующих теплопродукцию и теплоотдачу, при медленном глубоком охлаждении в контроле и после аппликации ментола у нормотензивных крыс

Показатель	Контроль ($n=6$)	Аппликация ментола ($n=8$)	P
Температура кожи уха ($^{\circ}\text{C}$)	$-2,4 \pm 0,20$	$-1,9 \pm 0,36$	$>0,05$
Температура кожи хвоста ($^{\circ}\text{C}$)	$-3,8 \pm 0,30$	$-4,0 \pm 0,64$	$>0,05$
Потребление кислорода (мг/мин*кг)	$+10,1 \pm 1,26$	$+11,6 \pm 1,44$	$>0,05$
Выделение углекислого газа (мг/мин*кг)	$+7,0 \pm 1,14$	$+10,4 \pm 1,56$	$>0,05$
Дыхательный коэффициент	$-0,090 \pm 0,0137$	$-0,041 \pm 0,0155$	$<0,05$
Электрическая активность мышц (мкВ)	$+12,7 \pm 1,98$	$+9,9 \pm 1,15$	$>0,05$

Примечание: (+) - прирост показателя, (-) – снижение показателя.

Таким образом, при аппликации ментола на кожу в области приложения холодого стимула при медленном глубоком охлаждении у нормотензивных крыс метаболическая и сосудистая реакции возникают раньше, при меньшем падении температуры кожи живота и ректальной температуры по сравнению с контролем (охлаждение без аппликации ментола). Аппликация ментола приводит к меньшему снижению дыхательного коэффициента, происходящему при воздействии холода.

3.4.3. Влияние аппликации ментола на параметры терморегуляторных реакций у гипертензивных крыс при медленном глубоком охлаждении

Холодовые воздействия вызывали у гипертензивных животных, как и у нормотензивных, комплекс реакций, направленных на сохранение

температурного гомеостаза организма: снижалась температура кожи уха и хвоста (снижение теплоотдачи с поверхности тела), повышалось потребление кислорода и выделение углекислого газа (повышение теплопродукции), увеличивалась сократительная активность мышц (возрастал сократительный термогенез). Снижение дыхательного коэффициента к концу охлаждения свидетельствовало о переходе на преимущественное использование липидов как субстрата окисления.

В отличие от нормотензивных животных, активация ионного канала TRPM8 его агонистом – ментолом, у гипертензивных животных не вызвала изменений в латентных периодах возникновения терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении (Таблица 19.), не наблюдалось и различий в порогах по ректальной температуре и температуре кожи живота (Таблица 20.). Максимальные изменения показателей, характеризующих теплопродукцию и теплоотдачу, у гипертензивных животных также не зависели от того, подвергалось ли животное аппликации ментола (Таблица 21.).

Таблица 19. Латентные периоды (сек.) возникновения терморегуляторных реакций у гипертензивных животных при медленном глубоком охлаждении в контроле и при аппликации ментола

Реакции	Контроль ($n=10$)	Аппликация ментола ($n=10$)	P
Констрикция сосудов кожи уха	220,2±26,01	235,9±34,02	>0,05
Констрикция сосудов кожи хвоста	271,3±25,30	257,7±39,79	>0,05
Снижение ректальной температуры	216,2±9,54	205,5±11,58	>0,05
Повышение потребления кислорода	1243,8±87,34	902,9±170,21	>0,05
Повышение выделения углекислого газа	1254,3±85,99	942,6±176,05	>0,05
Повышение электрической активности мышц шеи	1357,5±173,53	1428,8±113,76	>0,05

Таблица 20. Пороговое снижение ($^{\circ}\text{C}$) температуры кожи живота и ректальной температуры при инициации терморегуляторных реакций у гипертензивных крыс при медленном глубоком охлаждении в контроле и после аппликации ментола

Показатели	Ректальная температура			Температура кожи живота		
	Контроль ($n=10$)	Аппликация ментола ($n=10$)	P	Контроль ($n=10$)	Аппликация ментола ($n=10$)	P
Сосудистая реакция	$-0,2\pm 0,03$	$-0,2\pm 0,04$	$>0,05$	$-2,2\pm 0,17$	$-2,2\pm 0,21$	$>0,05$
Потребление кислорода	$-2,3\pm 0,22$	$-1,6\pm 0,42$	$>0,05$	$-9,8\pm 0,50$	$-8,0\pm 1,26$	$>0,05$
Выделение углекислого газа	$-2,3\pm 0,22$	$-1,7\pm 0,44$	$>0,05$	$-9,9\pm 0,48$	$-8,3\pm 1,28$	$>0,05$
Сократительный термогенез	$-2,6\pm 0,39$	$-2,4\pm 0,34$	$>0,05$	$-10,1\pm 0,99$	$-12,3\pm 1,02$	$>0,05$

Таблица 21. Максимальное изменение показателей, характеризующих теплопродукцию и теплоотдачу, у гипертензивных крыс при медленном глубоком охлаждении в контроле и при аппликации ментола

Показатели	Контроль ($n=10$)	Аппликация ментола ($n=10$)	P
Температура кожи уха ($^{\circ}\text{C}$)	$-2,6\pm 0,24$	$-2,1\pm 0,28$	$>0,05$
Температура кожи хвоста ($^{\circ}\text{C}$)	$-3,2\pm 0,34$	$-3,6\pm 0,41$	$>0,05$
Потребление кислорода (мг/мин*кг)	$+7,8\pm 1,20$	$+12,1\pm 1,94$	$>0,05$
Выделение углекислого газа (мг/мин*кг)	$+5,9\pm 0,84$	$+8,9\pm 1,69$	$>0,05$
Дыхательный коэффициент	$-0,054\pm 0,0120$	$-0,059\pm 0,0088$	$>0,05$
Электрическая активность мышц (мкВ)	$+8,0\pm 1,43$	$+8,2\pm 1,45$	$>0,05$

Примечание: (+) – прирост показателя, (-) – снижение показателя.

У гипертензивных крыс линии НИСАГ не наблюдается выраженных изменений показателей терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении на фоне активации ионного канала TRPM8 его агонистом – ментолом. Изменения после аппликации ментола не отличались от таковых в контроле.

Полученные результаты свидетельствуют, что в термонеutralных условиях аппликация ментола в используемой концентрации не оказывает влияние на терморегуляторные показатели ни у нормотензивных, ни у гипертензивных крыс. При охлаждении животных после аппликации ментола термозащитные реакции организма претерпевали изменения только у нормотензивных крыс, в то время как у гипертензивных достоверных различий обнаружено не было.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные подтверждают предположение о том, что нормотензивные и гипертензивные животные имеют разную температурную чувствительность. Обнаруженная у гипертензивных животных сниженная чувствительность терморегуляторных реакций к стимуляции ионного канала TRPM8 вполне согласуется со сниженной у них экспрессией гена этого ионного канала.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современные представления о системе терморегуляции свидетельствуют об участии в процессах поддержания температуры тела многих отделов центральной нервной системы (Kanosue et al., 1998; Nagashima et al., 2000; Nagashima, 2006). Необходимо отметить, что участие различных отделов мозга в механизмах терморегуляции неодинаково. Известно, что центром терморегуляции является гипоталамус (Hammel et al., 1963; Boulant, 1998). Нейроны ядер среднего мозга представляют собой звено в передаче температурной информации от периферических терморцепторов к гипоталамусу (Reaves, Hayward, 1979; Bruck, Hinckel, 1980). Показано, что гиппокамп облегчает развитие терморегуляторной реакции на охлаждение (Hammel, 1968; Hensel, 1973), кроме того, терморегуляторным изменениям теплокровного организма предшествуют изменения активности нейронов гиппокампа (Ootsuka et al., 2009). Что касается коры головного мозга, существуют данные о наличии собственной термочувствительности ее нейронов (Ройтбак, Беказ, 1967; Козырева, 1972). Соответственно, нами было сделано предположение о том, что профиль экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в разных отделах мозга может быть различным.

В представленной работе впервые проведено сравнительное исследование уровня экспрессии генов 6 наиболее признанных на сегодняшний день термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе, а также в таких отделах мозга как фронтальная кора, средний мозг и гиппокамп у типичных теплокровных животных – крыс. Исследование проведено количественным методом ПЦР в сочетании с реакцией обратной транскрипции. Как правило, уровень экспрессии гена соответствует количеству кодируемого этим геном белка, поэтому, зная о величинах экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов, можно экстраполировать эти данные на количество самих TRP ионных каналов. До настоящего исследования данные о наличии TRP ионных каналов в структурах мозга были получены разными

методами и на разных животных – линиях крыс (Mezey et al., 2000; Liapi, Wood, 2005; Guatteo et al., 2005; Du et al., 2009; Maione et al., 2011) и мышей (Dhaka et al., 2007; Sokabe, Tominaga, 2009), а также приматах (Gavva et al., 2007) и человеке (Mezey et al., 2000; Gavva et al., 2007). Поэтому сопоставить их количество не представлялось возможным. Кроме того, несмотря на имеющиеся обобщающие данные о термочувствительных TRP ионных каналах (Lidtke, Heller, 2007; Nilius, Flockerzi, 2014), нам не удалось обнаружить сведений о наличии всех термочувствительных TRP каналов в исследуемых отделах мозга теплокровных животных – крыс. Так, не было найдено информации о TRPV3 и TRPM8 в гипоталамусе, о TRPA1 и TRPM8 – в коре и гиппокампе, о TRPV2 – в районе среднего мозга.

Согласно нашим результатам во всех исследованных структурах мозга активно экспрессируются гены термочувствительных TRP ионных каналов, активирующихся при температурах выше 30°C, в то время как уровень экспрессии генов TRP каналов, активирующихся при более низких температурах (TRPA1 и TRPM8), значительно ниже. Именно из-за невысокой экспрессии их генов De la Pena с соавторами (2005) пришли к заключению об отсутствии этих каналов в гиппокампе. Эти авторы так же, как и мы, работали методом ОТ-ПЦР, но не количественным. В описании их методики не было отмечено каких-либо специальных условий проведения амплификации для отдельных генов, скорее всего праймеры подбирались так, чтобы условия амплификации для всех исследуемых генов были одинаковыми. Поэтому не удивительно, что на фоне интенсивно экспрессирующегося гена β -актина экспрессия генов *Trpa1* и *Trpm8* зарегистрирована не была. На наш взгляд по той же причине к выводу об отсутствии в гиппокампе TRPM8 пришли также Zhang с соавторами (2008), несмотря на то, что зарегистрировали влияние ментола – агониста TRPM8-канала – (in vivo и in vitro) на ГАМК-эргическую систему в этом отделе мозга.

Ионные каналы TRPA1 и TRPM8 рассматриваются большинством исследователей (Viana et al., 2002; Patapoutian et al., 2003; McKemy, 2005) как молекулярная основа физиологических ощущений холода. Обнаруженный нами

факт невысокой экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов вполне согласуется с нейрофизиологическими данными о преобладании тепловой чувствительности в центральной нервной системе по сравнению с периферической (Brück, Zeisberger, 1986; Kozyreva, Pierau, 1994; Boulant, 1998). Интересно, что наивысшая экспрессия гена *Trpm8* зарегистрирована во фронтальной коре. Известно, что температура коры мозга колеблется в достаточно широких пределах, допуская снижение температуры примерно на 1,5-2°C (Иванов, 1990). Не исключено, что именно этим обусловлен высокий уровень экспрессии гена ионного канала TRPM8, активирующегося при понижении температуры.

Обращает на себя внимание высокая экспрессия гена *Trpv2*, которая наблюдается во всех исследованных отделах головного мозга и, как будет описано ниже, в селезенке. В отношении этого TRP канала наши результаты полностью совпадают с данными Kojima, Nagasawa (2007) о высоком уровне экспрессии TRPV2 в мозге. Необходимо отметить, что высокая экспрессия характерна для так называемых «генов домашнего хозяйства» (housekeeping genes), которые кодируют белки, необходимые для реализации основных биохимических процессов и экспрессия которых осуществляется на относительно постоянном уровне практически во всех тканях и клетках. Известные особенности функционирования этого канала – связь с цитоскелетом, цитоплазматическим ретикулумом, участие в регуляции проницаемости клеточной мембраны для ионов Ca^{2+} (Kojima, Nagasawa, 2007), и процессах нейропластичности (Shibasaki et al., 2010), подтверждают предположение о его участии в жизненно важных процессах клеток головного мозга. Это предположение хорошо согласуется с данными (Park et al., 2011), свидетельствующими о том, что нокаут по гену *Trpv2* приводит к снижению веса эмбрионов и взрослых животных, а так же к снижению жизнеспособности в перинатальный период.

Сравнение экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в исследованных областях головного мозга крыс показали, что уровень экспрессии, как правило, выше в гипоталамусе (за исключением упомянутого выше TRPM8 и

TRPV3, чей уровень мРНК был сопоставим с уровнем в среднем мозге), чем в других областях мозга. Это может быть связано с исключительной ролью гипоталамуса в терморегуляции.

Что касается TRPV4, уровень его мРНК в гипоталамусе оказался на порядок выше по сравнению с другими исследованными отделами мозга. Ранее иммуногистохимически было показано наличие этого канала в преоптической зоне гипоталамуса (Guller et al., 2002; Wechselberger et al., 2006). Wechselberger с соавторами (2006) констатируют, что иммунореактивность к TRPV4 не свойственна нейронам гипоталамуса, а присутствует в пересекающих его аксонах и синаптических окончаниях его иннервирующих. Однако наличие мРНК *Trpv4* в гипоталамусе, обнаруженное в настоящей работе, свидетельствует о том, что клетки этого отдела мозга синтезируют молекулы данного ионного канала. Более высокий уровень экспрессии *Trpv4* в гипоталамусе по сравнению с другими отделами мозга, очевидно, связан с мультифункциональностью этого ионного канала, с его способностью реагировать не только на внеклеточные температурные стимулы, но и на осмотические (Plant, Strotmann, 2007). Не исключено, что его участие в регуляции водно-солевого баланса и определило высокий уровень экспрессии этого канала в гипоталамусе.

Хотелось бы коснуться и вопроса о том, каков физиологический смысл наличия в структурах головного мозга теплокровного животного TRP каналов, активирующихся *in vitro* при температурах, значения которых выходят за рамки возможных физиологических колебаний этого показателя (для TRPV2 $>52^{\circ}\text{C}$, TRPA1 $<17^{\circ}\text{C}$ и TRPM8 $<28^{\circ}\text{C}$). Не исключено, что основная роль таких TRP каналов связана не только с температурной чувствительностью. Так, например, для TRPA1 предполагают участие в регуляции выделения глутамата в супраоптическом ядре гипоталамуса (Yokoyama et al., 2011). Ионный канал TRPV2, согласно Wainwright et al. (2004), вовлечен в процессы высвобождения окситоцина и вазопрессина. TRPM8 в гиппокампе оказывает влияние на ГАМК-эргическую систему (Zhang et al., 2008). Еще одним объяснением может служить тот факт, что гены разных TRP каналов могут экспрессироваться в одной и той же

клетке, что впоследствии не исключает образования гетеромерных ионных каналов со свойствами, отличающимися от мономерных конструкций (Liari, Wood, 2005; Salas et al., 2009; Cheng et al., 2012). Солокализация показана для TRPV2 и TRPV1 в клетках коры головного мозга крыс (Liari, Wood, 2005). В культуре сенсорных нейронов крысы часть TRPV1-положительных клеток демонстрировала экспрессию TRPA1 (Jordt et al., 2004). И, наконец, нельзя забывать, что традиционно указываемые в литературе характеристики термочувствительности TRP каналов получены в искусственных условиях на культурах клеток и в живом организме могут быть иными.

Фактом, заслуживающим повышенного внимания, является показанное в данной работе влияние длительной адаптации к холоду на уровень экспрессии гена термочувствительного TRPV3 ионного канала в гипоталамусе.

Снижение экспрессии гена *Trpv3*, обнаруженное у адаптированных к холоду животных, позволяет предполагать участие этого ионного канала в обеспечении собственной температурной чувствительности и адаптивных изменений нейронов гипоталамуса. Известно, что активность ионного канала TRPV3 имеет место при температурах 31-39 °C (Jordt et al., 2003), то есть в физиологическом диапазоне температур. Ранее, в работе Козыревой и Пирау (1994) было показано наличие в гипоталамусе крыс трех типов термочувствительных нейронов, различающихся по способности изменять свою активность в зависимости от диапазона предъявленных температур. Были обнаружены нейроны, (1) чувствительные к изменению температуры в диапазоне 35-38°C и нечувствительные или слабо чувствительные в области температур 38-41°C; (2) нейроны, чувствительные к изменению температуры в диапазоне 38-41°C и нечувствительные в области 35-38°C; а также (3) нейроны, чувствительные к изменению температуры во всем диапазоне исследованных температур 35-41°C. Адаптация к холоду приводила к увеличению количества нейронов, чувствительных в области температур 38-41°C., и снижению доли нейронов, чувствительных в области более низких температур (35-38°C). Температурные диапазоны активации TRPV3 ионного канала и тех нейронов, число которых в результате адаптации уменьшилось,

совпадают, кроме того, как обнаружено в настоящем исследовании, адаптация к холоду снижает уровень мРНК ионного канала TRPV3. При сопоставлении этих фактов складывается впечатление, что именно TRPV3 ионный канал ответственен за обеспечение температурной чувствительности той части нейронов гипоталамуса, что чувствительны в области температур 35-38°C, и их изменений, возникающих при холодовой адаптации.

В нашем исследовании адаптация животных к холоду привела к изменению уровня мРНК TRPV3 только в гипоталамусе, а уровень мРНК других исследованных нами TRP ионных каналов остался неизменным. Вероятно, это можно связать с тем, что активируются эти каналы при разных температурах, и не исключено, что изменение экспрессии генов таких ионных каналов как TRPV1, TRPV2 или TRPV4 будет обнаружено при адаптации животных к высоким температурам.

Ранее, при исследовании уровня мРНК серотониновых рецепторов в гипоталамусе у адаптированных к холоду животных (Voronova et al., 2007), было показано влияние температурной адаптации на процессы, происходящие на уровне функционирования генома. Было высказано предположение о том, что механизмом изменения термочувствительности нейронов гипоталамуса могут быть изменения в соотношении рецепторов различных медиаторов, расположенных на поверхности гипоталамического нейрона. Очевидно, эти два механизма (связанные с изменением соотношения TRP каналов и с изменением в соотношении рецепторов различных медиаторов) взаимно дополняют друг друга.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что температурная адаптация может затрагивать процессы, происходящие на уровне экспрессии мРНК, а само изменение экспрессии генов TRP ионных каналов является одним из молекулярных механизмов изменения термочувствительности нейронов гипоталамуса при длительных температурных воздействиях.

В настоящее время также показано участие термочувствительных TRP ионных каналов в патогенезе целого ряда заболеваний (Nilius et al., 2007; Okuhara et al., 2007; Vay et al., 2012), в том числе сердечно-сосудистых (Liu et al., 2008;

Zholos, Curtis, 2013). В нашем исследовании в качестве модели артериальной гипертензии использовались крысы линии НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. Предыдущие исследования нашей лаборатории (Ломакина и др., 2002; Kozyreva et al., 2004; Kozyreva et al., 2011) и анализ литературных данных позволил выдвинуть предположение о возможности участия термочувствительных TRP ионных каналов в изменении температурной чувствительности у гипертензивных животных, что вполне может найти отражение и в экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе.

Необходимо отметить, что сам гипоталамус не является структурой однородной, его передний и задний отделы функционально различны. Относительно участия отделов гипоталамуса в поддержании кровяного давления известно, что в переднем гипоталамусе преимущественно сосредоточены депрессорные зоны, в то время как в заднем – прессорные. Такое разделение достаточно условно, поскольку именно в переднем гипоталамусе располагаются супраоптическое и паравентрикулярное ядра, в нейронах которых продуцируется вазопрессин (антидиуретический гормон), одним из действий которого является повышение артериального давления. В плане регулирования температуры тела считается, что передняя часть гипоталамуса (преоптическое ядро) в основном является термодетектором, тогда как задняя – интегративной структурой (Хензель, 1960; Дымникова, 1979; Гурин, 1980; 1989; Иванов, 1984).

При исследовании экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в функционально различных отделах гипоталамуса, было обнаружено, что гены как теплочувствительных, так и холодочувствительных TRP ионных каналов экспрессируются в обеих частях гипоталамуса как у нормотензивных, так и гипертензивных животных. Сравнение же уровня мРНК термочувствительных TRP каналов в гипоталамусе у нормотензивных и гипертензивных животных выявило отличия по этому показателю для генов *Trpm8* и *Trpv4*.

Ионный канал TRPM8 – неселективный кальциевый канал,

активирующийся холодом и ментолом, играет важную роль в холодовой чувствительности (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Reid, 2005; Voets et al., 2007). Обнаруженный нами факт изменения экспрессии гена *Trpm8* у крыс гипертензивной линии по сравнению с нормотензивными животными позволяет предполагать вовлеченность этого гена в процессы, связанные с гипертензивным состоянием. Возможная связь области гена *TRPM8*, локализованного в районе 2q37.1 второй хромосомы (Voets et al., 2007), с регуляцией кровяного давления у людей выявлена при полногеномном исследовании ассоциаций (He et al., 2013). Эта связь была обнаружена для изменения кровяного давления в ответ на холодовой прессорный тест, который введен в клиническую практику для оценки риска возникновения артериальной гипертензии (Hines, Brown, 1936; Hines, 1939; Lavallo, 1975; Matthews et al., 2004). Ионный канал TRPM8, как было указано выше, считается молекулярной основой физиологических ощущений холода, поэтому и сами авторы (He et al., 2013) подчеркивают, что TRPM8 является логическим кандидатом для связи изменения артериального давления в ответ на холод. Обнаруженное нами изменение экспрессии гена *Trpm8* в гипоталамусе у крыс в данном эксперименте с температурными воздействиями не связано и может быть интерпретировано только в связи с гипертензивным состоянием животных.

Не так давно появилась работа, посвященная роли TRPM8 в поддержании артериального давления (Sun et al., 2014). Авторы обнаружили, что употребление содержащей ментол диеты приводит к понижению артериального давления у людей с предрасположенностью к гипертензии, у крыс SHR и у мышей дикого типа (без дефектов по TRPM8). Причиной снижения давления, как было показано, является дилатация сосудов внутренних органов, опосредованная влиянием ментола на TRPM8 гладкомышечных клеток сосудов (Sun et al., 2014).

Хотелось бы отметить, что умеренное холодовое воздействие (в других терминах – активация TRPM8 нервных окончаний, расположенных в коже) в литературе рассматривается как важнейший экологический фактор, ведущий к повышению артериального давления у людей (Brook, 2011) и в

экспериментальных моделях (Fragly, 1989; Sun, 2010). Причиной повышения артериального давления в этих случаях, как правило, называют активацию симпатoadреналовой системы, вызывающую констрикцию периферических сосудов, несмотря на то, что при этом, как известно, возникает дилатация сосудов внутренних органов (Riedel et al., 1982). Таким образом, согласно литературным данным, в зависимости от локализации TRPM8 (расположен ли этот ионный канал в нервных окончаниях кожи или в гладкой мускулатуре сосудов), его активация может приводить к противоположным эффектам на артериальное давление.

Роль TRPM8 гипоталамуса в механизмах влияния на кровяное давление остается неясной. Однако, тот факт, что в депрессорных областях (передний гипоталамус) экспрессия гена этого ионного канала более высокая, чем в прессорных (задний гипоталамус), и у нормотензивных животных выше, чем у гипертензивных, – позволяет предполагать вовлеченность ионного канала TRPM8 гипоталамуса в гипертензивное состояние животных.

Ионный канал TRPV4 – кальциевый катионный канал, найден в сенсорных и несенсорных клетках различных органов и тканей и может активироваться с помощью изменения осмолярности, а также температурными, механическими и некоторыми химическими раздражителями (Heller, O'Neil, 2007; Plant, Strotmann, 2007; Harteneck, Schultz, 2007). В нашем исследовании уровень экспрессии гена этого ионного канала у гипертензивных животных превышал этот показатель у нормотензивных.

Внимание к TRPV4 в связи с регуляцией артериального давления обусловлено преимущественно его механо - и осмочувствительностью. Наличие TRPV4 в гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов привело к появлению большого количества работ (Hartmannsgruber et al., 2007; Earley et al., 2010; Baylie, Brayden, 2011; Bagher et al., 2012; Filosa et al., 2013), посвященных участию этого ионного канала в регуляции сосудистого тонуса. Сосудистый тонус – один из важнейших факторов, оказывающих влияние на периферическое сопротивление кровотоку и как следствие на величину артериального давления.

Активация TRPV4 при внутривенном введении его агониста 4 α -PDD вызывает гипотонию у крыс (Gao et al., 2009). Однако его участие в регуляции артериального давления не столь однозначно. Так на мышах с нокаутом по гену этого ионного канала показано, что отсутствие *Trpv4* в обычных условиях на величине артериального давления не сказывается: животные *Trpv4*^{-/-} и дикого типа по этому показателю не отличаются (Mizuno et al., 2003; Zang et al., 2009; Earley et al., 2009). Отличия проявляются при дополнительных воздействиях на организм. Снижение среднего кровяного давления после внутривенного введения ацетилхолина у мышей *Trpv4*^{-/-} было существенно меньше, чем у мышей дикого типа (Zang et al., 2009). При хроническом введении ингибитора NOS больший подъем среднего кровяного давления наблюдался у мышей нокаутных по гену *Trpv4* (Earley et al., 2009). В работе Earley et al. (2009) показано участие TRPV4 в регуляции сосудистого сопротивления при артериальной гипертензии. Авторы отмечают, что ионный канал TRPV4 может представлять новую перспективную цель для антигипертензивной медикаментозной терапии (Earley et al., 2009).

В моделях с хорошо выраженной гипертензией (Dahl Salt-Sensitive крысы на высокосолевого диете или DOCA-salt-hypertension) авторы Gao и Wang (2010) пытались выяснить роль ионного канала TRPV4 в развитии гипертензии. В своих экспериментах они доказывают роль TRPV4 как ионного канала, препятствующего развитию гипертензии. Хотя Dahl Salt крыс и сами авторы рассматривают как модель весьма специфичную (Gao, Wang, 2010). В исследуемой нами модели наследственной стресс-индуцированной гипертензии в ходе ее создания основным действующим фактором был стресс, сопровождающийся активацией симпатoadреналовой системы. Очевидно, что при повышенном артериальном давлении должны были бы активизироваться и механизмы отрицательной обратной связи, в том числе и TRPV4. Надо полагать, что TRPV4 не является основным звеном в поддержании кровяного давления (вспомним приведенные выше данные о животных, нокаутных по гену этого ионного канала). Обнаруженное нами увеличение экспрессии гена *Trpv4* в заднем гипоталамусе (прессорная область) у гипертензивных животных по сравнению с

нормотензивными, по-видимому, оказалось закреплено отбором вместе с повышенным артериальным давлением у крыс линии НИСАГ.

Хотелось бы отметить, что у крыс гипертензивной линии НИСАГ по сравнению с нормотензивными животными WAG или Wistar имеют место изменения в электролитном составе в разных тканях (Антонов и др., 1998; Федосеева и др., 2011), в частности повышена концентрация натрия в плазме крови (Федосеева и др., 2011). Принимая во внимание, что TRPV4 был идентифицирован как осморецептор (Liedtke et al., 2000; Strotmann et al., 2000; Wissenbach et al., 2000), нельзя исключить и возможность того, что обнаруженные нами изменения экспрессии гена *Trpv4* в гипоталамусе связаны с различиями в электролитном балансе у животных исследованных линий.

Нельзя забывать и о том, что TRPV4 и TRPM8 – это термочувствительные ионные каналы. Ранее в нашей лаборатории при исследовании крыс гипертензивной линии НИСАГ были получены данные о различии в латентных периодах и температурных порогах возникновения терморегуляторных реакций у этих животных по сравнению с нормотензивными (Ломакина и др., 2002). Эти данные позволили сделать закономерный вывод о различии в температурной чувствительности у нормо- и гипертензивных животных. И было высказано предположение, что изменения термочувствительности могут иметь место и в центре терморегуляции – гипоталамусе. Настоящее исследование экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в гипоталамусе у нормо- и гипертензивных крыс линий WAG и НИСАГ выявило различия между этими линиями. Можно предположить, что обнаруженные различия в экспрессии *Trpm8* и *Trpv4* и являются молекулярной основой различий в термочувствительности у животных этих линий.

В нашем исследовании сравнение экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов у гипер- и нормотензивных животных проводилось не в целом гипоталамусе, а в переднем и заднем его отделах, что несомненно дает дополнительную информацию о роли TRP ионных каналов в этом отделе мозга. Для животных обеих линий уровень матричной РНК *Trpv1* и *Trpa1* в заднем

гипоталамусе оказался достоверно выше, чем в переднем, а уровень мРНК *Trpm8* – наоборот, выше в переднем гипоталамусе. Ген ионного канала TRPV4 продемонстрировал более сложную зависимость своей экспрессии – у крыс гипертензивной линии НИСАГ в заднем гипоталамусе она оказалась выше, чем в переднем, у крыс нормотензивной линии WAG различий в экспрессии гена *Trpv4* между отделами гипоталамуса обнаружено не было. Надо полагать, наблюдаемые различия экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов в переднем и заднем отделах гипоталамуса могут быть связаны и с различиями в физиологической роли этих отделов.

Данные литературы о распределении TRP ионных каналов внутри гипоталамуса довольно ограничены. О TRPV4 в отделах гипоталамуса к настоящему моменту помимо наших данных свидетельствует только упомянутая выше работа Wechselberger et al. (2006). Эти авторы констатировали, что в преоптической зоне гипоталамуса у крыс Sprague-Dawley иммуногистохимические метки к TRPV4 обнаружены только на проходящих через эту зону аксонах или их окончаниях. В районах же клеточных тел метка отсутствовала, из чего следует отсутствие синтеза белка данного ионного канала в этой области. Согласно нашим результатам ген *Trpv4* экспрессируется как в переднем, так и заднем отделах гипоталамуса.

Полученные нами данные о более высоком уровне матричной РНК *Trpv1* в заднем гипоталамусе по сравнению с передним согласуются с результатами Acs et al. (1996) и Roberts et al. (2004). Первые, используя радиоактивный агонист TRPV1 – резининферотоксин – обнаружили более высокое связывание метки в заднем отделе гипоталамуса крыс Sprague-Dawley по сравнению с передним. Вторые также методом ауторадиографии получили такую же закономерность распределения метки на мышах. В то же время у обезьян различий в связывании радиоактивного резининферотоксина между преоптической и медиально-базальной областями гипоталамуса обнаружено не было (Szabo et al., 2002). По результатам исследования локализации TRPV1 в гипоталамусе методом иммуногистохимии у крыс Sprague-Dawley Mezey et al. (2000) сообщают лишь о

слабой иммунореактивности его различных ядер.

О TRPA1 в гипоталамусе, помимо наших описанных выше результатов в настоящий момент известно только, что он присутствует в районе пресинаптических терминалей, идущих к нейросекреторным клеткам супраоптического ядра гипоталамуса (Yokoyama et al., 2011).

Что касается ионного канала TRPM8, то данных не только об его распределении внутри гипоталамуса, но и относительно его наличия в этом отделе мозга за исключением наших данных и появившейся позже работы Kong et al. (2014), в которой иммуногистохимически показано наличие TRPM8 в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса, в литературе нет.

В настоящем исследовании не было обнаружено различий в уровне матричной РНК ни межлинейных, ни между отделами гипоталамуса для термочувствительных ионных каналов TRPV2 и TRPV3. Распределению TRPV2 в гипоталамусе посвящены работы Wainwright et al. (2004) и Nedungadi et al. (2012). Согласно Wainwright et al. (2004), локализация материала, иммунореактивного к TRPV2, в гипоталамусе макака строго ограничена паравентрикулярным, супрахиазматическим и супраоптическим ядрами. Высокую иммунореактивность к TRPV2 в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах отмечает также и Nedungadi с соавторами (2012), в то же время, констатируя отсутствие иммунореактивности к TRPV2 в супрахиазматическом ядре и задней части гипоталамуса у крыс Sprague-Dawley. О распределении TRPV3 в гипоталамусе кроме нашей работы, работ нами не обнаружено.

Необходимо отметить, что экспрессия гена *Trpv2* в обоих отделах гипоталамуса у крыс обеих линий оказалась наиболее высокой, как это было описано выше и для целого гипоталамуса. И уровень матричной РНК гена *Trpv2* сопоставим с уровнем экспрессии генов «домашнего хозяйства». Высказанное ранее предположение о важности этого ионного канала для процессов жизнедеятельности клеток головного мозга и всего организма в целом возможно и объясняет отсутствие различий в уровне матричной РНК этого гена, как между отделами гипоталамуса, так и между линиями животных.

Присутствие термочувствительных TRP ионных каналов как в переднем, так и в заднем отделах гипоталамуса функционально оправдано, поскольку и в том, и в другом его отделах имеются термочувствительные нейроны. Однако к настоящему моменту дать однозначный ответ на вопрос, какова роль того или иного TRP канала превалирует в том или ином отделе гипоталамуса, пока не представляется возможным.

Известно, что термочувствительный ионный канал TRPM8 экспрессируется в сенсорных нервных окончаниях кожи (Abe et al., 2005; Dhaka et al., 2008) и многие исследователи (Dhaka et al., 2007; Colburn et al., 2007; Bautista et al., 2007) в экспериментах на TRPM8-дефицитных мышах показали, что данный ионный канал необходим для ощущений холода. В данной работе, мы исследовали влияние активации периферического ионного канала TRPM8 холодом и его агонистом – ментолом, на экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в центре терморегуляции – гипоталамусе у нормотензивных и гипертензивных крыс.

Полученные результаты свидетельствует о том, что у гипертензивных животных активация периферического ионного канала TRPM8 как температурная, так и агонистом ментолом приводит к увеличению в два раза уровня мРНК *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса. Напомним, что в плане регулирования температуры, передний отдел гипоталамуса является в основном термодетектором (Хензель, 1960; Дымникова, 1979; Гурин, 1980; 1989; Иванов, 1984). Складывается впечатление, что ионный канал TRPM8 гипоталамуса важен для передачи температурной информации и регуляции физиологических реакций на охлаждение. Изменение экспрессии *Trpm8* обнаружено у гипертензивных животных. Как упоминалось ранее, Хе с соавторами (He et al., 2013) была показана связь области гена *TRPM8* с регуляцией кровяного давления у людей, обнаруженная для изменения кровяного давления в ответ на холодной прессорный тест. Обнаруженное нами изменение экспрессии *Trpm8* в ответ на охлаждение также может являться подтверждением, высказанного выше предположения о вовлеченности этого гена в процессы, связанные с

гипертензивным состоянием животных.

Еще одним подтверждением этого предположения является способность TRPM8 оказывать влияние на жировой обмен. Известно, что пациенты с артериальной гипертензией показывают характерное изменение в соотношении липидов плазмы крови (Berliner, 1995; Klimov, Nikulcheva, 1995; Steinberg, 1988). Эти изменения связаны с высоким риском развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. У крыс гипертензивной линии НИСАГ были обнаружены соотношения липопротеидов крови, сходные с таковыми для людей-гипертоников: снижен уровень липопротеидов высокой плотности и повышен коэффициент атерогенности (Kozyreva et al., 2004). Холодовое воздействие повышало уровень липопротеидов высокой плотности и снижало коэффициент атерогенности до уровня, характерного для нормотензивных животных (Kozyreva et al., 2004). В других терминах можно было бы сказать, что активация холодовых рецепторов, в том числе и повышение активности холодочувствительного ионного канала TRPM8, нормализует некоторые показатели жирового обмена, характерные для гипертоников. Обнаруженные в настоящей работе пониженный уровень мРНК гена *Trpm8* в гипоталамусе у крыс гипертензивной линии, относительно нормотензивной, и увеличение его экспрессии в ответ на охлаждение, дает основание полагать, что измененный липидный обмен у этих животных, может быть связан с изменениями в работе ионного канала TRPM8. По-видимому, в центральных механизмах нормализации жирового обмена у гипертоников при действии холода могут быть задействованы процессы, связанные с нормализацией экспрессии *Trpm8* в гипоталамусе.

Нами также обнаружено, что быстрое глубокое охлаждение на фоне аппликации ментола возвращает уровень мРНК *Trpm8*, увеличившийся в результате аппликации ментола, к исходному значению. Для объяснения возможных механизмов такого влияния быстрого охлаждения на экспрессию гена *Trpm8* необходимы дальнейшие исследования.

У нормотензивных животных, активация холодом и ментолом периферического ионного канала TRPM8 также приводила к изменениям на

уровне экспрессии генов. Эти изменения касались заднего отдела гипоталамуса и ионного канала TRPV3.

В другой серии экспериментов у нормотензивных крыс активация периферического ионного канала TRPM8 холодом приводила к увеличению уровня мРНК *Trpm8* и не влияла на экспрессию гена *Trpv3*. Особенностью эксперимента было то, что после стандартной процедуры охлаждения животное 1,5 часа находилось на теплом термостатируемом столике с поддерживаемой температурой 38°C., за это время глубокая температура животного восстанавливалась до исходного уровня. Необходимо отметить, что в конкретном эксперименте исследовался весь (целый) гипоталамус. Обнаруженный нами факт свидетельствует о влиянии как самого охлаждения, так и времени воздействия, вовлекая при этом разные TRP ионные каналы.

Таким образом, изменение экспрессии *Trpm8* в центре терморегуляции – гипоталамусе в ответ на температурную (холодовое воздействие) активацию и активацию агонистом ментолом у гипертензивных крыс и температурную у нормотензивных, говорит о важной роли этого ионного канала не только в восприятии температурной информации на периферии, но и на уровне центральных структур. Сравнивая полученные результаты, можно прийти к заключению, что термочувствительные TRP ионные каналы гипоталамуса по-разному задействованы в механизмах терморегуляторной защиты как при действии холода на организм, так и в зависимости от нормо-или гипертензивного статуса животных.

В нашей работе мы также исследовали экспрессию генов термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке у нормотензивных и гипертензивных животных. Внимание к органу иммунной системы обусловлено несколькими причинами. Во-первых, в последнее время появилось большое количество работ, посвященных роли иммунной системы в развитии и прогрессировании гипертонической болезни (Harrison et al., 2011; Leibowitz, Schiffrin, 2011; Abboud et al., 2012; Schiffrin, 2013; Mian et al., 2014; Trott, Harrison, 2014). Во-вторых, было показано (Kozyreva et al., 2011), что у гипертензивных

животных, относительно нормотензивных, наблюдается изменение показателей иммунного ответа. И, в-третьих, существуют данные, что TRP ионные каналы обнаружены на иммунных клетках (Perraud et al., 2004; Spinsanti et al., 2008) и ряд авторов (Heiner et al., 2003; Nagasawa et al., 2007; Santoni et al., 2013) предполагают, что эти ионные каналы могут выполнять важную роль в иммунной системе.

Данные о представительстве термочувствительных TRP ионных каналов в селезенке далеко не полны и противоречивы. Согласно литературным данным, в селезенке крыс экспрессируются гены термочувствительных TRP каналов – TRPV1 (Sanchez et al., 2001), TRPV2 (Caterina et al., 1999; Kanzaki et al., 1999; Kowase et al., 2002). Kunert-Keil с соавторами (2006) методом Real-time PCR исследовали экспрессию генов TRP ионных каналов, в том числе и термочувствительных, в разнообразных тканях мыши. В селезенке авторы обнаружили экспрессию *Trpa1*, *Trpm8*, *Trpv2*, *Trpv3*, *Trpv4* и не обнаружили экспрессию *Trpv1*. Другим авторам (Nagata et al., 2005), используя метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), не удалось обнаружить TRPA1 в селезенке мышей. Наши исследования показали, что в органе иммунной системы – селезенке в разной степени экспрессируются гены всех 6 наиболее признанных на сегодняшний день термочувствительных TRP ионных каналов – TRPA1, TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4.

Обращает на себя внимание высокая экспрессия гена *Trpv2* в селезенке. Как у нормотензивных, так и гипертензивных животных, уровень мРНК *Trpv2* в сотни раз превышает этот показатель для других исследованных генов термочувствительных TRP ионных каналов. Межлинейных различий обнаружено не было. Согласно литературным данным, TRPV2 экспрессируется в иммунных клетках человека и животных (Kowase et al., 2002; Kim et al., 2003; Yamashiro et al., 2010; Kajiya et al., 2010;), а также играет важную роль в контроле врожденных иммунных реакций (Santoni et al., 2013). Основными функциями, опосредованными TRPV2 иммунных клеток, являются: миграция нейтрофилов (Heiner et al., 2003), макрофагов (Nagasawa et al., 2007), фагоцитоз (Link et al.

2010), дифференциация моноцитов и макрофагов (Kajiya et al. 2010), роль Т-клеточного рецептора (Sauer, Jegla, 2006). Поэтому представляется вполне логичным, обнаруженный нами высокий уровень мРНК *Trpv2*. Напомним, что в исследованных структурах мозга также наблюдается высокий уровень мРНК *Trpv2*, сопоставимый, а иногда и превышающий этот показатель для «гена домашнего хозяйства».

Таким образом, анализ литературных данных, обнаруженный нами высокий уровень мРНК гена ионного канала TRPV2 в структурах мозга и органе иммунной системы – селезенке, а также отсутствие межлинейных различий по этому показателю подтверждают, высказанное выше предположение о важности *Trpv2* для процессов жизнедеятельности клеток, как головного мозга, так и периферических органов.

Для селезенки были показаны различия в экспрессии генов холодочувствительных TRP ионных каналов у гипертензивных и нормотензивных животных. У гипертензивных крыс не зарегистрирована экспрессия гена *Trpm8*, что может свидетельствовать об отсутствии или очень низком уровне данного ионного канала у этих животных, а также сниженный, относительно нормотензивных крыс, уровень мРНК *Trpa1*. Известно, что у гипертензивных животных наблюдаются изменения показателей иммунного ответа при температурных воздействиях на организм (Kozyreva et al., 2011). Обнаруженный нами факт снижения экспрессии гена ионного канала TRPA1 и отсутствие TRPM8 в селезенке гипертензивных животных дает основание полагать, что именно эти ионные каналы могут быть ответственны за измененный иммунный ответ у этих животных.

В нашем исследовании показано снижение экспрессии гена ионного канала TRPM8 как в мозге, так и периферическом висцеральном органе селезенке у гипертензивных животных, что дает возможность предполагать снижение активности гена этого ионного канала. Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать вовлеченность гена ионного канала TRPM8 в процессы, связанные с изменением физиологических реакций при артериальной

гипертензии.

В настоящей работе мы также исследовали влияние активации в области кожных терминалей термочувствительного ионного канала TRPM8 его агонистом – ментолом, на терморегуляторные показатели в термонеutralных условиях и при действии холода на организм. Ионный канал TRPM8 многие авторы (Bautista et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Pertusa et al., 2012) рассматривают в качестве основного посредника между воздействием холода и возникновением терморегуляторных реакций. Известно, что активация термочувствительного ионного канала TRPM8 кожи его агонистом – ментолом, вызывает ощущение холода у человека (Yosipovitch et al., 1996; Green, Schoen, 2007; Козырева, Ткаченко, 2008). В работе Tajino et al. (2007) было показано, что аппликация 10% спиртового раствора ментола в термонеutralных условиях у мышей приводила к повышению метаболизма и вазоконстрикторной реакции, другими словами, аппликация ментола активировала вегетативные реакции, способствующие сохранению тепла, что в термонеutralных условиях приводило к гипертермии. Зарегистрированные авторами (Tajino et al., 2007) реакции развивались спустя 30-100 минут после аппликации. Исследования нашей лаборатории показали, что предварительное введение ментола в кожу в области приложения холодого стимула приводит к изменениям терморегуляторных реакций при последующем охлаждении (Kozyreva et al., 2010).

Нами был поставлен вопрос о возможных особенностях физиологической реакции гипертензивных животных на стимуляцию ионного канала TRPM8 холодом и ментолом.

В ответ на медленное глубокое охлаждение, в нашем исследовании, как и в работах Козырева, Верховгляд (1997), Kozyreva et al. (2010), терморегуляторный ответ начинался с инициации сосудистой реакции, направленной на ограничение теплоотдачи с поверхности кожи, затем развивалась метаболическая реакция. Порядок инициации терморегуляторных реакций при медленном глубоком охлаждении был одинаков в контрольной группе животных и после аппликации ментола как у нормотензивных, так и гипертензивных животных.

У нормотензивных животных аппликация ментола, не изменяя структуру терморегуляторного ответа, уменьшала латентные периоды сосудистой и метаболической реакций в ответ на медленное глубокое охлаждение.

Также было показано, что у нормотензивных животных при медленном глубоком охлаждении после аппликации ментола возникновение большинства терморегуляторных реакций происходит при меньшем падении температуры кожи живота и ректальной температуры, что согласуется с результатами, полученными Козыревой с соавторами (Kozyreva et al., 2010). Изменения терморегуляторных показателей при активации термочувствительного ионного канала TRPM8 могут свидетельствовать о вкладе этого канала в регуляцию термозащитных реакций организма при охлаждении. Наши эксперименты показали, что у гипертензивных животных активация TRPM8 ментолом не приводила к существенным изменениям физиологических показателей.

Таким образом, полученные результаты подтверждают высказанное предположение о том, что нормотензивные и гипертензивные животные имеют разную температурную чувствительность, что проявляется как в изменении физиологических реакций, направленных на поддержание температурного гомеостаза, так и в уровне экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов. Обнаруженная у гипертензивных животных сниженная чувствительность терморегуляторных реакций к стимуляции ионного канала TRPM8 вполне согласуется со сниженной у них экспрессией гена этого ионного канала. В результате проведенного исследования были получены новые данные о функционировании термочувствительных TRP ионных каналов, позволяющие приблизиться к пониманию их физиологического значения, а также степени вовлеченности в регуляцию термозащитных реакций организма в норме и при артериальной гипертензии. В работе на примере TRP ионных каналов также четко показана вовлеченность геномного уровня регуляции в формирование ответа организма на внешнее холодное воздействие. Эта вовлеченность различна в зависимости от длительности и скорости охлаждения.

ВЫВОДЫ

1. Во всех исследованных структурах мозга (гипоталамус, фронтальная кора, средний мозг, гиппокамп) имеет место выраженная экспрессия большинства генов теплочувствительных TRP ионных каналов и относительно невысокая экспрессия генов холодочувствительных ионных каналов. В гипоталамусе, выполняющем функцию центра терморегуляции, по сравнению с другими исследованными структурами, наблюдается повышенный уровень экспрессии генов большинства термочувствительных TRP каналов.

2. В функционально различных отделах гипоталамуса экспрессируются гены всех исследованных термочувствительных TRP ионных каналов, однако экспрессия генов этих каналов различна. Так экспрессия гена *Trpm8* в переднем гипоталамусе, выше, чем в заднем, а экспрессия генов *Trpa1* и *Trpv1* в заднем отделе выше, чем в переднем.

3. Показана вовлеченность геномного уровня регуляции в поддержание температурного гомеостаза при температурных воздействиях как длительных, так и острых. Длительная адаптация организма к холоду приводит к специфичным для гипоталамуса изменениям – снижению экспрессии гена ионного канала TRPV3. Под влиянием острого охлаждения наблюдалось повышение экспрессии гена ионного канала TRPV3.

4. Наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия у крыс линии НИСАГ сопровождается изменениями экспрессии генов термочувствительных TRP ионных каналов как в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, так и в периферическом висцеральном органе – селезенке. Так, экспрессия гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 снижена в переднем термодетекторном отделе гипоталамуса, а экспрессия гена теплочувствительного ионного канала TRPV4 повышена в заднем отделе гипоталамуса. В селезенке наблюдается значительное снижение экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1.

5. Показано функциональное взаимодействие TRP ионных каналов периферической и центральной нервной системы на уровне экспрессии генов. Активация периферического ионного канала TRPM8 его агонистом ментолом и острое охлаждение приводят к повышению экспрессии гена ионного канала TRPV3 в заднем гипоталамусе у нормотензивных животных и к значительному увеличению экспрессии гена *Trpm8* в переднем отделе гипоталамуса у гипертензивных животных.

6. Наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия сопровождается функциональными изменениями реакции организма на холод. Активация ионного канала TRPM8 агонистом ментолом не вызывает у гипертензивных животных уменьшение температурных порогов терморегуляторных реакций при охлаждении, наблюдаемое у нормотензивных животных. Это изменение физиологической реакции на холод согласуется со снижением экспрессии гена холодочувствительного ионного канала TRPM8 в гипоталамусе у гипертензивных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцын, А.П. Стадии адаптации легких человека в условиях Крайнего Севера / А.П. Авцын, А.П. Милованов // Физиология человека. – 1982. – Т. 8. – С. 389–398.
2. Антонов, А.Р. Гемолимфатические особенности обмена микроэлементов у крыс с наследственной артериальной гипертензией / А.Р. Антонов, Е.А. Васькина, А.В. Головатюк, А.В. Ефремов, И.Л. Тихонова, М.Г. Якобсон, Г.С. Якобсон // Бюллетень СО РАМН. – 1998. – № 1. – С. 126–129.
3. Антонов, Е.В. Изучение секреторной активности коры надпочечника у гипертензивных крыс линии НИСАГ / Е.В. Антонов, Т.А. Морева, О.П. Черкасова, М.А. Гишинский, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30. – № 4. – С. 68–75.
4. Балакирева, Л.А. Характеристика сосудистой реактивности гипертензивных крыс линии НИСАГ / Л.А. Балакирева, Н.А. Маханова, М.Н. Носова, Г.М. Дымшиц, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон Характеристика сосудистой реактивности гипертензивных крыс линии НИСАГ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – Т. 126. – № 8. – С. 136–138.
5. Баркрофт, Дж. Основные черты архитектуры физиологических функций / Дж. Баркрофт. – Л.: Биомедгиз, 1937. – 318 с.
6. Бартон, А. Человек в условиях холода / А. Бартон, О. Эдхолм. – М.: Наука, 1957. – 271 с.
7. Белявский, Е.М. К анализу температурной чувствительности переднего гипоталамуса / Е.М. Белявский // Температурная рецепция / Материалы Всесоюзного симпозиума. – Петрозаводск, 1969. – С. 61–62.
8. Бисерова, А.Г. Об изменениях холодовой дрожи при повторных охлаждениях организма / А.Г. Бисерова, М. Гебчинский // Теплообразование в организме. – Киев, 1964. – С. 38–39.
9. Бузуева, И.И. Структурные особенности коры надпочечника крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией в раннем

периоде постнатального онтогенеза / И.И. Бузуева, М.Д. Шмерлинг, Е.Е. Филюшина, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Морфология. – 1998. – № 2. – С. 84–88.

10. Бузуева, И.И. Структурная характеристика коры надпочечника крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией в позднем периоде постнатального онтогенеза / И.И. Бузуева, М.Д. Шмерлинг, Е.Е. Филюшина, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Морфология. – 2000. – № 6. – С. 61–65.

11. Бузуева, И.И. Возрастные особенности структурной организации мозгового вещества надпочечника у крыс гипертензивной линии НИСАГ / И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142. – № 12. – С. 604–606.

12. Вейнберг, И.С. Роль нервной системы в терморегуляции / И.С. Вейнберг. – Л., 1940. – 230 с.

13. Веселкин, П.Н. Лихорадка / П.Н. Веселкин. – М.: Медгиз, 1963. – 412 с.

14. Воронова, И.П. Экспрессия генов термочувствительных TRP-каналов в гипоталамусе крыс в норме и при адаптации к холоду / И.П. Воронова, А.А. Тужикова, Т.В. Козырева // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2012. – №9. – С. 1101–1110.

15. Вязовская, О.В. Структурно-функциональные особенности холодových рецепторов / О.В. Вязовская, В.К. Мазалов, А.М. Компаниец // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19. – № 4. – С. 461–472.

16. Глебова, И.Ф. Влияние периферической терморцепции на электрическую активность гипоталамуса / И.Ф. Глебова, Л.И. Данилова // Физиологический журнал СССР. – 1970. – Т. 56. – №10. – С. 1433–1438.

17. Гурин, В.Н. Центральные механизмы терморегуляции / В.Н. Гурин. – Минск: Беларусь, 1980. – 127 с.

18. Гурин, В.Н. Терморегуляция и симпатическая нервная система / В.Н. Гурин. – Минск: Наука и техника, 1989. – 231 с.

19. Диверт, В.Э. Температура гипоталамуса у крыс до и после адаптации к холоду в условиях свободного поведения / В.Э. Диверт // Физиологический

журнал СССР. – 1979. – Т. 65. – №11. – С. 1631–1635.

20. Дымникова, Л.П. О термочувствительных нейронах заднего гипоталамуса и их роли в терморегуляции / Л.П. Дымникова // Физиологический журнал СССР. – 1979. – Т. 65. – № 11. – С. 1592–1597.

21. Ефремов, А.В. Особенности электролитного обмена и эндокринных показателей в плазме крови и лимфе крыс с наследственной артериальной гипертензией/ А.В. Ефремов, А.Р. Антонов, В.В. Летягина, А.Л. Маркель, Ю.В. Начаров // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1997. – Т. 124. – № 7. – С. 36–38

22. Иванов, К.П. О температурном эффекте мышечного сокращения после адаптации к холоду / К.П. Иванов, Е.Я. Ткаченко, М.А. Якименко // Физиологический журнал СССР. – 1970. – Т. 56. – С. 1438–1443.

23. Иванов, К.П. О механизмах калоригенного действия норадреналина на скелетную мускулатуру / К.П. Иванов, Е.Я. Ткаченко, М.А. Якименко, А.М. Туманова // Физиологический журнал СССР. – 1973. – Т. 59. – С. 1883–1888.

24. Иванов, К.П. Основные принципы регуляции температурного гомеостаза / К.П. Иванов // Физиология терморегуляции. – Л.: Наука, 1984. – С. 113–138.

25. Иванов, К.П. Общая энергетика, теплообмен и терморегуляция / К.П. Иванов. – Л.: Наука, 1990. – 307 с.

26. Козырева, Т.В. Влияние локального изменения температуры мозга на активность нейронов сенсомоторной коры кроликов / Т.В. Козырева // Физиологический журнал СССР. – 1972. – Т. 58. – С. 1663–1668.

27. Козырева, Т.В. О специфических особенностях нейронов коры мозга, реагирующих на термостимуляцию кожи / Т.В. Козырева, К.П. Иванов // Физиологический журнал СССР. – 1975. – Т. 61. – С. 1612–1618.

28. Козырева, Т.В. К вопросу о температурной чувствительности человека к холоду / Т.В. Козырева, М.А. Якименко // Физиологический журнал СССР. – 1978. – Т. 64. – № 2. – С. 220–225.

29. Козырева, Т.В. Влияние адаптации к холоду на импульсную активность кожных терморцепторов / Т.В. Козырева, М.А. Якименко // Физиологический

журнал СССР. – 1979. – Т. 65. – № 11. – С. 1598–1602.

30. Козырева, Т.В. Статическая и динамическая активность холодовых рецепторов кожи при инфузии норадреналина / Т.В. Козырева // Нейрофизиология. – 1990. – Т. 22. – №1. – С. 69–75.

31. Козырева, Т.В. Функциональное значение динамической активности холодовых рецепторов кожи / Т.В. Козырева, Л.А. Верхогляд // Физиологический журнал СССР. – 1989. – Т. 75. – № 1. – С. 117–122.

32. Козырева, Т.В. Терморцепция при адаптации организма к холоду: Дис. Док. биол. наук / Козырева Тамара Владимировна. – Новосибирск. – 1991. – 305 с.

33. Козырева, Т.В. Модуляция функциональных свойств терморцепторов кожи / Т.В. Козырева // Нейрофизиология. – 1992. – Т. 24. – № 5. – С. 542–551.

34. Козырева, Т.В. Влияние адаптации к холоду и норадреналина на температурную чувствительность нейронов гипоталамуса у крыс / Т.В. Козырева, Ф.К. Пирау // Нейрофизиология. – 1994. – № 3. – С. 172–176.

35. Козырева, Т.В. Зависимость температурной чувствительности холодовых рецепторов кожи от их частотных характеристик у контрольных и адаптированных к холоду крыс / Т.В. Козырева // Бюллетень СО РАМН. – 1994. – № 2. – С. 53–57

36. Козырева, Т.В. Адаптация к холоду и структура терморегуляторного ответа при медленном и быстром охлаждении / Т.В. Козырева, Л.А. Верхогляд // Российский физиологический журнал. – 1997. – Т. 83. – № 11. – С. 135–142.

37. Козырева, Т.В. Особенности реакции симпато-адреналовой системы крыс при разных типах охлаждения / Т.В. Козырева, Е.Я. Ткаченко, В.П. Козарук, Т.В. Латышева, М.А. Гишинский // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1999. – Т. 85. – № 11. – С. 1434–1439.

38. Козырева, Т.В. Активность центральных и периферических терморцепторов при длительной адаптации к холоду и действию норадреналина (сравнительный анализ) / Т.В. Козырева // Организм и среда / под ред. Труфакина В.А., Шошенко К.А. – Новосибирск: СО РАМН. – 2003. – С. 81–97.

39. Козырева, Т.В. Влияние ментола на температурную чувствительность

человека / Т.В.Козырева, Е.Я. Ткаченко // Физиология человека. – 2008. – Т. 34. – № 2. – С. 99–103.

40. Колесников, С.С. Термочувствительные ионные каналы / С.С. Колесников, М.Ф. Быстрова // Биологические мембраны. – 2006. – Т.23. –№ 2. – С. 119–128.

41. Коровин, К.Ф. Функциональное состояние симпатoadреналовой системы при кратковременном и длительном воздушном охлаждении ненаркотизированных крыс / К.Ф. Коровин // Нейро-гуморальные механизмы реакции организма на охлаждение. – Л., 1973. – № 121. – 79 с.

42. Коростышевская, И.М. Особенности строения миокарда у крыс с наследственной гипертензией, вскормленных нормотензивными самками / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов, А.Л. Маркель, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Т. 132. – №9. – С. 330–332.

43. Ломакина, С.В. Формирование терморегуляторных реакций при охлаждении у крыс с наследственной артериальной гипертензией / С.В. Ломакина, Е.Я. Ткаченко, Т.В. Козырева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. –Т.134. – № 11. – С. 504–507.

44. Лопина, О.Д. Na, К-АТФ-аза почек крыс с наследственной гипертензией, индуцируемой стрессом / О.Д. Лопина, А.А. Котлобай, А.В. Камерницкий, Н.С. Павлова-Гришина, А.Л. Маркель, А.А. Болдырев // Укр. биохим. журнал. – 1991. – Т. 63. – №3. – С. 45–52.

45. Майстрах, Е.В. Об изменениях в глубоких структурах головного мозга при поддержании температурного гомеостаза в процессе охлаждения ненаркотизированных животных / Е.В. Майстрах // Центральные механизмы адаптации. Материалы симпозиума. – Новосибирск, 1970. – С. 38–40.

46. Майстрах, Е.В. О роли специфических и неспецифических структур мозгового ствола в реакциях организма на общее внешнее охлаждение и терморегуляция в организме в норме и при патологических состояниях / Е.В. Майстрах // Теплообразование и терморегуляция в организме в норме и при патологических состояниях. – Киев, 1971. – С. 88–89.

47. Максимов, В.Ф. Метаболическое повреждение миокарда у нормотензивных и гипертензивных крыс (морфометрический анализ). / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, А.Л. Маркель, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг, Г.С. Якобсон // Морфология. – 1999. – Т.115. – №1. – С.19–23.

48. Маркель, А.Л. Адреналиновые повреждения миокарда у крыс с наследственно обусловленной артериальной гипертензией / А.Л. Маркель, Н.К. Ерисковская, С.И. Еремеев, Л.А. Семенова, Ю.Г. Целлариус // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1985. – Т.99. – №3. – С. 356–358.

49. Маркель, А.Л. Роль катехоламинов в развитии спонтанной артериальной гипертензии у крыс линии SHR (spontaneously hypertensive rats) / А.Л. Маркель // Успехи физиологических наук. – 1983. – Т.14. – №1. –С.67–84.

50. Маркель, А.Л. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии / А.Л. Маркель // Известия АН СССР. – 1985. – № 3. – С. 466–469.

51. Маркель, А.Л. Особенности поведения крыс с наследственно обусловленной артериальной гипертензией / А.Л. Маркель // Журнал высшей нервной деятельности. – 1986. – Т.36. – №5. – С.956–962.

52. Маркель, А.Л. Генетическая корреляция реакции артериального давления при эмоциональном стрессе с концентрацией альфа 1-адренорецепторов в отделах мозга / А.Л. Маркель, Г.Т. Шишкина // Генетика. – 1992. – Т. 28. – №11. – С. 130–134.

53. Маркель, А.Л. Гены, стресс, гипертензия / А.Л. Маркель, Г.М. Дымшиц, М.Д. Шмерлинг, Г.С. Якобсон // Бюллетень СО РАМН. – 2002. – Т. 104. – №2. – С. 35–40.

54. Маркель, А.Л. Характеристика функциональной активности симпатoadреналовой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ / А.Л. Маркель, Е.В. Калашникова, С.В. Горякин, Д.Г. Сахаров, Т.А. Морева, Г.М. Дымшиц, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141. – № 3. – С. 244–247.

55. Маханова, Н.А. Онтогенетическая динамика артериального давления и

характеристик ЭКГ у крыс линии НИСАГ с наследственной артериальной гипертензией / Н.А. Маханова, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон и др. // Бюллетень СО РАМН. – 1997. – № 1. – С. 102–105

56. Минут-Сорохтина, О.П. Физиология терморцепции / О.П. Минут-Сорохтина. – М.: Медицина, 1972. – 228 с.

57. Минут-Сорохтина, О.П. Нейрофизиология термической рецепции / О.П. Минут-Сорохтина // Сенсорные системы. Нейрофизиологические и биофизические исследования. – Л.: Наука, 1987. – С. 82–101.

58. Муслихов, Э.Р. Изменение характера кальциевого обмена и экспрессии кальциевых каналов ретикулума и плазматической мембраны в процессе дифференцировки скелетных миобластов и миотубулы / Э.Р. Муслихов, К.В. Сурков, И.Ф. Суханова, П.В. Авдонин // XXI съезд физиологического общества им. И.П.Павлова. Тезисы докладов. М. – Калуга, 2010 – 425 с.

59. Науменко, В.С. Количественное определение экспрессии гена 5-НТ₁A сератонинового рецептора в головном мозге / В.С. Науменко, А.В. Куликов // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – № 1. – С. 37–44.

60. Панин, Л.Е. Энергетические аспекты адаптации / Л.Е. Панин. – Л., 1978. – 192 с.

61. Пастухов, Ю.Ф. Адренергический контроль термогенеза при экспериментальной и природной адаптации животных к холоду / Ю.Ф. Пастухов, В.В. Хаскин // Успехи физиологических наук. – 1979. – Т. 10. – С. 121–142.

62. Постнов, Ю.В. Спонтанная гипертензия у крыс как модель эссенциальной гипертензии (гипертонической болезни человека) / Ю.В. Постнов // Архив патологии. – 1972. – Т. 36. – № 12. – С. 10–18.

63. Постнов, Ю.В. Нарушение распределение кальция в жировой ткани при гипертонической болезни (эссенциальной гипертензии) / Ю.В. Постнов, С.Н. Орлов, Н.И. Покудин // Кардиология. – 1980. – №8. – С. 104–109.

64. Проссер, К.Л. Сравнительная физиология животных / К.Л. Проссер. – М.: Мир, 1977. – 609 с.

65. Ройтбак, А.И. Электрические реакции локально охлажденного участка

коры / А.И. Ройтбак, Г.Л. Беказ // Проблемы современной неврологии. – Тбилиси, 1967. – С. 338–344.

66. Симонова, Т.Г. Изменения в теплообмене у человека при адаптации к холоду / Т.Г. Симонова, П.В. Лазаренко, О.А. Филько // Тезисы докладов IV Международного симпозиума по приполярной медицине. – Новосибирск: СФ АМН СССР, 1978. – С. 206–206.

67. Симонова, Т.Г. Адаптивные сдвиги в системе дыхания у человека в условиях холода. Дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1980. – 147 с.

68. Скулачев, В.П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи / В.П. Скулачев. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. – 156 с.

69. Скулачев, В.П. Аккумуляция энергии в клетке / В.П. Скулачев. – М. – 1969. – 440 с.

70. Слепчук, Н.А. О теплосодержании организма как основном параметре терморегуляции / Н.А. Слепчук, Г.В. Румянцев // Физиологический журнал СССР. – 1976. – Т. 62. – С. 121–127.

71. Слоним, А.Д. Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих / А.Д. Слоним. – Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – 327 с.

72. Слоним, А.Д. Проблемы физиологической адаптации и поведения в эколого-физиологических исследованиях / А.Д. Слоним // Физиологический журнал СССР. – 1969. – Т. 55. – С. 27–40.

73. Слоним, А.Д. Учение о физиологических адаптациях / А.Д. Слоним // Экологическая физиология животных. – Л.: Наука, 1979. – Ч.1. – С. 79–115.

74. Слоним, А.Д. Эволюция терморегуляции / А.Д. Слоним. – Л.: Наука, 1986. – 74 с.

75. Соболев, В.И. О физиологических механизмах теплообразования при адаптации к холоду / В.И. Соболев // Физиологический журнал СССР. – 1974. – Т. 60. – С. 1267–1271.

76. Стабровский, Е.М. Влияние воздушного охлаждения на функцию симпатoadренальной системы у крыс / Е.М. Стабровский, К.Ф. Коровин // Физиологический журнал СССР. – 1971. – Т. 57. – С. 539–545.

77. Стабровский, Е.М. Катехоламины в тканях крыс и их обмен при охлаждении / Е.М. Стабровский, К.Ф. Коровин // Физиологический журнал СССР. – 1972. – Т. 2. – С. 414–420.

78. Ткаченко, Е.Я. Зависимость формирования терморегуляторных реакций на охлаждение от типа активности кожных терморецепторов / Е.Я. Ткаченко, В.П. Козарук, Г.М. Храмова, И.П. Воронова, Е.С. Мейта, Т.В. Козырева // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30. – № 4. – С. 95–100

79. Ткаченко, Е.Я. Механизмы модулирующего влияния симпатической нервной системы на терморегуляторные реакции при охлаждении у гипертензивных крыс / Е.Я. Ткаченко, Т.В. Козырева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149. – № 1. – С. 25–29

80. Ткаченко, Е.Я. О физиологических механизмах химической терморегуляции после адаптации к холоду / Е.Я. Ткаченко, К.П. Иванов // Физиологический журнал СССР. – 1971. – Т. 57. – С. 111–115.

81. Глеулин, С.Ж. Изменение рефлекторной активности спинного мозга при периферической термостимуляции / С.Ж. Глеулин, И.Я. Клейнбок, В.И. Цицурин // Нейрофизиология. – 1973. – Т. 5. – № 2. – С. 181–185.

82. Глеулин, С.Ж. Спинномозговые механизмы температурной чувствительности кожи / С.Ж. Глеулин. – Алма-Ата: Наука, 1984. – 204 с.

83. Триумфов, А.В. Топическая диагностика заболеваний нервной системы: Краткое руководство / А.В. Триумфов. – Л.: Медицина, 1974. – 247 с.

84. Усачева, А.М. Влияние выключения медиальной преоптической области на чувствительность переднего гипоталамуса и локальному тепловому воздействию / А.М. Усачева // Теплообразование и терморегуляция организма в норме и при патологических состояниях. – Киев, 1971. – С. 195 – 197.

85. Усачева, А.М. Влияние двустороннего разрушения медиальной преоптической области на терморегуляторные реакции кролика / А.М. Усачева, Л.П. Дымникова // Теплообразование и терморегуляция организма в норме и при патологических состояниях. – Киев, 1971. – С. 194–195.

86. Федосеева, Л.А. Экспрессия генов рениновой системы почки и сердца у

гипертензивных крыс линии НИСАГ / Л.А. Федосеева, М.А. Рязанова, Е.В. Антонов, Г.М. Дымшиц, А.Л. Маркель // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 410–419.

87. Хаскин, В.В. Энергетика теплообразования и адаптации к холоду / В.В. Хаскин. – Новосибирск, 1975. – 200 с.

88. Хворостова, Ю.В. Экспрессия гена проопиомеланокортина в гипофизе гипертензивных крыс линии НИСАГ / Ю.В. Хворостова, М.Л. Филипенко, Г.М. Дымшиц, А.Л. Маркель // Генетика. – 2001. – Т. 37. – С. 643–648.

89. Хворостова, Ю.В. Особенности экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора у гипертензивных крыс линии НИСАГ / Ю.В. Хворостова, Е.В. Калашникова, О.П. Черкасова, Л.А. Федосеева, О.Е. Редина, Г.М. Дымшиц, А.Л. Маркель // Российский физиологический журнал. – 2003. – Т. 89. – С. 1523–1527.

90. Хензель, Г. Процессы регулирования в биологии / Г. Хензель. – М., 1960. – С. 45–62.

91. Черниговский, В.Н. К характеристике современного этапа в развитии концепции о кортико-висцеральных взаимоотношениях / В.Н. Черниговский // Физиологический журнал СССР. – 1969. – Т. 55. – № 8. – С. 904–911.

92. Черниговский, В.Н. Интероцепция / В.Н. Черниговский. – Л.: Наука, 1985. – 413 с.

93. Шмерлинг, М.Д. Состояние миокарда у крыс новой гипертензивной линии / М.Д. Шмерлинг, А.Р. Антонов, И.М. Коростышевская, А.Л. Маркель, В.Ф. Максимов, Е.Е. Филюшина, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – Т. 122. – № 9. – С. 271–273.

94. Шорин, Ю.П. Эндокринно-метаболические отношения у крыс с генетически обусловленной артериальной гипертензией / Ю.П. Шорин, А.Л. Маркель, В.Г. Селятицкая и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1990. – Т. 109. – № 6. – С. 575–576.

95. Якименко, М.А. О повышении теплопродукции мышечных сокращений под влиянием норадреналина / М.А. Якименко, Е.Я. Ткаченко, К.П. Иванов, А.Д. Слоним // ДАН СССР. – 1971. – Т. 200. – С. 1007–1008.

96. Якименко, М.А. Установочная точка температурной регуляции и ее физиологическое значение / М.А. Якименко // Материалы XIII съезда Всес. физиол. общества им. И.П. Павлова. – Л.: Наука. – 1979. – С. 388–390.

97. Якименко, М.А. Мышечный термогенез при адаптации к холоду / М.А. Якименко // Экологическая физиология животных. – Л.: Наука. – 1982. – С. 80–83.

98. Якименко, М.А. Длительная адаптация организма человека и животных к холоду / М.А. Якименко, К.П. Иванов, О.П. Минут-Сорохтина, Е.В. Майстрах // Физиология терморегуляции. – Л.: Наука, 1984. – С. 223–236.

99. Якобсон, Г.С. Изменения функции сердца в ответ на введение адреналина у крыс с наследственно обусловленной артериальной гипертензией (ЭКГ-исследование) / Г.С. Якобсон, А.Р. Антонов, В.В. Летягина, Д.Г. Сахаров, А.Л. Маркель // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1995. – №10. – С. 3372–3375.

100. Abboud, F.M. Autonomic Neural Regulation of the Immune System: Implications for Hypertension and Cardiovascular Disease / F.M. Abboud, S.C. Harwani, M.W. Chapleau // Hypertension. – 2012. – Vol. 59– № 4 – P. 755–762.

101. Abe, J. TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae / J. Abe, H. Hosokawa, M. Okazawa, M. Kandachi, Y. Sawada // Brain Res Mol Brain Res. – 2005. – Vol. 136 – P. 91–98.

102. Acs, G. Specific binding of [3H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations / G. Acs, M. Palkovits, P.M. Blumberg // Life Sci. – 1996. – Vol. 59. – № 22. – P. 1899–1908.

103. Adapala, R.K. PKC α mediates acetylcholine-induced activation of TRPV4-dependent calcium influx in endothelial cells / R.K. Adapala, P.K. Talasila, I.N. Bratz, D.X. Zhang, M. Suzuki, J.G. Meszaros, C.K. Thodeti // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2011. – Vol. 301. – № 3. – P. 757–765.

104. Akins, K. What sensory signals are about / K. Akins // Journal of Philosophy. – 1996. – Vol. 93. – P. 337–372.

105. Amini-Sereshki, L. Brainstem control of shivering in the cat / L. Amini-

Sereshki // American Journal of Physiology. – 1977. – Vol. 232. – № 5. – P. 190–197.

106. Amstislavsky, S. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH) / S. Amstislavsky, P. Welker, J.H. Fruhauf, L. Maslova, L. Ivanova, B. Jensen, A.L. Markel, S. Bachmann // Histochem. Cell Biol. – 2005. – Vol. 8. – P. 1–9.

107. Andersson, U. ATP synthase subunit c expression: physiological regulation of the P1 and P2 genes / U. Andersson, J. Houstek, B. Cannon // Biochem J. – 1997. – Vol. 323. – P. 379–385.

108. Babes, A. Two population of coldsensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor / A. Babes, D. Zorzon, G. Reid // Eur. J. Neurosci. – 2004. – Vol. 20. – № 9. – P. 2276–2282.

109. Bagher, P. Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca^{2+} events, and IK_{Ca} channels, reducing arteriolar tone / P. Bagher, T. Beleznai, Y. Kansui, R. Mitchell, C.J. Garland, K.A. Dora // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – Vol. 109. – № 44. – P. 18174–18179.

110. Bai, V.U. Androgen regulated TRPM8 expression: A potential mRNA marker for metastatic prostate cancer detection in body fluids / V.U. Bai, S. Murthy, K. Chinnakannu, F. Muhletaler, S. Tejwani, E.R. Barrack, S.H. Kim, M. Menon, G.P. Veer Reddy // Int. J. Oncol. – 2010. – № 36. – P. 443–450.

111. Bandell, M. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin / M. Bandell, G.M. Story, S.W. Hwang, V. Viswanath, S.R. Eid, M.J. Petrus // Neuron. – 2004. – Vol. 41. – P. 849–857.

112. Bang, S. Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation / S. Bang, S. Yoo, T.J. Yang, H. Cho, S.W. Hwang // Br. J. Pharmacol. – 2012. – Vol.166. – P. 1433–1443.

113. Barney, C.C. Thermal dehydration-induced thirst in spontaneously hypertensive rats / C.C. Barney, G.L. Smith, M.M. Folkerts // American Journal of Physiology. – 1999. – Vol. 276. – P. 1302–1310.

114. Bashyam, H. Lewis Dahl and the genetics of salt-induced hypertension / H. Bashyam // J. Exp. Med. – 2007. – Vol. 204. – P. 1507.

115. Bautista, D.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1 / D.M. Bautista, P. Movahed, A. Hinman, H.E. Axelsson, O. Sterner, E.D. Hogestatt // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – Vol. 102. – P. 12248–12252.
116. Bautista, D.M. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents / D.M. Bautista, S.E. Jordt, T. Nikai, P.R. Tsuruda, A.J. Read, J. Poblete // *Cell*. – 2006. – Vol. 124. – P. 1269–1282.
117. Bautista, D.M. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold / D.M. Bautista, J. Siemens, J.M. Glazer, P.R. Tsuruda, A.I. Basbaum, C.L. Stucky, S.E. Jordt, D. Julius // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – P. 204–208.
118. Baylie, R.L. TRPV channels and vascular function / R.L. Baylie, J.E. Brayden // *Acta Physiol (Oxf)*. – 2011. – Vol. 203. – №1. – P. 99–116.
119. Behrend, H.J. Charakterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay / H.J. Behrend, T. Germann, C. Gillen, H. Hatt, R. Jostock // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 141. – P. 737–745.
120. Benfenati, V. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes / V. Benfenati, M. Amiry-Moghaddam, M. Caprini, M.N. Mylonakou, C. Rapisarda, O.P. Ottersen, S. Ferroni // *Neuroscience*. – 2007. – Vol. 148. – P. 876–892.
121. Bengtsson, T. Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes / T. Bengtsson, B. Cannon, J. Nedergaard // *Biochem J*. – 2000. – Vol. 347. – P. 643–651.
122. Benham, C.D. TRPV channels as temperature sensors / C.D. Benham, M.J. Gunthorpe, J.B. Davis // *Cell Calcium*. – 2003. – Vol. 33. – P. 479–487.
123. Benzinger, T.H. Heat regulation: homeostasis of central temperature in man / T.H. Benzinger // *Physiol. Rev.* – 1969. – Vol. 49. – № 3. – P. 671–759.
124. Berkey, D.L. Measurements of core temperature in spontaneously hypertensive rats by radiotelemetry / D.L. Berkey, K.W. Meeuwsen, C.C. Bamey // *AJP - Regul. Integ. Comp. Physiol.* – 1990. – Vol. 258. – № 3. – P. 743–749.
125. Berliner, J.A. Atherosclerosis: basic metabolism. Oxidation, inflammation and

genetics / J.A. Berliner // *Circulation*. – 1995. – Vol. 91. – P. 2488–2496.

126. Bligh, J. Neuronal models of mammalian temperature regulation / J. Bligh // *Essays on temperature regulation* / J. Bligh, R.E. Moore (eds.). – 1972. – P. 105–120.

127. Borbíró, I. Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth / I. Borbíró, E. Lisztes, B.I. Tóth, G. Czifra, A. Oláh, A.G. Szölloši, N. Szentandrassy, P.P. Nánási, Z. Péter, R. Paus, L. Kovács, T. Bíró // *J Invest Dermatol*. – 2011. – Vol. 131. – № 8. – P. 1605–1614.

128. Boulant, J.A. Temperature receptors in the central nervous system / J.A. Boulant, J.B. Dean // *Ann. Rev. Physiol.* – 1986. – Vol. 48. – P.639–654.

129. Boulant, J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature / J.A. Boulant // *Ann.N.Y.Acad.Sci.* – 1998. – Vol. 856 – P. 108–115.

130. Brauchi, S. Clues to understanding cold sensation: Thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPN8 / S. Brauchi, P. Orio, R. Latorre // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. – 1001. – P. 15494–15499.

131. Brayden, J.E. Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow / J.E. Brayden, S. Earley, M.T. Nelson, S. Reading // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2008. – Vol. 35. – №9. – P. 1116 – 1120.

132. Brook, R.D. «Environmental Hypertensionology» The Effects of Environmental Factors on Blood Pressure in Clinical Practice and Research / R.D. Brook, A.B. Weder, S. Rajagopalan // *The Journal of Clinical Hypertension*. – 2011. – Vol. 13. – P. 836–842.

133. Brück, K. Thermoregulatory noradrenergic and serotonergic pathways to hypothalamic units / K. Brück, P. Hinckel // *J. Physiol.* – 1980. – Vol. 304. – P. 193–202.

134. Brück, K. Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis / K. Brück, E. Zeisberger // *Pharmac. Ther.* – 1987. – Vol. 35. – P. 163–215.

135. Brück, K. Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis, Thermoregulation: Physiology and Biochemistry // K. Brück, E. Zeisberger // *New York. Pergamon Press*. – 1990. – P. 255–307.

136. Cabanac, M.J. Thermoregulation / M.J. Cabanac // *Ann. Rev. Physiol.* – 1975. – Vol. 376. – P. 415–439.

137. Campos, H.O. Temperature Control of Hypertensive Rats during Moderate Exercise in Warm Environment / H.O. Campos, L. Leite, L.R. Drummond, D.N.Q. Cunha, C.C. Coimbra, A.J. Natali, T.N. Prímola-Gomes // *Journal of Sports Science and Medicine.* – 2014. – Vol. 13. – P. 695–701.

138. Cannon, B. Brown adipose tissue: function and physiological significance / B. Cannon, J. Nedergaard // *Physiol. Rev.* – 2004. – Vol. 84. – P. 277–359.

139. Carlisle, H. The effects of preoptic and anterior hypothalamic lesions on behavioral thermoregulation in the cold / H. Carlisle // *J Comp Physiol Psychol.* – 1969. – Vol. 69. – P. 391–402.

140. Casey, K.L. Comparison of human cerebral activation pattern during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain / K.L. Casey, S. Minoshima, T.J. Morrow, R.A. Koeppe // *J Neurophysiol.* – 1996. – Vol. 76. – №1. – P. 571–581.

141. Caterina, M.J. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway / M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius // *Nature.* – 1997. – Vol. 389. – № 6653. – P. 816–824.

142. Caterina, M.J. A capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat / M.J. Caterina, T.A. Rosen, M. Tominaga, A.J. Brake, D. Julius // *Nature.* – 1999. – Vol. 398. – № 6726. – P. 436–441.

143. Caterina, M.J. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor / M.J. Caterina, A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, D. Julius // *Science.* – 2000. – Vol. 288. – P. 306–313.

144. Chambers, J.B. Cardiovascular and metabolic responses of hypertensive and normotensive rats to one week of cold exposure / J.B. Chambers, T.D. Williams, A. Nakamura, R.P. Henderson, J.M. Overton, M.E. Rashotte // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 1486–1494.

145. Chen, Q. Association between Ambient Temperature and Blood Pressure and Blood Pressure Regulators: 1831 Hypertensive Patients Followed Up for Three Years /

Q. Chen, J. Wang, J. Tian, X. Tang, C. Yu, R.J. Marshall, D. Chen, W. Cao, S. Zhan, J. Lv, L. Lee, Y. Hu // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 12.

146. Cheng, W. Heteromeric Heat-sensitive Transient Receptor Potential Channels Exhibit Distinct Temperature and Chemical Response / F. Yang, S. Liu, C.K. Colton, Ch. Wang, Y. Cui, X. Cao, M.X. Zhu, Ch. Sun, K.W. Wang, J. Zheng // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 7279–7288.

147. Chung, M.K. Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes / M.K. Chung, H. Lee, M.J. Caterina // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – № 34. – P. 32037–32046.

148. Chung, M.K. Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3 / M.K. Chung, A.D. Guler, M.J. Caterina // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 15928–15941.

149. Cierri, M.A. Hypertension in SHR rats: contribution of material environment / M.A. Cierri, R. McCarty // *Am. J. Physiol.* – 1987. – Vol. 253. – P. 980–984.

150. Clapham, D.E. The TRP ion channel family / D.E. Clapham, L.W. Runnels, C. Strubing // *Nat Rev Neurosci.* – 2001. – V. 2. – P. 387–396

151. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors / D.E. Clapham // *Nature*. – 2003. – Vol. 426. – P. 517–524.

152. Clapham, J.C. Central control of thermogenesis / J.C. Clapham // *Neuropharmacology*. – 2012. – Vol. 63. – № 1. – P. 111–123.

153. Colburn, R.W. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice / R.W. Colburn, M.L. Lubin, D.J. Stone, Y. Wang, D. Lawrence, M.R. D'Andrea // *Neuron*. – 2007. – Vol. 54. – P. 379–386.

154. Collins, M.G. Factors producing elevated core temperature in spontaneously hypertensive rats / M.G. Collins, W.S. Hunter, C.M. Blatteis // *J. Appl. Physiol.* – 1987. – Vol. 63. – P. 740–745.

155. Cosens, D.J. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant / D.J. Cosens, A. Manning // *Nature*. – 1969. – Vol. 224. – P. 285–287.

156. Craig, A.D. Thermosensory activation of insular cortex / A.D. Craig, K. Chen, D. Bandy, E.M. Reiman // *Nat Neurosci.* – 2000. – Vol. 3. – № 2. – P.184–190.

157. Craig, A.D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body / A.D. Craig // *Nat Rev Neurosci.* – 2002. – Vol. 3. – № 8. – P. 655–666.

158. Crompton, A.W. Evolution of homeothermy in mammals / A.W. Crompton, C.R. Taylor, J.A. Jagger // *Nature.* – 1978. – Vol. 272. – № 5651. – P. 333–336.

159. Dahl, L.K. Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension / L.K. Dahl, M. Heine, L. Tassinari // *J. Exp. Med.* – 1962. – Vol. 115. – P. 1173–1190.

160. Davies, S.N. Facial sensitivity to rates of temperature change: Neurophysiological and psychophysical evidence from cats and humans / S.N. Davies, G.E. Goldsmith, R.F. Hellon, D. Mitchell // *J. Physiol.* – 1983. – Vol. 344. – P.161–175.

161. Davis, K.D. Functional MRI study of thalamic and cortical activations evoked by cutaneous heat, cold, and tactile stimuli / K.D. Davis, C.L. Kwan, A.P. Crawley, D.J. Mikulis // *J. Neurophysiol.* – 1998. – Vol. 80. – № 3. – P.1533–1546.

162. De Champlain, J. Catecholamine metabolism in experimental hypertension in the rat / J. de Champlain, L.R. Krakoff, J. Axelrod // *Circ Res.* – 1967. – Vol. 20. – P. 136–145.

163. De Champlain, J. Turnover and synthesis of norepinephrine in experimental hypertension in rats / J. de Champlain, R.A. Mueller, J. Axelrod // *Circ Res.* – 1969. – Vol. 25. – P. 285–291.

164. De la Pena, E. The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurons / E. De la Pena, A. Mälkiä, H. Cabedo, C. Belmonte, F. Viana // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 567. – P. 415–426.

165. Delany, L.S. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein VRL-2 / L.S. Delany, M. Hurle, P. Facer, T. Alnadaf, C. Plumpton, I. Kinghorn, C.G. See, M. Costigan, P. Anand, C.J. Woolf, D. Crowther, P. Sanseau, S.N. Tate // *Physiol. Genomics.* – 2001. – Vol. 4. – P. 165–174.

166. Depocas, F. Levels of noradrenaline in plasma during thermogenesis induced by cold-exposure or by noradrenaline infusion in warm- and coldacclimated rats / F. Depocas, W.A. Behrens // *Experientia Suppl.* – 1978. – Vol. 32. – P. 35–46.

167. Dhaka, A. TRPM8 is required for cold sensation in mice / Dhaka A., A.N. Murray, J. Mathur, T.J. Earley, M.J. Petrus, A. Patapoutian // *Neuron*. – 2007. – Vol. 54. – №3. – P. 371–378.

168. Dhaka, A. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections / A. Dhaka, T.J. Earley, Watson J., A. Patapoutian // *J. Neurosci*. – 2008. – Vol. 28. – P. 566–575.

169. Doggrell, S.A. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure / S.A. Doggrell, L. Brown // *Cardiovasc Res*. – 1998. – Vol. 39. – № 1. – P. 89–105.

170. Dong, X.P. TRP channels of intracellular membranes / X.P. Dong, X. Wang, H. Xu // *J Neurochem*. – 2010. – Vol. 29. – № 113. – P. 313–328.

171. Du, J. Expression of TRPM8 in the distal cerebrospinal fluid-contacting neurons in the brain mesencephalon of rats / J. Du, X. Yang, L. Zhang, Y.M. Zeng // *Cerebrospinal Fluid Res*. – 2009. – Vol. 6. – № 3. – P. 1–17.

172. Earley, S. TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure / S. Earley, T. Pauyo, R. Drapp, M.J. Tavares, W. Liedtke, J.E. Brayden // *Am J. Physiol Heart Circ Physiol*. – 2009. – Vol. 297. – № 3. – P. 1096–1102.

173. Egan, G.F. Cortical, thalamic, and hypothalamic responses to cooling and warming the skin in a wake humans: A positron-emission tomography study / G.F. Egan, J. Johnson, M. Farrell, R. McAllen, F. Zamarripa, M.J. McKinley, J. Lancaster, D. Denton, P.T. Fox // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – Vol. 102. – № 14. – P. 5262–5267.

174. Erler, I. Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel / I. Erler, D.M. Al-Ansary, U. Wissenbach, T.F. Wagner, V. Flockerzi, B.A. Niemeyer // *J. Biol. Chem*. – 2006. – Vol. 281. – № 50. – P. 38396–38404.

175. Ferrandiz-Huertas, C. Trafficking of Thermo TRP Channels / C. Ferrandiz-Huertas, S. Mathivanan, C.J. Wolf, I. Devesa, A. Ferrer-Montiel // *Membranes*. – 2014. – Vol. 4. – № 3. – P. 525–564.

176. Filosa, J.A. TRPV4 and the regulation of vascular tone / J.A. Filosa, X. Yao, G. Rath // *J Cardiovasc Pharmacol*. – 2013. – Vol. 61. – № 2. – P. 113–119.

177. Finger, S. Lesion of cortical and thalamic somatosensory areas and body temperature maintenance / S. Finger, R.P. Maickel // *Brain Res*. – 1970. – Vol. 21. –

№2. – P. 284–286.

178. Flockerzi, V. TRPs: Truly Remarkable Proteins. In Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels / V. Flockerzi, B. Nilius // Handbook of Experimental Pharmacology. – Springer: Berlin, Germany, 2014. – Vol. 222. – P. 1–12.

179. Fregly, M.J. Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold / M.J. Fregly, D.C. Kikta, R.M. Threatte, J.L. Torres, C.C. Barney // J. Appl Physiol. – 1989. – Vol. 66. – P. 741–749.

180. Fujiwara, Y. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel fourstranded coiled-coil / Y. Fujiwara, D.L. Minor // J. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 383. – №4. – P.854–870.

181. Gao, F. Impairment in Function and Expression of TRPV4 in Dahl Salt-Sensitive Rats: Significance and Mechanism / F. Gao, Wang. D.H. // Hypertension. – 2010. – Vol. 55. – № 4. – P. 1018–1025.

182. Garcia, E.A. Genes and Hypertension / E.A. Garcia, S. Newhouse, M.J. Caulfield, P.B. Munroe // Curr. Pharm. Des. – 2003. – Vol. 9. – P. 1679–1689.

183. Gavva, N.R. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade / N.R. Gavva, A.W. Bannon, D.N. Hovland, S.G. Lehto, L. Klionsky, S. Surapaneni, D.C. Immke, C. Henley, L. Arik, A. Bak, J. Davis, N. Ernst, G. Hever, R. Kuang et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2007. – Vol. 323. – № 1. – P. 128–137.

184. Gavva, N.R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1 / N.R. Gavva // Trends Pharmacol Sci. – 2008. – Vol. 29. – P. 550–557.

185. Gordon, C.J. Thermal biology of the laboratory rat / C.J. Gordon // Physiol Behav. – 1990. – Vol. 47. – № 5. – P. 963–991.

186. Grant, A.D. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice / A.D. Grant, G.S. Cottrell, S. Amadesi, M. Trevisani, P. Nicoletti, S. Materazzi, C. Altier, N. Cenac, G.W. Zamponi, F. Bautista-Cruz // J. Physiol. – 2007. – Vol. 578. – P. 715–733.

187. Green, B.G. Thermal and nociceptive sensations from menthol and their

suppression by dynamic contact / B.G. Green, K.L. Schoen // *Behav Brain Res.* – 2007. – Vol. 176. – P. 284–291.

188. Guatteo, E. Temperature sensitivity of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta: involvement of transient receptor potential channels / E. Guatteo, K.K. Chung, T.K. Bowala, G. Bernardi, N.B. Mercuri, J. Lipski // *J. Neurophysiol.* – 2005. – Vol. 94. – P. 3069–3080.

189. Guler, A.D. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4 / A.D. Guler, H. Lee, T. Iida, I. Shimizu, M. Tominaga, M. Caterina // *J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 22. – № 15. – P. 6408–6414.

190. Hamet, P. Genes of stress in experimental hypertension / P. Hamet, Y.L. Sun, D. Malo, D. Kong, V. Kren, M. Pravenec, J. Kunes, P. Dumas, L. Richard, F. Gagnon // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1994. – Vol. 21. – № 11. – P. 907–911.

191. Hammel, H.T. Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetised dogs / H.T. Hammel, J.D. Hardy, M. Fusco // *Am. J. Physiol.* – 1960. – Vol. 198. – № 3. – P. 481–486.

192. Hammel, H.T. Regulation of internal body temperature / H.T. Hammel // *Ann. Rev. Physiol.* – 1968. – Vol. 30. – № 2. – P. 641–710.

193. Hardy, J.D. Physiology of the temperature regulation / J.D. Hardy // *Physiol. Rev.* – 1961. – Vol. 41. – № 3. – P. 531–606.

194. Harrison, D.G. Inflammation, Immunity and Hypertension / D.G. Harrison, T.J. Guzik, H. Lob, M. Madhur, P.J. Marvar, S. Thabet, A. Vinh, C. Weyand // *Hypertension.* – 2011. – Vol. 57. – № 2. – P. 132–140.

195. Hart, J.S. Insulative and metabolic adaptations to cold in vertebrates / J.S. Hart // *Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1964. – Vol. 18. – P. 31–48.

196. Harteneck, C. TRPV4 and TRPM3 as Volume-Regulated Cation Channels / C. Harteneck, G. Schultz // *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades* / W.B. Liedtke, S. Heller (eds). – Boca Raton (FL): CRC Press, 2007. – 467 p.

197. Hartmannsgruber, V. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression / V. Hartmannsgruber, W.T. Heyken, M. Kacik, A.

Kaistha, I. Grgic, C. Harteneck, W. Liedtke, J. Hoyer, R. Köhler // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2:e827

198. Hayward, J.N. The thalamus and thermoregulation / J.N. Hayward // Temperature regulation and drug actions. – 1975. – P. 22–31.

199. He, J. Genome-Wide Association Study Identifies 8 Novel Loci Associated With Blood Pressure Responses to Interventions in Han Chinese / J. He, T.N. Kelly, Qi Zhao, H. Li // Circ Cardiovasc Genet. – 2013. – Vol. 6. – P. 598–607

200. Heiner, I. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes / I. Heiner, J. Eisfeld, A. Lückhoff // Cell Calcium. – 2003. – Vol. 33. – P. 533–540.

201. Heller, S. Molecular Mechanisms of TRPV4 Gating / S. Heller, R.G. O’Neil // TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades / W.B. Liedtke, S. Heller (eds). – Boca Raton (FL): CRC Press, 2007. – P. 113–125.

202. Hellon, R.F. Thermal stimulation of hypothalamic neurons in unanaesthetized rabbits / R.F. Hellon // Journal of Physiology. – 1967. – Vol. 193. – P. 381–395.

203. Hensel, H. Afferent impulses in cutaneous sensory nerve in human subjects / H. Hensel, K.A. Bomann // J. Neurophysiol. – 1960. – Vol. 23. – P. 564–577.

204. Hensel, H. Neural processes in thermoregulation / H. Hensel // Physiol. Rev. – 1973. – Vol. 53. – P. 948–1017.

205. Hensel, H. Thermoreceptors / H. Hensel // Ann. Rev. Physiol. – 1974. – Vol. 36. – P. 233–250.

206. Hensel, H. Neural processes in long-term thermal adaptation / H. Hensel // Fed. Proc. – 1980. – Vol. 40. – № 14. – P. 2830–2834.

207. Hines, E.A. The cold pressor test for measuring the reactivity of the blood pressure: data concerning 571 normal and hypertensive subjects / E.A. Hines, G.E. Brown // The American Heart. – 1936. – Vol. 11. – №1. – P. 1–9.

208. Hines, E.A. The significance of vascular hyperreaction as measured by the cold-pressor test / E.A. Hines // American Heart Journal. – 1939. – Vol. 19. – №4. – P. 408–416.

209. Hinman, A. TRP channel activation by reversible covalent modification / A. Hinman, H. Chuang, D. Bautista, D. Julius // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol.

103. – P.19564–19568.

210. Hochachka, P.W. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution / P.W. Hochachka, G.N. Somero // New York: Oxford University Press, 2002. – P. 480

211. Hoffmann, A. TRPM3 is expressed in sphingosine-responsive myelinating oligodendrocytes / A. Hoffmann, C. Grimm, R. Kraft, O. Goldbaum, A. Wrede, C. Nolte, U.K. Hanisch, C. Richter-Landsberg, W. Bruck, H. Kettenmann // J. Neurochem. – 2010. – Vol. 114 – P. 654–665.

212. Hopstock, L.A. Seasonal variation in incidence of acute myocardial infarction in a sub-arctic population: The tromso study 1974–2004 / L.A. Hopstock, T. Wilsgaard, I. Njolstad, J. Mannsverk, E.B. Mathiesen, M.L. Lochen, K.H. Bonna // Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. – 2011. – Vol. 18. – P. 320–325.

213. Hu, H.Z. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2 and TRPV3 / H.Z. Hu, Q. Gu, C. Wang, C.K. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L.Y. Lee, J.D. Wood, M.X. Zhu // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 35741–35748.

214. Huang, J. Modulation of temperature-sensitive TRP channels / J. Huang, X. Zhang, P.A. McNaughton // Semin. Cell Dev. Biol. – 2006. – Vol. 17.– №6.–P.638–645.

215. Huang, S.M. Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2 / S.M. Huang, H. Lee, M.K. Chung, U. Park, Y.Y. Yu, H.B. Bradshaw // J Neurosci. – 2008. – Vol. 28. – P. 13727–13737.

216. Huang, S.M. Targeting TRPV3 for the Development of Novel Analgesics / S.M. Huang, M.K. Chung // J. Open Pain. – 2013. – Vol. 6. – № 1. – P. 119–126.

217. Isezuo, S.A. Seasonal variation in hospitalisation for hypertension-related morbidities in Sokoto, north-western Nigeria / S.A. Isezuo // Int J Circumpolar Health. – 2003. – Vol. 62. – P. 397–409.

218. Iwata, Y. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺ permeable growth factor-regulated channel / Y. Iwata, Y. Katanosaka, Y. Arai, K. Kamamura, K. Miyatake, M. Shigekawa // Cell. Biol. – 2003. – Vol. 161. – P. 957–967.

219. Jansky, L. Acclimation of the white rat to cold: Noradrenaline thermogenesis / L. Jansky, R. Bartuncova, E. Zeisberger // *Physiol. Bohemost.* – 1967. – Vol. 16. – P. 366–372.

220. Jansky, L. Nonshivering thermogenesis and its thermoregulatory significance / L. Jansky // *Biol.Rev.* – 1973. – Vol. 48. – P. 85–132.

221. Jansky, L. Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance / L. Jansky // *Physiol. Rev.* – 1995. – Vol. 75. – P. 237–259.

222. Johnson, M.L. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat / M.L. Johnson, D.L. Ely, M.E. Turner // *Hypertension.* – 1992. – Vol. 19. – P. 425–427.

223. Jordt, S. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermoregulation / S. Jordt, D. McKemy, D. Julius // *Current Opinion in Neurobiology.* – 2003. – Vol. 13. – P. 1–6.

224. Jordt, S. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1 / S. Jordt, D. Bautista, H. Chuang, D. McKemy, P. Zygmunt, E. Hogestatt, I. Meng, D. Julius // *Nature.* – 2004. – Vol. 427. – P. 260–265.

225. Kajiyama, H. RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations / H. Kajiyama, F. Okamoto, T. Nemoto, K. Kimachi, K. Toh-Goto, S. Nakayama // *Cell Calcium.* – 2010. – Vol. 48. – P. 260–269.

226. Kanosue, K. Neuronal networks controlling thermoregulatory effectors / K. Kanosue, T. Hosono, Y.H. Zhang, X.M. Chen // *Prog Brain Res.* – 1998. – Vol. 115. – P. 49–62.

227. Kanzaki, M. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I / M. Kanzaki, Y.Q. Zhang, H. Mashima, L. Li, H. Shibata, I. Kojima // *Nat. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 1. – № 3. – P. 165–170.

228. Karashima, Y. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo / Y. Karashima, K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K.Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius, T. Voets // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 106. – P. 1273–1278.

229. Kawakami, M. The study on the activity of the hypothalamus and the limbic system under extreme cold / M. Kawakami, H. Negoro, H. Yanase, M. Mohri // *J.*

Physiol. – 1969. – Vol. 18. – № 3. – P. 609–630.

230. Kida, N. Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes / N. Kida, T. Sokabe, M. Kashio, K. Haruna, Y. Mizuno, Y. Suga, K. Nishikawa, A. Kanamaru, M. Hongo, A. Oba // *Pflug. Arch.* – 2012. – Vol. 463. – P. 715–725.

231. Kikuchi-Utsumi, K. Differential regulation of the expression of alpha1-adrenergic receptor subtype genes in brown adipose tissue / K. Kikuchi-Utsumi, M. Kikuchi-Utsumi, B. Cannon, J. Nedergaard // *Biochem J.* – 1997. – Vol. 322. – P. 417–424.

232. Kim, C.S. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages / C.S. Kim, T. Kawada, B.S. Kim, I.S. Han, S.Y. Choe, T. Kurata // *Cell Signal.* – 2003. – Vol. 15. – № 3. – P. 299–306.

233. Kingma, B. The thermoneutral zone: implications for metabolic studies / B. Kingma, A. Frijns, W. Van Marken Lichtenbelt // *Front Biosci.* – 2012. – Vol. 4. – P. 1975–1985.

234. Kirby, R.F. Thermoregulatory and Cardiac Responses of Infant Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats to Cold Exposure / R.F. Kirby, G. Sokoloff, E. Perdomo, M.S. Blumberg // *Hypertension.* – 1999. – Vol. 33. – P. 1465–1469.

235. Klimov, A.N. Lipids, Lipoproteins and Atherosclerosis / A.N. Klimov, N.G. Nikulcheva (eds.) // *Piter Publishing, St-Petersburg.* – 1995. – 304p.

236. Kluger, M.J. Effect of preoptic anterior hypothalamic lesion on thermoregulation in the bat / M.J. Kluger, J.E. Heath // *Am. J. Physiol.* – 1971. – Vol. 221. – № 1. – P. 144–149.

237. Kojima, I. TRPV2: A calcium-permeable cation channel regulated by insulin-like growth factors / I. Kojima, M. Nagasawa / W.B. Liedtke, S. Heller, (eds) // *CRC Press, Boca Raton (FL).* – 2007. – 467 p.

238. Kong, X. *Rheum palmatum* L. and *Coptis chinensis* Franch., exert antipyretic effect on yeast-induced pyrexia rats involving regulation of TRPV1 and TRPM8 expression / X. Kong, H. Wan, X. Su, C. Zhang, Y. Yang, X. Li, L. Yao, N. Lin // *J. Ethnopharmacol.* – 2014. – Vol. 153. – № 1. – P. 160–168.

239. Kowase, T. Immunohistochemical localization of growth factor-regulated

channel (GRC) in human tissues / T. Kowase, Y. Nakazato, H. Yoko-O, A. Morikawa, I. Kojima // *J. Endocr.* – 2002. – Vol. 49. – № 3. – P. 349–355.

240. Kozyreva, T.V. Cooling rate and threshold of metabolic and heat loss responses before adaptation to cold and after it / T.V. Kozyreva // *Environmental ergonomics VII: Recent progress and new frontiers* / Y. Shapiro, D.S. Moran, Y. Epstein (eds.). – London. – 1996. – P. 251–254.

241. Kozyreva, T.V. The effects of slow and rapid cooling on catecholamine concentration in arterial plasma and skin / T.V. Kozyreva, E.Ya. Tkachenko, V.P. Kozaruk, T.V. Latysheva, M.A. Gilinsky // *Am. J. Physiol. Regul. Integr.* – 1999 a. – Vol. 45. – № 6. – P. 1668–1672.

242. Kozyreva, T.V. Thermoregulatory responses to cooling before and after the noradrenaline ionophoresis to skin / T.V. Kozyreva, E.Ya. Tkachenko, V.P. Kozaruk // *Journal of Thermal Biology.* – 1999 b. – Vol. 24. – № 1. – P. 175–183.

243. Kozyreva, T.V. Plasma lipoproteins under the effect of cold exposure in normotensive and hypertensive rats / T.V. Kozyreva, S.V. Lomakina, F.V. Tuzikov, N.A. Tuzikova // *Journal of Thermal Biology.* – 2004. – Vol. 29. – P. 67–72.

244. Kozyreva, T.V. Neurophysiological aspects of the long-term adaptation to cold in mammals: The role of central and peripheral thermoreceptors / T.V. Kozyreva // *Journal of Thermal Biology.* – 2006. – Vol. 31. – P. 105–114.

245. Kozyreva, T.V. Agonist of TRPM8 channel, menthol, facilitates the initiation of thermoregulatory responses to external cooling / T.V. Kozyreva, V.P. Kozaruk, E.Ya. Tkachenko, G.M. Khramova // *Journal of Thermal Biology.* – 2010. – Vol. 35. – P. 428–434

246. Kozyreva, T.V. Arterial hypertension changes the effects of cold and calcium on immune response / T.V. Kozyreva, L.S. Eliseeva, G.M. Khramova // *Journal of Experimental and Integrative Medicine.* – 2011. – Vol. 1. – № 4. – P. 243–248.

247. Krista, L.M. The effect of controlled temperature variations on growth rate and blood pressure, hematocrit, and hemoglobin values in the turkey / L.M. Krista, G.R. McDaniel, E.C. Mora, R.M. Patterson // *Poult Sci.* – 1979. – Vol. 58. – P. 725–730.

248. Kulikov, A.V. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin

receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard / A.V. Kulikov, V.S. Naumenko, I.P. Voronova, M.A. Tikhonova, N.K. Popova // *J. Neurosci Methods*. – 2005. – Vol. 141. – № 1. – P. 97–101.

249. Kulikov, A.V. Problems of mRNA Quantification in the Brain Using RT-PCR / A.V. Kulikov, V.S. Naumenko // *New Messenger RNA Reserch Communications* / L.B. Kwang (eds.). – Nova Science Publishers. – 2007. – P. 53–68.

250. Kunert-Keil, C. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains / C. Kunert-Keil, F. Bisping, J. Krüger, H. Brinkmeier // *BMC Genomics*. – 2006. – Vol. 7. – P. 159–173.

251. Kurz, A. Physiology of thermoregulation / A. Kurz // *Best Pract Res Clin Anaesthesiol Genomics*. – 2008. – Vol. 22. – № 4. – P. 627–644.

252. Kwan, K.Y. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction / K.Y. Kwan, A.J. Allchorne, M.A. Vollrath, A.P. Christensen, D.S. Zhang, C.J. Woolf et al. // *Neuron*. – 2006. – Vol. 50. – P. 277–289.

253. Laing, R.J. ThermoTRPs and Pain / R.J. Laing, A. Dhaka // *Neuroscientist*. – 2015. – P. 1–17.

254. Latorre, R. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels / R. Latorre, C. Zaelzer, S. Brauchi // *Q. Rev. Biophys.* – 2009. – Vol. 42. – P. 201–246.

255. Latorre, R. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating / R. Latorre, S. Brauchi, G. Orta, C. Zaelzer, G. Vargas // *Cell Calcium*. – 2007. – Vol. 42. – P. 427–438.

256. Lechner, S.G. Developmental waves of mechanosensitivity acquisition in sensory neuron subtypes during embryonic development / S.G. Lechner, H. Frenzel, R. Wang, G.R. Lewin // *J. EMBO*. – 2009. – Vol. 28. – P. 1479–1491.

257. Lee, H. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4 / H. Lee, T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki, M.J. Caterina // *J. Neurosci*. – 2005. – Vol. 25. – P. 1304–1310.

258. Leibowitz, A. Immune mechanisms in hypertension / A. Leibowitz, E.L.

Schiffrin // *Curr Hypertens Rep.* – 2011. – Vol. 13. – P. 465–472.

259. Li, J.S. Renal and vascular effects of chronic endothelin receptor antagonism in malignant hypertensive rats / J.S. Li, W. Schurch, E.L. Schiffrin // *Am J Hypertens.* – 1996. – Vol. 9. – P. 803–811.

260. Liapi, A. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex / A. Liapi, J.N. Wood // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol.22.–№4.–P.825–834.

261. Liedtke, W. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice / W. Liedtke, J.M. Friedman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 13698–13703.

262. Liedtke, W. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor / W. Liedtke, Y. Choe, M.A. Marti-Renom, A.M. Bell, C.S. Denis, A. Sali, A.J. Hudspeth, J.M. Friedman, S. Heller // *Cell.* – 2000. – Vol. 103. – № 3. – P. 525–535.

263. Liedtke, W.B. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades / W.B. Liedtke, S. Heller (Eds.) // CRC Press, Boca Raton (FL). – 2007. – 467 p.

264. Lim, C.L. Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings / C.L. Lim, C. Byrne, J.K. Lee // *Thermoregulation in Sports and Exercise.* – 2008. – Vol. 37. – № 4. – P. 347–353.

265. Lin, S.Y. TRP channels in mechanosensation / S.Y. Lin, D.P. Corey // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2005. – Vol. 15. – № 3. – P. 350–357.

266. Link, T. M. TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis / T.M. Link, U. Park, B.M. Vonakis, D.M. Raben, M. J. Soloski, M. J. Caterina // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol. 11. – №3. – P. 232–239.

267. Liu, D. The Role of Transient Receptor Potential Channels in Metabolic Syndrome / D. Liu, Z. Zhu, M. Tepel // *Hypertens Res.* – 2008. – Vol. 31. – № 11. – P. 1989–1995.

268. Loch, D. Attenuation of cardiovascular remodeling in DOCA-salt rats by the vasopeptidase inhibitor, omapatrilat / D. Loch, A. Hoey, L. Brown // *Clin Exp Hypertens.* – 2006. – Vol. 28. – № 5. – P. 475–488.

269. Lovallo, W. The Cold Pressor Test and Autonomic Function: A Review and Integration / W. Lovallo // *Psychophysiology*. – 1975. – Vol. 12. – № 3. – P. 268–282.

270. Luo, B. Artificial Cold Air Increases the Cardiovascular Risks in Spontaneously Hypertensive Rats / B. Luo, S. Zhang, S. Ma, J. Zhou, B. Wang // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2012. – Vol. 9. – P. 3197–3208.

271. Ma, X. Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel / X. Ma, D. He, X. Ru, Y. Chen, Y. Cai, I.C. Bruce, Q. Xia, X. Yao, J. Jin // *Br. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 166. – P. 349–358.

272. MacDonald, J. Paradox of Ca^{2+} signaling, cell death and stroke / J. MacDonald, Z. Xiong, M. Jackson // *Trends Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – P. 75–81.

273. Macpherson, L.J. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds / L.J. Macpherson, S.W. Hwang, T. Miyamoto, A.E. Dubin, A. Patapoutian, G.M. Story // *Mol Cell Neurosci.* – 2006. – Vol. 32. – P. 335–343.

274. Madrid, R. Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals / R. Madrid, T. Donovan-Rodriguez, V. Meseguer, M. Acosta, C. Belmonte, F. Viana // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 48. – P. 12512–12525.

275. Maione, S. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action / S. Maione, F. Piscitelli, L. Gatta, D. Vita, L. De Petrocellis, E. Palazzo, V. de Novellis, V. Di Marzo // *Br J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 162. – P. 584–596.

276. Malo, D. Decrease of blood pressure in spontaneously hypertensive mice by heat treatment / D. Malo, S.C. Pang, G. Schlager, J. Tremblay, P. Hamet // *Am. J. Hypertens.* – 1990. – Vol. 3. – P. 400–404.

277. Malo, D. Genetic and molecular characteristics of thermosensitivity in hypertension / D. Malo, J. Tremblay, P. Hamet // *J. Hypertens.* – 1988. – Vol. 6. – P. 55–57.

278. Markel, A.L. Development of new strain with inherited stress induced arterial hypertension / A.L. Markel // *Genetic Hypertension*. – 1992. – Vol. 218. – P. 405–407.

279. Markel, A.L. Developmental Influences on Blood Pressure Regulation in

ISIAH Rats / A.L. Markel, L.N. Maslova, G.T. Shishkina et al. // Handbook of Hypertension / Eds R. McCarty, D.A. Blizard, R.L. Chevalier. Elsevier Science. – 1999. – Vol. 19. – P. 493–526.

280. Markel, A.L. Stress as a risk factor for arterial hypertension: a genetic model / A.L. Markel, L.N. Maslova, L.I. Serova, G.T. Shishkina, A.O. Kotzkaya, E.V. Naumenko // J. Hypertension. – 1992. – Vol. 10. – № 4. – P 39.

281. Marshall, R.J. An analysis of the seasonal variation of coronary heart disease and respiratory disease mortality in New Zealand / R.J. Marshall, R. Scragg, P. Bourke // Int J Epidemiol. – 1988. – Vol. 17. – № 2. – P. 325–331.

282. Matthews, K.A. Blood pressure reactivity to psychological stress predicts hypertension in the cardia study / K.A. Matthews, C.R. Katholi, H. McCreath, M.A. Whooley, D.R. Williams, S. Zhu, J.H. Markovitz // Circulation. – 2004. – Vol. 110. – №1. – P. 74–78.

283. McCoy, D.D. Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction / D.D. McCoy, W.M. Knowlton, D.D. McKemy // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2011. – Vol. 300. – № 6. – P. 1278-1287

284. McKemy, D.D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold / D.D. McKemy // Molecular Pain. – 2005. – P. 1–16.

285. McKemy, D.D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation / D.D. McKemy, W.M. Neuhausser, D. Julius // Nature. – 2002. – Vol. 416. – № 6876. – P. 52–58.

286. Mezey, E. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human / E.Mezey, Z.E. Tóth, D.N. Cortright, M.K. Arzubi, J.E. Krause, R. Elde, A. Guo, P.M. Blumberg, A. Szallasi // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2000. – Vol. 97. – P. 3655–3660.

287. Mian, M.O. Innate immunity in hypertension / M.O. Mian, P. Paradis, E.L. Schiffrin // Curr Hypertens Rep. – 2014. – Vol.16. – P. 413.

288. Minke, B. TRP channels and Ca²⁺ signaling / B. Minke // Cell Calcium. – 2006. – Vol. 40. – P. 261–275.

289. Mizuno, A. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4 / A. Mizuno,

N. Matsumoto, M. Imai, M. Suzuki // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. 96–101.

290. Modesti, P.A. Weather-related changes in 24-hour blood pressure profile - Effects of age and implications for hypertension management / P.A. Modesti, M. Morabito, I. Bertolozzi, L. Massetti, G. Panci, et al. // *Hypertension.* – 2006. – Vol. 47. – P. 155–161.

291. Montell, C. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction / C. Montell, G.M. Rubin // *Neuron.* – 1989. – Vol. 2. – № 4. – P. 1313–1323.

292. Montell, C. Physiology, phylogeny, and function of TRP superfamily of cation channels / C. Montell // *Sci. STKE.* – 2001. – P. 215–227.

293. Montell, C. Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation / C. Montell, K. Jones, E. Hafen, G. Rubin // *Science.* – 1985. – Vol. 230. – P. 1040–1043.

294. Montell, C. Thermosensation: hot findings make TRPNs very cool / C. Montell // *Curr. Biol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 476 – 478.

295. Moqrich, A. Impaired thermosensation mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin / A. Moqrich, S.W. Hwang, T.J. Earley, M.J. Petrus, A.N. Murray, K.S. Spencer, M. Andahazy, G.M. Story, A. Patapoutian // *Science.* – 2005. – Vol. 307. – P. 1468–1472.

296. Morrison, S.F. Central control of thermogenesis in mammals / S.F. Morrison, K. Nakamura, C.J. Madden // *Exp Physiol.* – 2008. – Vol. 93. – № 7 – P. 773–797.

297. Morrison, S.F. Central neural pathways for thermoregulation / S.F. Morrison, K. Nakamura // *Front Biosci.* – 2011. – Vol.16. – P. 74–104.

298. Morrison, S.F. Central control of brown adipose tissue thermogenesis / S.F. Morrison, C.J. Madden, D. Tupone // *Front Endocrinol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1–19.

299. Morrison, S.F. Central nervous system regulation of brown adipose tissue / S.F. Morrison, C.J. Madden // *Compr Physiol.* – 2014. – Vol. 4. – № 4. – P. 1677–1713.

300. Morrison, S.F. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis

and energy expenditure / S.F. Morrison, C.J. Madden, D. Tupone // *Cell Metab.* – 2014. – Vol.19. – № 54. – P. 741–756.

301. Mukerji, G. Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations / G. Mukerji, Y. Yiangou, S.L. Corcoran, I.S. Selmer, G.D. Smith, C.D. Benham, C. Bountra, S.K. Agarwal, P. Anand // *BMC Urol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 1–11.

302. Murakami, S. Impact of outdoor temperature on prewaking morning surge and nocturnal decline in blood pressure in a Japanese population / S. Murakami, K. Otsuka, T. Kono, A. Soyama, T. Umeda et al. // *Hypertens Res.* – 2011. – Vol. 34. – P. 70–73.

303. Muraki, K. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes / K. Muraki, Y. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa et al. // *Circ Res.* – 2003. – Vol. 93. – P. 829–838.

304. Nabika, T. Genetic heterogeneity of the spontaneously hypertensive rat / T. Nabika, Y. Nara, K. Ikeda, J. Endo, Y. Yamori // *Hypertension.* – 1991. – Vol. 18. – P. 12–16.

305. Nagasawa, M. Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages / M. Nagasawa, Y. Nakagawa, S. Tanaka, I. Kojima // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol. 210. – P. 692–702.

306. Nagashima, K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation / K. Nagashima, S. Nakai, M. Tanaka, K. Kanosue // *Auton Neurosci.* – 2000. – Vol. 85. – P. 18–25.

307. Nagashima, K. Central mechanisms for thermoregulation in a hot environment / K. Nagashima // *Industrial Health.* – 2006. – Vol. 44. – P. 359–367.

308. Nagata, K. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing / K. Nagata, A. Duggan, G. Kumar, J. Garcia-Anoveros // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 4052–4061.

309. Nakayama, T. Single unit activity of anterior hypothalamus during local heating / T. Nakayama, J.S. Eisenman, J.D. Hardy // *Science.* – 1961. – Vol. 134. – № 3478. – P. 560–561.

310. Nealen, M.L. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive

trigeminal neurons from rat / M.L. Nealen, M.S. Gold, P.D. Thut, M.J. Caterina // *J. Neurophysiol.* – 2003. – Vol. 90. – №1. – P. 515–520.

311. Nedungadi, T.P. Expression and distribution of TRPV2 in rat brain / T.P. Nedungadi, M. Dutta, C.S. Bathina, M.J. Caterina, J.T. Cunningham // *Exp Neurol.* – 2012. – Vol. 237. – P. 223–237.

312. Nilius, B. Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells / B. Nilius, J. Prenen, G. Droogmans, U. Wissenbach, M. Bodding, Droogmans G. // *Pflugers Arch.* – 2001. – Vol. 443. – № 2. – P. 227–233.

313. Nilius, B. Ion channels and their functional role in vascular endothelium / B. Nilius, G. Droogmans // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1415–1459.

314. Nilius, B. The TRPV4 channel: Structure-function relationship and promiscuous gating behavior / B. Nilius, H. Watanabe, J. Vriens // *Pflug. Arch.* – 2003. – Vol. 446. – P. 298–303.

315. Nilius, B. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease / B. Nilius, G. Owsianik, T. Voets, J.A. Peters // *Physiol Rev.* – 2007. – Vol.87.–P.165–217.

316. Nilius, B. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels / B. Nilius, V. Flockerzi (eds.) // *Handbook of Experimental Pharmacology.* – Springer: Berlin, Germany, 2014. – Vol. 222. – 726 p.

317. O'Neil, R.G. The mechanosensitive nature of TRPV channels / R.G. O'Neil, S. Heller // *Pflugers Arch.* – 2005. – Vol. 451. – P. 193–203.

318. O'Donnell, A. Thermoregulation in spontaneously hypertensive rats: effects of antihypertensive treatments / A. O'Donnell, L. Volicer // *Clinical and Experimental Hypertension.* – 1981. – Vol. 3. – № 3. – P. 555–567.

319. Okamoto, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats / K. Okamoto, K. Aoki // *Jap. Circ. J.* – 1963. – Vol. 27. – № 2. – P. 282–293.

320. Okamoto, K. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat / K. Okamoto, Y. Yamori, A. Nagaoka // *Circ Res.* – 1974. – Vol. 34. – P. 143–153.

321. Okuhara D.Y, Hsia A.Y., Xie M. Transient receptor potential channels as drug targets // *Expert Opin. Ther. Targets.* – 2007. – Vol. 11. – № 3. – P. 391–401

322. Ootsuka, Y. Brown adipose tissue thermogenesis heats brain and body as part of the brain-coordinated ultradian basic rest-activity cycle / Y. Ootsuka, R.C. de Menezes, D.V. Zaretsky, A. Alimoradian, J. Hunt, A. Stefanidis, B.J. Oldfield, W.W. Blessing // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 164. – P. 849–861.

323. Park, U. TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception / U. Park, N. Vastani, Y. Guan, S. N. Raja, M. Koltzenburg, M. J. Caterina // *J. Neurosci*. – 2011. – Vol. 31. – № 32. – P. 11425–11436.

324. Patapoutian, A. Thermo TRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation / A. Patapoutian, A. Peier, G. Story, V. Viswanath // *Neuroscience*. – 2003. – Vol. 4. – P. 529 – 539.

325. Pedersen, S.F. TRP channels: an overview / S.F. Pedersen, G. Owsianik, B. Nilius // *Cell. Calcium*. – 2005. – Vol. 38. – № 34. – P. 233–252.

326. Peier, A.M. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol / A.M. Peier, A. Moqrich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian // *Cell*. – 2002. – Vol. 108. – № 5. – P. 705–715.

327. Peng, J.F. Opposite regulation of brain angiotensin type 1 and type 2 receptors in cold-induced hypertension / J.F. Peng, M.I. Phillips // *Regul. Pert.* – 2001. – Vol. 97. – № 2. – P. 91–102.

328. Perraud, A.L. Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response / A.L. Perraud, H.M. Knowles, C. Schmitz // *Mol. Immunol.* – 2004. – Vol. 41. – P. 657–673.

329. Pertusa, M. *N*-Glycosylation of TRPM8 Ion Channels Modulates Temperature Sensitivity of Cold Thermoreceptor Neurons / M. Pertusa, R. Madrid, C. Morenilla-Palao, C. Belmonte, F. Viana // *J Biol Chem*. – 2012. – Vol. 287. – №22. – P. 18218–18229.

330. Picotti, G.B. Plasma catecholamine concentrations in normotensive rats of different strains and in spontaneously hypertensive rats under basal conditions and

during cold / G.B. Picotti, M.O. Carruba, C. Ravazzani, G.P. Bondilotti, M. Da Prada // *Live Sci.* – 1982. – Vol. 31. – P. 2137–2143.

331. Plant, T.D. Trpv4 / T.D. Plant, R. Strotmann // *Handb Exp Pharmacol.* – 2007. – Vol.179. – P.189–205.

332. Plant, T.D. TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation / T.D. Plant, R. Strotmann // *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades* / W.B. Liedtke, S. Heller (Eds) // Boca Raton (FL). – 2007. – 467 p.

333. Price, J.M. Elevated body temperature and increased blood vessel sensitivity in spontaneously hypertensive rats / J.M. Price, F.R. Wilmoth // *Am. J. Physiol.* – 1990. – Vol. 258. – P. 946–953.

334. Qin, N. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons / N. Qin, M.P. Neepner, Y. Liu, T.L. Hutchinson, M.L. Lubin, C.M. Flores // *J Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. – P. 6231–6238.

335. Ramsey, I. An introduction to TRP channels / I. Ramsey, M. Delling, D. Clapham // *Annual Rev. Physiol.* – 2006. – Vol. 68. – P. 619–647.

336. Rapp, J.P. Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats. A review / J.P. Rapp // *Hypertension.* – 1982. – Vol. 4. – P.753–763.

337. Rapp, J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat / J.P. Rapp // *Physiol. Rev.* – 2000. – Vol. 80. – №1. – P. 135–172.

338. Ressler, B. The Renin-Angiotensin System in the Development of Salt-Sensitive Hypertension in Animal Models and Humans / B. Ressler // *Pharmaceuticals* 2010. – Vol. 3. – P. 940–960.

339. Reaves, T.A. Hypothalamic and extrahypothalamic thermoregulatory centers / T.A. Reaves, J.N. Hayward // *Body Temperature-Regulation, Drug Effects and Therapeutic Implications* / P. Lomax, E. Schonbaum (Eds.). –New York. – 1979. – P. 39–70.

340. Reid, G. Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurons / G. Reid, M.L. Flonta // *Neurosci. Lett.* – 2002. – Vol. 324. – P. 164–168.

341. Reilly, R.M. Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature / R.M. Reilly, H.A. McDonald, P.S. Puttfarcken, S.K. Joshi, L. Lewis, M. Pai, P.H. Franklin, J.A. Segreti et al. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2012. – Vol. 342. – № 2. – P. 416–428.

342. Riedel, W. Renal and cutaneous vasomotor and respiratory rate adjustments to peripheral cold and warm stimuli and to bacterial endotoxin in conscious rabbits / W. Riedel, E. Kozawa, M. Iriki // *J Auton Nerv Syst.* – 1982. – Vol. 5. – № 2. – P.177–194.

343. Roberts, J.C. [3H] Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution / J.C. Roberts, J.B. Davis, C.D. Benham // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 995. – № 2. – P. 176–183.

344. Romanovsky, A.A. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality / A.A. Romanovsky, A.I. Ivanov, Y.P. Shimansky // *Journal of Applied Physiology.* – 2002. – Vol. 92. – № 6. – P. 2667–2679.

345. Romanovsky, A.A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system / A.A. Romanovsky // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – № 1. – P. 37–46.

346. Ross, R.A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors / R.A. Ross // *Br J Pharmacol.* – 2003. – Vol. 140. – P. 790–801.

347. Salas, M.M. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: Interaction between TRPA1 and TRPV1 / M.M. Salas, K.M. Hargreaves, A.N. Akopian // *Eur J Neurosci.* – 2009. – V. 29. – P. 1568–1578.

348. Sanchez, J.F. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat / J.F. Sanchez, J.E. Krause, D.N. Cortright // *Neuroscience.* – 2001. – Vol. 107. – № 3. – P. 373–381.

349. Santoni, G. The role of transient receptor potential vanilloid type-2 ion channels in innate and adaptive immune responses / G. Santoni, V. Farfariello, S. Liberati, M.B. Morelli, M. Nabissi, M. Santoni, C. Amantini // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 14. – № 4. – P. 34.

350. Satinoff, E. Behavioral thermoregulation in rats with anterior hypothalamic

- lesions / E. Satinoff, J. Rutstein // *J. Comp Physiol Psychol.* – 1970. – Vol.71.–P.77–82.
351. Sauer, K. Methods for Identifying T Cell Activation Modulating Compounds / K. Sauer, T.J. Jegla // Patent Application WO/2006/065613
352. Schaefer, M. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits / M. Schaefer // *Pflugers Arch.* – 2005. – Vol. 451. – P. 35–42.
353. Schenk, J. The pathogenesis of DOCA–salt hypertension / J. Schenk, J.H. McNeill // *J. Pharmacol Toxicol Methods.* – 1992. – Vol. 27. – P. 161–170.
354. Schiffrin, E.L. The immune system: role in hypertension / E.L. Schiffrin // *Can J Cardiol.* – 2013. – Vol. 29. – P. 543–548.
355. Schork, N.J. Genetically complex cardiovascular traits: origins, problems, and potential solutions / N.J. Schork // *Hypertension* – 1997. – Vol. 29. – P. 145–149.
356. Schumacher, M.A. Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes / M.A. Schumacher, I. Moff, S.P. Sudanagunta, J.D. Levine // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275. – № 4. – P. 2756–2762.
357. Shibasaki, K. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: Regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4 / K. Shibasaki, M. Suzuki, A. Mizuno, M. Tominaga // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1566–1575.
358. Shibasaki, K. TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons / K. Shibasaki, N. Murayama, K. Ono, Y. Ishizaki, M. Tominaga // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – P. 4601–4612.
359. Simon E. Le role de la Mollie epimere dans la thermoregulation / E. Simon // *Arch. Sci. Physiol.* – 1967. – Vol. 21. – № 2. – P. 215–233.
360. Simon, E. Central and peripheral thermal control / E. Simon // *Physiology Review.* – 1986. – Vol. 66. – P. 235–300.
361. Smith, G.D. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein / G.D. Smith, M.J. Gunthorpe, R.E. Kelsell, P.D. Hayes, P. Reilly, P. Facer, J.E. Wright, J.C. Jerman, J.P. Walhin et al. // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – № 6894. – P. 186–190.

362. Smith, P.L. Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels / P.L. Smith, K.N. Maloney, R.G. Pothen, J. Clardy, D.E. Clapham // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 29897–29904.

363. Sokabe, T. Molecular mechanisms underlying thermosensation in mammals / T. Sokabe, M. Tominaga // *Brain Nerve.* – 2009 – Vol. 61. – №7. – P. 867–873.

364. Spinsanti, G. Quantitative Real-Time PCR detection of TRPV1–4 gene expression in human leukocytes from healthy and hyposensitive subjects / G. Spinsanti, R. Zannolli, C. Panti, I. Ceccarelli, L. Marsili, V. Bachiocco, F. Frati, A.M. Aloisi // *Molecular Pain.* – 2008. – Vol. 4. – P. 51–61.

365. St Lezin, E. Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? / E. St Lezin, L. Simonet, M. Pravenec, T.W. Kurtz // *Hypertension.* – 1992. – Vol. 19. – P. 419–424.

366. Staaf, S. Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons / S. Staaf, M.C. Franck, F. Marmigère, J.P. Mattsson, P. Ernfors // *Gene Expr Patterns.* – 2010. – Vol. 10. – P. 65–74.

367. Stein, C.M. Basal and stimulated sympathetic responses after epinephrine: no evidence of augmented responses / C.M. Stein, H.B. He, A.J. Wood // *Hypertension.* – 1998. – Vol. 32. – P. 1016–1021.

368. Stein, R.J. Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract / R.J. Stein, S. Santos, J. Nagatomi, Y. Hayashi, B.S. Minnery, M. Xavier, A.S. Patel, J.B. Nelson, W.J. Futrell, N. Yoshimura et al. // *J. Urol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 1175–1178.

369. Steinberg, D. Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis / D. Steinberg // *Atheroscler.* – 1988. – Rev. – Vol. 18 – P. 1–23.

370. Story, G.M. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures / G.M. Story, A.M. Peier, A.J. Reeve, S.R. Eid, J. Mosbacher, T.R. Hricik, T.J. Earley, A.C. Hergarden, D.A. Andersson, S.W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, A. Patapoutian // *Cell.* – 2003. – Vol. 112. – № 6. – P. 819–829.

371. Straub, I. Flavanones That Selectively Inhibit TRPM3 Attenuate Thermal

Nociception In Vivo / I. Straub, U. Krügel, F. Mohr, J. Teichert, O. Rizun, M. Konrad, J. Oberwinkler, M. Schaefer // *Molecular Pharmacology*. – 2013. – Vol. 84. – № 5. – P. 736–750.

372. Strom, G. Effect of hypothalamic cooling on cutaneous blood flow in the unanesthetized dog / G. Strom // *Acta Physiol. Scand.* – 1960. – Vol. 21. – №2. – P. 271–277.

373. Strotmann, R. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity / R. Strotmann, C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, T.D. Plant // *Nat. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 2. – № 10. – P. 695–702.

374. Stuart, D.G. Activation and suppression of shivering during septal and hypothalamic stimulation / D.G. Stuart, Y. Kawamura, A. Hemingway // *Exp Neurol.* – 1961. – Vol. 4. – P. 485–506.

375. Sun, J. Activation of Cold-Sensing Transient Receptor Potential Melastatin Subtype 8 Antagonizes Vasoconstriction and Hypertension Through Attenuating RhoA/Rho Kinase Pathway / J. Sun, T. Yang, P. Wang, S. Ma, Z. Zhu, Y. Pu, L. Li, Y. Zhao, S. Xiong, D. Liu, Z. Zhu // *Hypertension*. – 2014. – Vol. 63. – P. 1354–1363.

376. Sun, Z. Angiotensinogen gene knockout delays and attenuates cold-induced hypertension / Z. Sun, R. Cade, Z. Zhang, J. Alouidor, H. Van // *Hypertension*. – 2003. – Vol. 41. – P. 322–327.

377. Sun, Z. Cardiovascular responses to cold exposure / Z. Sun // *Front Biosci.* – 2010. – Vol. 2. – P. 495–503.

378. Szabo, T. Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain / T. Szabo, T. Biro, A.F. Gonzalez, M. Palkovits, P.M. Blumberg // *Molecular Brain Research*. – 2002. – Vol. 98. – P. 51–57.

379. Tajino, K. Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses / K. Tajino, K. Matsumura, K. Kosada, T. Shibakusa, Kazuo Inoue, T. Fushiki, H. Hosokawa, S. Kobayashi // *American Journal of Physiology*. – 2007. – Vol. 293. – № 5. – P. 2128–2135.

380. Takatami, O. Electroencephalograms from neocortex and limbic system during temperature regulating responses of the rabbit / O. Takatami, M. Uechi, Y. Nakamura //

Exp. Neurol. – 1967. – Vol. 18. – № 4. – P. 392–403.

381. Talavera, K. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste / K. Talavera, K. Yasumatsu, T. Voets, G. Droogmans, N. Shigemura, Ninomiya Y. et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 438. – P. 1022–1025.

382. Tan, Y. Central alpha-adrenergic receptors and corticotropin releasing factor mediate hemodynamic responses to acute cold stress / Y. Tan, Q. Gan, M.M. Knuepfer // *Braib Res.* – 2003. – Vol. 968. – № 1. – P. 122–129.

383. Taniguchi, Y. The Effect of Altering Skin-Surface Cooling Speeds on Vasoconstriction and Shivering Thresholds / Y. Taniguchi, R. Lenhardt, D.I. Sessler, A. Kurz // *Anesthesia & Analgesia*. – 2011. – Vol. 113. – № 3. – P. 540–544.

384. Terrien, J. Behavioral thermoregulation in mammals: a review / J. Terrien, M. Perret, F. Aujard // *Front Biosci.* – 2011. – Vol. 16. – P. 1428–1444.

385. Thut, P. Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro / P. Thut, D. Wrigley, M. Gold // *Neuroscience*. – 2003. – Vol. 119. – P. 1071–1083.

386. Tian, W. Regulation of TRPV1 by a novel renally expressed rat TRPV1 splice variant / W. Tian, Y. Fu, D.H. Wang, D.M. Cohen // *J Physiol Renal Physiol*. – 2006. – Vol. 290. – № 1. – P. 117–126.

387. Todaka, H. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia / H. Todaka, J. Taniguchi, J. Satoh, A. Mizuno, M. Suzuki // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 35133–35138.

388. Tominaga, M. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli / M. Tominaga, M. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B.E. Raumann, A.I. Basbaum, D. Julius // *Neuron*. – 1998. – Vol. 21. – № 3. – P. 531–543.

389. Tominaga, M. Thermosensation and pain / M. Tominaga, M. Caterina // *J. Neurobiol.* – 2004. – Vol. 61. – P. 3–12

390. Toto-Moukoko, J. Hemodynamic reactivity factors to cold pressor test in blacks with sustained essential hypertension / J. Toto-Moukoko, J.P. Um, J.P. Jon, P. Hagbe // *Am. J. Hypertens.* – 1993. – Vol. 6. – P. 824–829.

391. Trevisani, M. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the

vanilloid receptor-1/ M. Trevisani, D. Smart, M.J. Gunthorpe, M. Tognetto, M. Barbieri, B. Campi et al. // *Nat Neurosci.* – 2002. – Vol. 5. – P. 546–551.

392. Trott, D.W. The immune system in hypertension / D.W. Trott, D.G. Harrison // *Adv Physiol Educ.* – 2014. – Vol. 38. – № 1. – P. 20–24.

393. Tsavaler, L. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins / L. Tsavaler, M.H. Shapero, S. Morkowski, R. Laus // *Cancer. Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 3760–3769.

394. Tsuruda, P.R. Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel / P.R. Tsuruda, D. Julius, D.L. Jr. Minor // *Neuron.* – 2006. – Vol. 51– №2. – P. 201–212.

395. Tsuzuki, K. Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission / K. Tsuzuki, H. Xing, J. Ling, J.G. Gu // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. – № 3. – P. 762–771.

396. Vay, L. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications / L. Vay, G.C. Chunjing, P. McNaughton // *British Journal of Pharmacology.* – 2012. – Vol. 165 – P. 787–801.

397. Venkatachalam, K. TRP channels / K. Venkatachalam, C. Montell // *Annual Review of Biochemistry.* – 2007. – Vol. 76. – P. 387–417.

398. Viana, F. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionie channel expression / F. Viana, E. De la Pena, C. Belmonte // *Nature Neuroscience.* – 2002. – Vol. 5. – P. 254–260.

399. Voets, T. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels / T. Voets, G. Droogmans, U. Wissenbach // *Nature.* – 2004. – Vol. 430. –P. 748–756.

400. Voets, T. TRPM Channel Subfamily. TRPM8 / T. Voets, G. Owsianik, B. Nilius / B. Nilius, V. Flockerzi (eds.) // *Handbook of Experimental Pharmacology.* – Springer: Berlin, Germany, 2007. – Vol. 179. – P. 329–344.

401. Vogt-Eisele, A.K. Monoterpenoid agonists of TRPV3 / A.K Vogt-Eisele, K. Weber, M.A. Sherkheli, G. Vielhaber, J. Panten, G. Gisselmann, H. Hatt // *Br J*

Pharmacol. – 2007. – Vol. 151. – № 4. – P. 530–540.

402. Voronova, I. P. Expression of the 1a and 2a serotonin receptor genes in the brain of rats adapted to warm and cold / I.P. Voronova, A.V. Kulikov, N.K. Popova, T.V. Kozyreva // *J. Thermal Biol.* – 2007. – Vol. 32. – P. 188–192.

403. Voronova, I.P. Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold / I.P. Voronova, A.A. Tuzhikova, T.V. Kozyreva // *Journal of Thermal Biology.* – 2013. – V. 38. – P. 300–304.

404. Vriens, J. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat / J. Vriens, G. Owsianik, T. Hofmann, S.E. Philipp, J. Stab, X. Chen, M. Benoit, F. Xue, A. Janssens, S. Kerselaers // *Neuron.* – 2011. – Vol. 70 – P. 482–494.

405. Wagner, T.F. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells / T.F. Wagner, S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach, I. Mathar, M. Dufer, A. Lis, V. Flockerzi, S.E. Philipp // *Nat. Cell Biol.* – 2008 – Vol. 10 – P. 1421–1430.

406. Wainwright, A. Discrete expression of TRPV2 within the hypothalamo-neurohypophysial system: implications for regulatory activity within the hypothalamic-pituitary-adrenal axis / A. Wainwright, A.R. Rutter, G.R. Seabrook, K. Reilly, K.R. Oliver // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – Vol. 474. – P. 24–42.

407. Walther, D.J. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform / D.J. Walther, J.U. Peter, S. Bashammakh, H. Horyangl, M. Voits, H. Fink, M. Bader // *Science.* – 2003. – Vol. 299. – P. 76–84.

408. Ward, S.M. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract / S.M. Ward, J. Bayguinov, K. J. Won, D. Grundy, H.R. Berthoud // *J. Comp. Neurol.* – 2003. – Vol. 465. – № 1. – P. 121–135.

409. Watanabe, H. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives / H. Watanabe, J.B. Davis, D. Smart, J.C. Jerman, G.D. Smith, P. Hayes, J. Vriens, W. Cairns, U. Wissenbach, J. Prenen // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 13569–13577.

410. Watanabe, H. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels / H. Watanabe, J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, T.

Voets, B. Nilius // *Nature*. – 2003. – Vol. 424. – P. 434–438.

411. Watanabe, H. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells / H. Watanabe, J. Vriens, S.H. Suh, C.D. Benham, G. Droogmans, B. Nilius // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – № 49. – P. 47044–47051.

412. Watanabe, K. Myocardial sympathetic denervation, fatty acid metabolism, and left ventricular wall motion in vasospastic angina / K. Watanabe, T. Takahashi, S. Miyajima, Y. Hirokawa, N. Tanabe, K. Kato, M. Kodama, Y. Aizawa, S. Tazawa, M. Inoue // *J. Nucl. Med.* – 2002. – Vol. 43. – P. 1476–1481.

413. Watanabe, T. Effect of amine on temperature-responsive neurons in slice preparation of rat brain stem / T. Watanabe, A. Morimoto, N. Murakami // *Am. J. Physiol.* – 1986. – Vol. 250. – P. 553–559.

414. Wechselberger, M. Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity/ M. Wechselberger, C.L. Wright, G.A. Bishop, J.A. Boulant // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. 518–529.

415. Wei, E. AG-3-5: a chemical producing sensation of cold / E. Wei, D. Seid // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1983. – Vol. 35. – P. 110–112.

416. Weich, J. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat / J. Weich, S. Simon, P. Reinhart // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 13889–13894.

417. WHO: World Health Organization (WHO) [homepage on the Internet]. Geneva: A global brief on Hypertension. Silent killer, global public health crisis. 2013. URL:http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/

418. Wissenbach, U. Trp12, a novel Trp related protein from kidney / U. Wissenbach, M. Boddling, M. Freichel, V. Flockerzi // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 485. – № 3. – P. 127–134.

419. Wright, G. Resistance to heat stress in the spontaneously hypertensive rat / G.

Wright, S. Iams, E. Knecht, // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 1977. – Vol. 55. – P. 975–982.

420. Xu, H. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels / H. Xu, M. Delling, J.C. Jun, D.E. Clapham // *Nat Neurosci*. – 2006. – Vol. 9. – P. 628–635.

421. Xu, H. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel / H. Xu, I.S. Ramsey, S.A. Kotecha, M.M. Moran, J.A. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, P.S. DiStefano, R. Curtis, D.E. Clapham // *Nature*. – 2002. – Vol. 418. – № 6894. – P. 181–186.

422. Yamashiro, K. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages / K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, T. Furukawa // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2010. – Vol. 398. – № 2. – P. 284–289.

423. Yao, H. Standards and pitfalls of focal ischemia models in spontaneously hypertensive rats: With a systematic review of recent articles / H. Yao, T. Nabika // *Journal of Translational Medicine*. – 2012– Vol. 10. – P. 2–17.

424. Yee, N.S. Transient receptor potential channel TRPM8 is over-expressed and required for cellular proliferation in pancreatic adenocarcinoma / N.S. Yee, W. Zhou, M. Lee // *Cancer Lett*. – 2010. – Vol. 297. – P. 49–55.

425. Yokoyama, T. Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats / T. Yokoyama, T. Ohbuchi, T. Saito, Y. Sudo, H. Fujihara, K. Minami, T. Nagatomo, Y. Uezono, Y. Ueta // *Eur J. Pharmacol*. – 2011. – Vol. 655. – P. 31–37.

426. Yosipovitch, G. Effect of topically applied menthol on thermal, pain and itch sensations and biophysical properties of the skin / G. Yosipovitch, C. Szolar, X.Y. Hui, H. Maibach // *Arch Dermatol Res*. – 1996. – Vol. 288. – P. 245–248.

427. Zamudio-Bulcock, P.A. Activation of steroid-sensitive TRPM3 channels potentiates glutamatergic transmission at cerebellar Purkinje neurons from developing rats / P.A. Zamudio-Bulcock, J. Everett, C. Harteneck, C.F. Valenzuela // *J. Neurochem*.

– 2011 – V. 119 – P. 474–485.

428. Zhang, D.X. Transient receptor potential vanilloid type 4-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in vitro and in vivo / D.X. Zhang, S.A. Mendoza, A.H. Bubolz, A. Mizuno, Z.D. Ge, R. Li, D.C. Warltier, M. Suzuki, D.D. Gutterman // *Hypertension*. – 2009. – Vol. 53. – P. 532–538.

429. Zhang, X.B. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol / X.B.Zhang, P. Jiang, N.Gong, X.L. Hu, D. Fei, Z.Q. Xiong, L. Xu, T.L. Xu // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3. – № 10. – P. 1–11.

430. Zhang, Y.H. Efferent neuronal organization of thermoregulatory vasomotor control / Y.H. Zhang, K. Yamada, T. Hosono, X.M. Chen, S. Shiosaka, K. Kanosue // *Ann NY Acad Sci*. – 1997. – Vol. 813. – P. 117–122.

431. Zhang-James, Y. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources / Y. Zhang-James, F.A. Middleton, S.V. Faraone // *Physiol Genomics*. – 2013. – Vol. 45. – № 13. – P. 528–538.

432. Zheng, J. Molecular Mechanism of TRP Channels / J. Zheng // *Comprehensive Physiology*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 221–242.

433. Zholos, A.V. TRP channels in vascular disorders / A.V. Zholos, T.M. Curtis // *Curr Top Med Chem*. – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 295–309.