

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ TRP-ИОННЫХ
КАНАЛОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ У НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС.
ВЛИЯНИЕ ХОЛОДА И АКТИВАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО
ИОННОГО КАНАЛА TRPM8**

© 2025 г. А. А. Евтушенко^{1,*}, И. П. Воронова¹, Т. В. Козырева¹

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Россия, Новосибирск
*E-mail: evtushenkoaa@neuronm.ru

Поступила в редакцию 31.01.2025 г.

После доработки 24.02.2025 г.

Принята к публикации 27.02.2025 г

Артериальная гипертензия приводит к изменениям функционирования разных систем организма, включая иммунную систему. TRP-ионные каналы все больше привлекают внимание в качестве мишеней для коррекции работы висцеральных органов, в том числе с терапевтическими целями. В настоящей работе исследовалось представительство термочувствительных TRP-ионных каналов в иммунокомпетентном органе – селезенке – методом количественного ОТ-ПЦР у нормо- и гипертензивных животных в норме, при охлаждении и стимуляции периферического холодочувствительного ионного канала TRPM8. Показано, что гены исследованных TRP-ионных каналов (TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4) в разной степени экспрессируются в селезенке у животных обеих линий. У крыс с артериальной гипертензией в селезенке снижена экспрессия генов холодочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1. Это согласуется с ранее полученными данными о снижении экспрессии гена ионного канала TRPM8 в гипоталамусе у гипертензивных животных. Глубокое охлаждение организма, как и активация периферического (кожного) холодочувствительного ионного канала TRPM8 ментолом, приводила к повышению экспрессии генов ионных каналов TRPA1 и TRPV1 в селезенке гипертензивных крыс, не оказывая влияния на экспрессию генов у нормотензивных животных. Учитывая вовлеченность ионных каналов TRPA1 и TRPV1 в процессы воспаления, это может указывать на изменение характера воспалительных реакций у гипертензивных животных при действии холода на организм. Полученные данные могут свидетельствовать о вовлеченности TRP-ионных каналов селезенки в изменение иммунного статуса организма при артериальной гипертензии.

Ключевые слова: TRP-ионные каналы, экспрессия генов, селезенка, активация TRPM8, холод, артериальная гипертензия

DOI: 10.31857/S0869813925050063, **EDN:** TNSLRF

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия остается серьезной медицинской проблемой, основные причины и механизмы которой до конца не выяснены, несмотря на многолетние исследования. В последнее время появилось большое количество работ, посвященных роли им-

мунной системы в развитии и прогрессировании гипертонической болезни [1–6]. Исследования показали устойчивую связь между развитием гипертонии, провоспалительными цитокинами и клетками врожденного и адаптивного (приобретенного) иммунитета [6–8].

Признанной оригинальной моделью гипертонической болезни человека является линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) [9, 10], полученная в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) путем многолетнего отбора [11]. Крысы линии НИСАГ характеризуются множеством признаков, характерных для гипертензии человека. К ним относятся как нейроэндокринные нарушения, связанные с повышением реактивности симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем, так и ряд морфофизиологических показателей гипертензивного состояния [10–12]. У животных данной линии наблюдаются изменения в иммунной системе [13], в частности, изменено соотношение иммунокомпетентных клеток селезенки в сравнении с нормотензивными животными [14]. Наши предыдущие исследования также показали, что иммунные реакции на антиген у нормо- и гипертензивных крыс развиваются по-разному [15, 16–18].

В настоящее время при исследовании артериальной гипертензии большое внимание уделяется TRP-ионным каналам (*Transient Receptor Potential*), которые многими авторами рассматриваются как потенциальные мишени терапевтического воздействия, в том числе при данном заболевании [19–22]. TRP-ионные каналы представляют собой большую группу катионных каналов, участвующих в реакциях клеток на различные внешние стимулы. Они активируются при температурных, тактильных и болевых воздействиях, вовлечены в механическую и вкусовую чувствительность и т.д. [23–27]. Важной особенностью TRP-каналов является способность активироваться природными веществами – ментолом (TRPM8), горчичным маслом и коричным альдегидом (TRPA1), капсаицином (TRPV1), камфорой (TRPV3) [28, 29].

На сегодняшний день показано, что TRP-каналы экспрессируются почти во всех типах клеток иммунной системы [27]. Неудивительно, что все большее количество исследований свидетельствует об их важной роли в иммунной системе [30–33], включая регуляцию процессов воспаления [26, 31, 34].

Холодочувствительный ионный канал TRPM8 является основным рецептором, участвующим в восприятии умеренных холодовых стимулов [35, 36]. Показано, что охлаждение и активация ионного канала TRPM8 влияет на формирование иммунных реакций [17, 18, 37]. В наших предыдущих исследованиях модуляция ионного канала TRPM8 приводила к изменениям некоторых параметров иммунного ответа. В частности, активация периферического TRPM8 (холодом или ментолом) вызывала изменения процессов связывания антигена и антителообразования в селезенке [17], а также влияла на уровень провоспалительных цитокинов в крови (интерлейкина-6, интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли) [18]. При этом у нормотензивных и гипертензивных животных эти изменения были различны.

Известно, что гипоталамус является нейрональным центром регуляции висцеральных функций, включая терморегуляторную и иммунную. Согласно нашим предыдущим исследованиям, в гипоталамусе уровень экспрессии генов термочувствительных TRP-ионных каналов (TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4) у гипер- и нормотензивных животных различается [38]. Учитывая разницу в иммунных реакциях у нормо- и гипертензивных животных, можно предположить, что профиль экспрессии генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке – органе иммунной системы – у гипертензивных животных будет отличаться от такового у нормотензивных. Также возникает вопрос, изменится ли экспрессия генов термочувствительных TRP-ионных каналов при холодом воздействии и при активации периферического кожного ионного канала TRPM8.

Таким образом, в задачи настоящего исследования входило: а) провести сравнительную оценку профиля экспрессии генов термочувствительных TRP-ионных каналов (TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4) в иммунокомпетентном органе –

селезенке, у нормо- и гипертензивных крыс в термонейтральных условиях; б) оценить влияние охлаждения и активации периферического (кожного) ионного канала TRPM8 на уровень экспрессии генов этих термочувствительных TRP-ионных каналов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В представленной работе было проведено три независимых серии экспериментов.

Экспрессия генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке у нормо- и гипертензивных животных в термонейтральных условиях

Исследование проводилось на самцах крыс нормотензивной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) ($n = 10$) и линии с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) ($n = 10$). Крысы были получены из Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Возраст животных составлял 4–6 месяцев, масса тела – 300–400 г. Животные содержались группами по пять особей в клетке ($590 \times 380 \times 200$ мм) при температуре окружающей среды $22\text{--}24$ °С, с 12-часовым циклом темноты–света, со свободным доступом к воде и корму. Контроль артериального давления осуществлялся по ранее описанной методике [12]. Среднее артериальное давление для крыс НИСАГ и WAG составило 174.5 ± 1.5 и 123.5 ± 2.2 мм рт. ст. ($p < 0.001$) соответственно. Интактные животные были эвтаназированы путем декапитации, после чего забирался биологический материал (селезенка для ПЦР-анализа).

Влияние охлаждения и активации периферического ионного канала TRPM8 ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке нормотензивных крыс

Исследование проводилось на самцах крыс линии Wistar ($n = 39$). Животные были получены из вивария Научно-исследовательского института нейронаук и медицины (Новосибирск, Россия). Возраст животных составлял 2–3 месяца, масса тела – 200–300 г. Животные содержались группами по пять особей в клетке ($590 \times 380 \times 200$ мм) при температуре окружающей среды $22\text{--}24$ °С, с 12-часовым циклом темноты–света, со свободным доступом к воде и корму. За 3–4 дня до эксперимента животных рассаживали в одиночные клетки для устранения группового эффекта.

Влияние охлаждения и активации периферического ионного канала TRPM8 ментолом на экспрессию генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке гипертензивных крыс

Исследование проводилось на самцах крыс линии НИСАГ ($n = 60$). Крысы были получены из Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Возраст животных составлял 4–6 месяцев, масса тела – 300–400 г. Содержание животных было аналогично содержанию крыс Wistar, описанному выше.

Подготовка животных. Все процедуры, включая подготовку, фиксацию, аппликацию веществ, охлаждение и регистрацию физиологических параметров, проводили на анестезированных крысах, чтобы исключить эмоциональную составляющую и движение животных. После наступления наркотического сна у животного участок кожи живота площадью 25 см² освобождался от шерсти. Удаление шерсти осуществлялось ножницами без применения химических препаратов и болезненного раздражения. В середине этой области помещался внутрикожный термодатчик (термопара). Животному также вводился ректальный термодатчик на глубину 6 см. После подготовки животное

фиксирувалось на термостатируемом столе с поддерживаемой температурой 37–38 °С, на котором оно находилось во время эксперимента во избежание неконтролируемого снижения температуры тела.

Апликация веществ. Активация периферического ионного канала TRPM8 осуществлялась путем аппликации 1 мл 1%-ной суспензии ментола (menthol 5-Methyl-2-(1-Methylethyl) Cyclohexanol, Sigma, США) в физиологическом растворе. Контрольным животным осуществлялась аппликация 1 мл физиологического раствора. Вещества наносились на предварительно подготовленную кожу живота площадью 25 см² (место дальнейшего приложения температурного стимула). Продолжительность аппликации составляла 20 мин. Температура веществ была близкой к температуре кожи живота и составляла 37–38 °С.

Охлаждение. Эксперименты проводились при температуре окружающей среды 22–24 °С. Охлаждение осуществляли с помощью термода площадью 25 см², прикладываемого к предварительно подготовленному участку кожи живота. Использовали модель медленного глубокого охлаждения со скоростью охлаждения 0.0083 ± 0.0004 °С/с. Глубина охлаждения – до снижения ректальной температуры на 3–4 °С. Для контроля глубины и скорости охлаждения ректальную температуру и температуру кожи живота измеряли с помощью термопар и регистрировали непрерывно с помощью системы ВЮРАС (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, США). После эксперимента (без выхода из наркоза) животные были эвтаназированы путем декапитации, после чего забирался биологический материал (селезенка для ПЦР-анализа).

Дизайн эксперимента. Каждое наркотизированное животное фиксировали на термостатируемом столике и подвергали следующим манипуляциям: подключение регистрационных датчиков, аппликация одного из веществ (20 мин), измерение физиологических показателей после нанесения вещества (эффект вещества и исходное состояние до охлаждения) (5 мин), охлаждение животного (≈ 30 мин в модели медленного охлаждения) и декапитация. В группе с охлаждением животных декапитировали при снижении ректальной температуры на 3–4 °С. Контрольных животных (не подвергавшихся воздействию холода) декапитировали в момент, соответствующий началу охлаждения животных опытной группы.

Экспериментальные группы животных. Были сформированы три экспериментальных группы: 1 – животные с аппликацией физиологического раствора (контроль); 2 – животные с аппликацией 1%-ной суспензии ментола в физиологическом растворе; 3 – животные, подвергавшиеся медленному глубокому охлаждению.

Взятие селезенки для ПЦР-анализа. После эвтаназии животного из его брюшной полости извлекали селезенку и помещали на лед. Далее острой бритвой делалось 2 поперечных сечения: первым (чуть в стороне от ворот селезенки) орган делили на 2 части, вторым сечением делали срез толщиной ≤ 1 мм через все слои. Пробы помещали в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С до выделения суммарной РНК.

Определение экспрессии генов. Экспрессию генов определяли количественным методом ОТ-ПЦР, подробно описанным ранее [39–41]. Выделение РНК осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции [42] с использованием TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) согласно протоколу производителя. Возможные следы геномной ДНК удаляли путем обработки ДНКазой RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, США) в соответствии с протоколом производителя. Все праймеры, использованные в настоящем анализе, были разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных European Molecular Biology Laboratory (EMBL), и синтезированы в компании “БИОССЕТ” (Новосибирск, Россия). Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров указаны в табл. 1. Уровень экспрессии генов представлен как количество копий мРНК исследуемого гена на 100 копий мРНК гена домашнего хозяйства *Ppia* (ген пептидил-пролил *цис-транс*-изомеразы A).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров, использованных для определения уровня экспрессии генов TRP-ионных каналов в селезенке крыс

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Количество циклов амплификации	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)
<i>Trpv1</i>	F 5'-ATGGAGTCCACACCACACAAG R 5'-TGAGCATGTTGAGCAGAAGG	60	34	211
<i>Trpv2</i>	F 5'-CCAAGCCCCCTCGTCAATGCC R 5'-GAGGTGAACATCCGCTCCATTCTCTAC	60	30	131
<i>Trpv3</i>	F 5'-CATGTACCAACCAGCCTGAG R 5'-GCGTGAGACCCTCATTGTT	56	35	222
<i>Trpv4</i>	F 5'-TCTGGTCAC CCTCCTGAATC R 5'-CTTGCTCTCCTGGACACCT	63	36	298
<i>Trpm8</i>	F 5'-GAAGCCATTGACAAGCACAAG R 5'-ACGAAGACCAGGGCATAGAG	64	36	189
<i>Trpa1</i>	F 5'-TTTGAAAAAGCAGCACGAG R 5'-TGGGTGGCTAATAGAACAATGTG	66	36	193
<i>Ppia</i>	F 5'-CCGACTGTGGACAACCTAAT R 5'-ACTTGAAGGGAATGAGGAAA	61.5	29	168

Статистика. Для статистического анализа использовали пакет программ Statistica 8 (StatSoft, Россия) и программу Microsoft Excel. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, равенство (однородность) дисперсий – посредством критерия Левена (Levene's test). Подтверждение гипотезы о нормальном распределении и однородности дисперсий позволило проводить статистическую обработку результатов с помощью *t*-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с применением критерия Фишера при сравнении показателей нескольких экспериментальных групп. Различия считали достоверным при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке нормо- и гипертензивных животных в термонеutralных условиях

В качестве внутреннего стандарта использовали ген пептидил-пролил *цис-транс*-изомеразы А (*Ppia*). Уровень мРНК *Ppia* составил 6.22 ± 0.89 нг/мкл у нормотензивных крыс WAG и 5.71 ± 0.96 нг/мкл у гипертензивных крыс НИСАГ. Различий между линиями животных обнаружено не было ($p = 0.70$, $t = 0.39$).

Исследования показали, что у нормо- и гипертензивных крыс в селезенке в разной степени экспрессируются гены как теплочувствительных, так и холодоchувствительных TRP-ионных каналов (табл. 2).

Гены холодоchувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8 в селезенке у гипертензивных животных экспрессируются значительно в меньшей степени, чем у нормотензивных (табл. 2). Уровень мРНК *Trpa1* у гипертензивной линии НИСАГ более чем в полтора раза ниже, чем у нормотензивной линии WAG, а содержание мРНК гена *Trpm8* у гипертензивных животных настолько мало, что количественная оценка его экспрессии затруднена, тогда как у нормотензивных крыс его уровень определяется достаточно четко (рис. 1). Для генов теплочувствительных TRP-ионных каналов –

Таблица 2. 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	1.61 ± 0.21	0.86 ± 0.26	0.74 ± 0.14	189.21 ± 37.53	3.08 ± 0.59	0.24 ± 0.09
Гипертензивная линия НИСАГ, n = 10	0.89 ± 0.18*	0.01 ± 0.00**	0.59 ± 0.15	155.79 ± 14.01	2.26 ± 0.61	0.37 ± 0.16
<i>p</i>	0.02	0.004	0.50	0.42	0.35	0.50

Примечания. Данные представлены как число копий исследуемого гена на 100 копий гена *Ppia*. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ – достоверные различия между животными исследуемых линий, *t*-критерий Стьюдента.

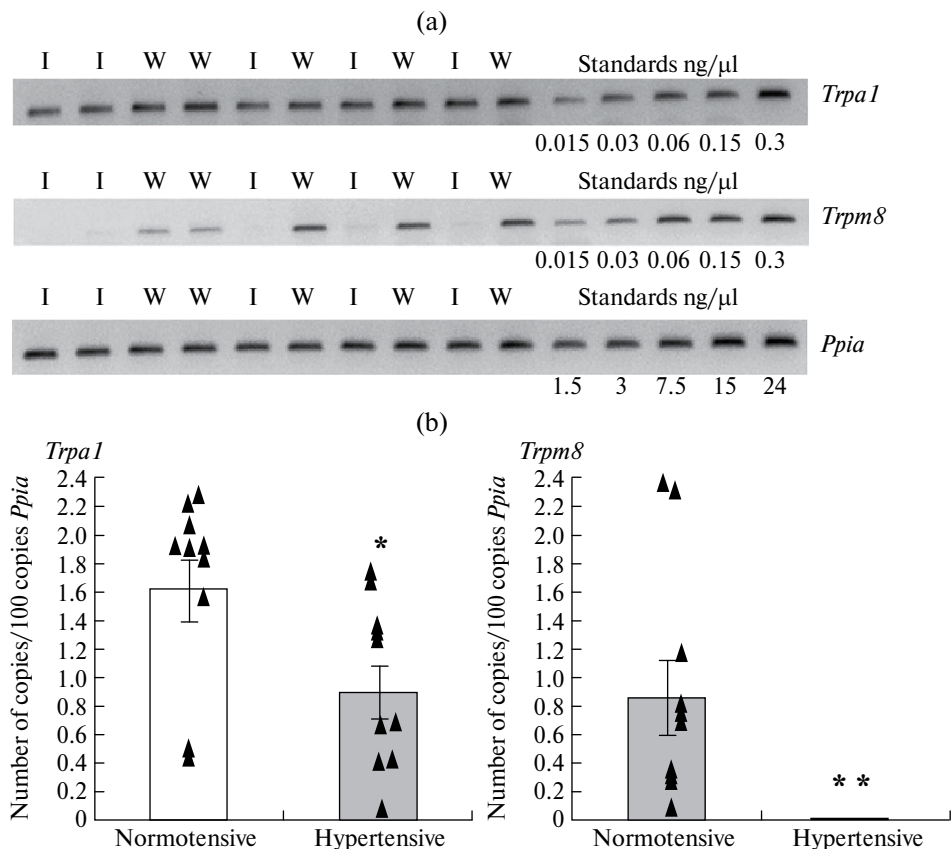


Рис. 1. Экспрессия генов холодочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8 в селезенке нормо- и гипертензивных животных. (а) – Фото полос ПЦР-продукта проб и стандартов для исследуемых генов *Trpa1*, *Trpm8* и гена домашнего хозяйства *Ppia*, где I – гипертензивная линия НИСАГ (ISIAH), W – нормотензивная линия WAG. (б) – Уровень мРНК генов *Trpa1* и *Trpm8*. Экспрессия генов представлена как число копий исследуемого гена на 100 копий гена домашнего хозяйства *Ppia*. Индивидуальные значения представлены на рисунке треугольниками. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$, достоверные различия между животными исследуемых линий, *t*-критерий Стьюдента.

TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4 – различий в экспрессии генов между гипер- и нормотензивными животными обнаружено не было. Обращает на себя внимание довольно высокая экспрессия гена *Trpv2*, в несколько раз превышающая экспрессию других исследованных TRP-ионных каналов.

Влияние охлаждения и активации периферического ионного канала TRPM8 на экспрессию генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке нормотензивных крыс

В качестве внутреннего стандарта при сравнении показателей разных экспериментальных групп использовали ген пептидил-пролил *цис-транс*-изомеразы А (*Ppia*). Уровень мРНК *Ppia* в экспериментальных группах достоверно не различался ($F_{1,17} = 0.69$, $p = 0.52$) (табл. 3).

В табл. 3 представлены данные об уровне мРНК генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке нормотензивных крыс в термонеutralных условиях (контроль), после аппликации ментола и после медленного глубокого охлаждения. Ни температурное воздействие, ни аппликация ментола не оказывали влияния на уровень мРНК исследованных генов TRP-ионных каналов у нормотензивных животных.

Таблица 3. Уровень мРНК гена *Ppia* (нг/мкл), генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке нормотензивных крыс в контроле, после активации периферического ионного канала TRPM8 в термонеutralных условиях и после медленного глубокого охлаждения

Экспериментальные группы	<i>Ppia</i> (нг/мкл)	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Контроль, $n = 6$	18.26 ± 4.64	0.34 ± 0.16	0.30 ± 0.12	0.13 ± 0.04	63.17 ± 25.08	1.23 ± 0.18	0.05 ± 0.02
Аппликация ментола, $n = 8$	11.84 ± 3.81	0.74 ± 0.33	0.61 ± 0.22	0.19 ± 0.07	69.82 ± 21.26	1.41 ± 0.14	0.03 ± 0.01
Медленное глубокое охлаждение, $n = 6$	16.03 ± 3.37	0.44 ± 0.21	0.45 ± 0.10	0.20 ± 0.06	41.14 ± 16.96	1.59 ± 0.29	0.04 ± 0.02

Примечание. Данные по экспрессии генов TRP-ионных каналов представлены как число копий исследуемого гена на 100 копий гена *Ppia*. Достоверных различий не обнаружено, One-Way ANOVA, post-hoc Fisher test.

Влияние охлаждения и активации периферического ионного канала TRPM8 на экспрессию генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке у гипертензивных крыс

Уровень мРНК *Ppia*, который использовали в качестве внутреннего стандарта, достоверно не различался в экспериментальных группах ($F_{1,27} = 0.32$, $p = 0.73$) (табл. 4).

В табл. 4 представлены данные об уровне мРНК генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке гипертензивных крыс в термонеutralных условиях (контроль), после аппликации ментола и после медленного глубокого охлаждения. В данной серии экспериментов у гипертензивных крыс НИСАГ также обнаружен сниженный уровень мРНК гена *Trpm8*, который с трудом подлежит детекции.

Таблица 4. Уровень мРНК гена *Ppia* (нг/мкл), генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке гипертензивных крыс в контроле, после активации периферического ионного канала TRPM8 в термонейтральных условиях и после медленного глубокого охлаждения

Экспериментальные группы	<i>Ppia</i> (нг/мкл)	<i>Trpa1</i>	<i>Trpm8</i>	<i>Trpv1</i>	<i>Trpv2</i>	<i>Trpv3</i>	<i>Trpv4</i>
Контроль, <i>n</i> = 10	17.95 ± 1.46	0.66 ± 0.07	0.03 ± 0.01	0.42 ± 0.05	49.50 ± 3.57	3.70 ± 0.48	0.20 ± 0.05
Аппликация ментола, <i>n</i> = 10	16.18 ± 1.51	1.01 ± 0.11*	0.02 ± 0.01	0.71 ± 0.09*	57.71 ± 5.37	3.94 ± 0.35	0.20 ± 0.06
Медленное глубокое охлаждение, <i>n</i> = 10	16.46 ± 2.05	0.55 ± 0.10	0.06 ± 0.03	0.67 ± 0.10*	58.99 ± 8.45	3.39 ± 0.55	0.19 ± 0.06

Примечание. Данные по экспрессии генов TRP-ионных каналов представлены как число копий исследуемого гена на 100 копий гена *Ppia*. * – $p < 0.05$, достоверное отличие от контрольной группы, One-Way ANOVA, post-hoc Fisher test.

В отличие от нормотензивных животных, у которых в селезенке не наблюдаются изменения экспрессии генов TRP-ионных каналов, у гипертензивных животных обнаружены изменения уровня мРНК *Trpv1* и *Trpa1* в ответ на активацию TRPM8.

Активация периферического TRPM8 агонистом ментолом приводила к увеличению уровня мРНК *Trpv1* и *Trpa1* (рис. 2а, б) более чем в 1.5 раза ($F_{1,27} = 3.78, p = 0.017, F_{1,27} = 5.97, p = 0.025$). Медленное глубокое охлаждение повышало только экспрессию гена *Trpv1* ($F_{1,27} = 3.78, p = 0.037$) (рис. 2а). Экспрессия остальных исследованных генов TRP-ионных каналов не изменялась (табл. 4).

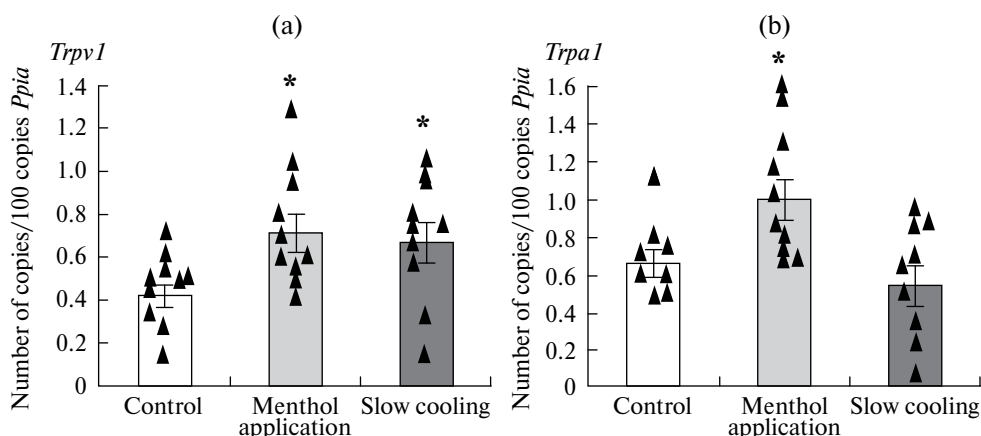


Рис. 2. Влияние медленного глубокого охлаждения и активации периферического ионного канала TRPM8 ментолом на экспрессию генов *Trpv1* (а) и *Trpa1* (б) в селезенке гипертензивных крыс. Экспрессия генов представлена как число копий исследуемого гена на 100 копий гена домашнего хозяйства *Ppia*. Индивидуальные значения представлены на рисунке треугольниками. * – $p < 0.05$, достоверное отличие от контрольной группы, One-Way ANOVA, post-hoc Fisher test.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами проведено сравнительное исследование экспрессии генов шести термочувствительных TRP-ионных каналов в иммунокомпетентном органе – селезенке, у нормо- и гипертензивных животных. Внимание к этому органу иммунной системы обусловлено несколькими причинами. Во-первых, селезенка является крупнейшим лимфоидным органом и выполняет широкий спектр иммунологических функций [43]. Во-вторых, было показано, что у гипертензивных животных по сравнению с нормотензивными наблюдаются изменения в функционировании иммунной системы [13, 15–18], а также изменено соотношение иммунокомпетентных клеток селезенки [14]. В-третьих, реакция иммунной системы на антиген у гипертензивных животных при смене температурных условий отличается от таковой у нормотензивных [16, 37]. И в-четвертых, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о важной роли иммунной системы в патогенезе гипертонической болезни [4–6] и вовлеченности TRP-ионных каналов в этот процесс [21, 22, 32, 33]. К тому же данные об особенностях представительства термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке при артериальной гипертензии далеко не полны.

Согласно немногочисленным данным литературы, в селезенке крыс исследователи констатировали экспрессию ряда генов термочувствительных TRP-каналов – TRPV1 [44], TRPV2 [45–47]. Козырева с соавт. [48] в экспериментах *in vitro* показали присутствие ионного канала TRPM8 на клетках селезенки крыс.

Представительству TRP-ионных каналов в селезенке мышей уделено более пристальное внимание. Kunert-Keil с соавт. [49] методом Real-time PCR исследовали экспрессию генов TRP-ионных каналов, в том числе термочувствительных, в разнообразных тканях мыши. В селезенке мышей авторы обнаружили экспрессию *Trpa1*, *Trpm8*, *Trpv2*, *Trpv3*, *Trpv4* и не обнаружили экспрессию *Trpv1*. Другим исследователям также не удалось обнаружить TRPV1 в селезенке у мышей [50]. Однако Bertin с соавт. [51] показали наличие мРНК *Trpv1*, а также *Trpv2*, *Trpv3*, *Trpv4* в первичных Т-клетках CD4⁺, выделенных из селезенки мышей. Nagata с соавт. [52], используя метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, не удалось обнаружить TRPA1 в селезенке у мышей, в то время как Sahoo с соавт. [53] методом ОТ-ПЦР показали экспрессию мРНК *Trpa1* в Т-клетках. Позднее Naert с соавт. [54], обобщая имеющиеся литературные данные, подробно описывал присутствие TRPA1 на различных иммунных клетках. Исследуя роль теплочувствительных TRP-ионных каналов в иммунных процессах, Majhi с соавт. [55] показали присутствие TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4 в Т-клетках селезенки мышей. Авторы подчеркивали, что экспрессия этих ионных каналов является функциональной, а сами TRP-каналы, участвуя в регуляции внутриклеточного Ca²⁺, выполняют иммунорегуляторную роль [55].

Наши исследования показали, что в иммунокомпетентном органе – селезенке, у крыс в разной степени экспрессируются гены шести исследованных термочувствительных TRP-ионных каналов – TRPA1, TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4. Надо отметить, что профиль экспрессии генов термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке у нормотензивных животных вполне сопоставим с профилем их экспрессии в мозге [39]. Присутствие различных термочувствительных TRP-ионных каналов в селезенке может являться молекулярной основой зависимости функций иммунных клеток от температурных условий.

Обращает на себя внимание обнаруженная высокая экспрессия гена *Trpv2*. Как у нормо-, так и у гипертензивных крыс уровень мРНК *Trpv2* в разы превышает этот показатель для других исследованных генов термочувствительных TRP-ионных каналов. Межлинейных различий обнаружено не было. Согласно данным литературы, TRPV2 экспрессируется в иммунных клетках человека и животных [47, 56–58], а также играет важную роль в контроле врожденных иммунных реакций [59]. Основными функциями, опосредованными TRPV2 иммунных клеток, являются миграция нейтрофилов [60],

макрофагов [61], фагоцитоз [62], дифференциация моноцитов и макрофагов [58]. Принимая во внимание вышесказанное, обнаруженный нами в селезенке высокий уровень мРНК *Trpv2* представляется вполне логичным. Ранее мы показали, что в структурах мозга, в том числе в центре регуляции висцеральных функций – гипоталамусе, также наблюдается высокий уровень мРНК *Trpv2*, сопоставимый, а иногда и превышающий этот показатель для гена домашнего хозяйства [38, 39]. Таким образом, обнаруженный нами высокий уровень мРНК *Trpv2* в селезенке и структурах мозга крыс, отсутствие разницы по этому показателю между нормо- и гипертензивными животными, а также анализ данных литературы позволяют предполагать важную роль TRPV2 в процессах жизнедеятельности клеток как головного мозга, так и периферических тканей.

В настоящей работе было показано, что при артериальной гипертензии в селезенке наблюдаются изменения в экспрессии генов холодочувствительных TRP-ионных каналов. У гипертензивных крыс по сравнению с нормотензивными обнаружено значительное снижение мРНК гена *Trpm8*, затрудняющее количественную оценку уровня его экспрессии, а также сниженный, относительно нормотензивных крыс, уровень мРНК *Trpa1*. Известно, что для гипертензивных животных характерны изменения показателей иммунного ответа при воздействии холода на организм [16, 18]. Констатируемый нами факт снижения экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8 в селезенке гипертензивных животных дает основание полагать, что именно эти ионные каналы могут быть ответственны за измененный иммунный ответ у этих животных при охлаждении.

Вызывает интерес показанное в работе значительное снижение уровня мРНК *Trpm8* в селезенке у крыс с артериальной гипертензией. Ионный канал TRPM8 представляет собой неселективный кальциевый канал, активируемый холодом и ментолом и играющий важную роль в холодовой чувствительности [35, 36, 63]. Ранее мы также обнаружили сниженный уровень экспрессии гена *Trpm8* в гипоталамусе у гипертензивных животных по сравнению с нормотензивными [38]. Эти результаты согласуются с данными о сниженной чувствительности к ментолу (агонист TRPM8) у этих животных. Так, у гипертензивных животных в отличие от нормотензивных активация TRPM8 не влияла на пороги терморегуляторных реакций при охлаждении [16, 64, 65], а также на параметры иммунного ответа [16] и содержание провоспалительных цитокинов в крови [18]. Не исключено, что сниженная экспрессия гена *Trpm8* может являться компенсаторной защитной реакцией при артериальной гипертонии. Было обнаружено выраженное влияние стимуляции TRPM8, вызывающее повышение артериального давления у нормотензивных животных, тогда как у гипертензивных животных это влияние было значительно слабее, по-видимому, обусловленное сниженным представителем ионного канала TRPM8 в мозге и в периферических тканях [66].

Известно, что температура оказывает существенное влияние на различные показатели как иммунной [16–18, 67–70], так и сердечно-сосудистой системы [71, 72]. Высокая чувствительность к минимальным изменениям температуры делает термочувствительные TRP-ионные каналы обоснованными кандидатами для температурозависимой модуляции иммунных процессов в норме и при патологических состояниях организма.

Как у нормо-, так и у гипертензивных животных активация периферического (кожного) ионного канала TRPM8 ментолом и охлаждение не влияли на уровень экспрессии гена *Trpm8* в селезенке, в отличие от показанного ранее модулирующего эффекта активации периферического ионного канала TRPM8 на уровень экспрессии гена *Trpm8* в гипоталамусе [65]. Кроме того, в нашем исследовании у нормотензивных животных не было обнаружено влияния активации TRPM8 на экспрессию других исследованных генов. У крыс с наследственной артериальной гипертензией были показаны изменения в уровне мРНК *Trpv1* и *Trpa1*: повышение экспрессии генов *Trpv1* и *Trpa1* после аппликации ментола на кожу, а также повышение мРНК *Trpv1* в ответ на глубокое охлаждение организма. Изменений в уровне мРНК *Trpv2*, *Trpv3* и *Trpv4* не было обнаружено.

Известно, что охлаждение, как и активация периферического TRPM8, модулируют иммунный ответ организма [17]. Ранее было показано, что активация периферических ионных каналов TRPV1 и TRPA1 в разной степени усиливает связывание антигена в клетках селезенки, а глубокое охлаждение, наоборот, ингибирует этот процесс [37]. У гипертензивных животных при охлаждении не наблюдается угнетение этого показателя [16]. Возможным объяснением этого может быть повышение экспрессии *Trpv1* и *Trpa1* в селезенке, показанное в настоящей работе. Полученные результаты дают основание полагать, что ионные каналы TRPV1 и TRPA1 селезенки могут быть вовлечены в изменение иммунного ответа при артериальной гипертензии.

Известно, что термочувствительные ионные каналы TRPV1 и TRPA1 вовлечены в индукцию и регуляцию процесса воспаления [31, 34]. Для них показана ко-локализация и реципрокная регуляция, что указывает на связь между двумя рецепторами [73–76]. В недавнем обзоре Yan с соавт. [27] подробно рассматривают роль некоторых TRP-каналов иммунных клеток в воспалении. Авторы отмечают, что модуляция (активация или ингибирование) TRP-ионных каналов (в том числе TRPV1 и TRPA1) в клетках иммунной системы вызывает изменение уровня провоспалительных цитокинов [27]. Это в свою очередь может способствовать гипертензивному состоянию, вероятно, через воздействие как на почки, так и на сосудистую систему [8].

Показанные различия в экспрессии генов TRP-ионных каналов у нормо- и гипертензивных животных в селезенке, изменения уровня мРНК *Trpv1* и *Trpa1* у гипертензивных животных при отсутствии таковых у нормотензивных, а также приведенные данные литературы еще раз подчеркивают значительные изменения в функционировании организма при артериальной гипертензии.

Необходимо коснуться вопроса о возможном влиянии ментола и на другие TRP-ионные каналы (не TRPM8). Давно известно, что ментол является полным агонистом (*full agonist*) для ионного канала TRPM8, т.е. оказывает на него стимулирующее влияние при минимальной концентрации и не требует дополнительных условий для его активации [35]. Позднее появились работы, указывающие на то, что при определенных условиях ментол может модулировать и другие TRP-ионные каналы [77–80]. Показано, что ментол может активировать ионный канал TRPV3 [63, 81] и оказывать бимодальное воздействие на TRPA1 и TRPV1 [77–80, 82]. В отношении влияния ментола на TRPV1 обнаружены видовые различия: так, ментол способен активировать TRPV1 крысы [80], но ингибировать активированный капсаицином TRPV1 у человека [79].

Известно, что агонисты ионных каналов TRPV1 и TRPM8 могут оказывать взаимно ингибирующее действие [79]. Так, ощущение холода, индуцированное ментолом и опосредованное TRPM8, может быть усилено за счет дополнительного ингибирования TRPV1, а ощущение тепла, индуцированное капсаицином и опосредованное TRPV1, может быть усилено за счет ингибирования TRPM8 [79, 83]. Напротив, низкие температуры уменьшают индуцированную капсаицином активацию TRPV1 [84], тогда как тепловая стимуляция подавляет вызванную ментолом активацию TRPM8 [85]. Эти данные, а также показанная совместная экспрессия TRPV1 и TRPM8 [86] и наличие у TRPV1 сайта связывания с ментолом [79] подтверждают возможность взаимодействия TRPM8 и TRPV1 посредством и агонистов, и температурных стимулов.

Существующие данные о влиянии ментола и холода на ионный канал TRPA1 противоречивы. Есть данные, что ментол и холод блокируют TRPA1 у грызунов [81] и стимулируют этот ионный канал у человека и некоторых приматов [78, 82]. В недавнем исследовании Yamaguchi с соавт. [87] продемонстрировали, что ментол, как и воздействие холода, активирует ионный канал TRPA1 у человека, собаки и мыши. Однако пороги (температура, концентрация) активации были видоспецифичны.

Необходимо отметить, что большинство данных о влиянии температурных и фармакологических воздействий на TRP-ионные каналы получены в искусственных условиях на культурах клеток, и в живом организме могут быть иными.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что гены шести термочувствительных TRP-ионных каналов (TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4) в разной степени экспрессируются в иммунокомпетентном органе селезенке у нормо- и гипертензивных животных. В селезенке у крыс с наследственной артериальной гипертензией НИСАГ было обнаружено снижение экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов TRPM8 и TRPA1. Ранее у крыс НИСАГ было показано снижение уровня мРНК *Trpm8* в гипоталамусе. Не исключено, что снижение экспрессии гена ионного канала TRPM8 у крыс НИСАГ может представлять собой молекулярную основу сниженной чувствительности к ментолу у этих животных, которая ранее была обнаружена в физиологических экспериментах. Охлаждение организма, как и активация периферического (кожного) ионного канала TRPM8 ментолом, приводит к изменениям экспрессии генов *Trpv1* и *Trpa1* в селезенке гипертензивных крыс. Данный факт вызывает особый интерес, так как позволяет приблизиться к пониманию взаимодействия TRP-ионных каналов разной локализации и ответу на вопрос, каким образом активация ионных каналов периферических сенсорных структур влияет на экспрессию генов ионных каналов (и надо полагать, на их количество), локализованных в висцеральных органах.

Полученные данные расширяют знания о представительстве TRP-ионных каналов в иммунокомпетентном органе – селезенке, свидетельствуя об изменении иммунного статуса при артериальной гипертензии, а также о возможном вкладе этих каналов в гипертензивное состояние организма. Участие TRP-ионных каналов в регуляции различных висцеральных функций предполагает их высокий терапевтический потенциал.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента, окончательное утверждение версии манускрипта для публикации (Т. В. К.), сбор и обработка данных (А. А. Е., И. П. В.), написание и редактирование манускрипта (А. А. Е., И. П. В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета НИИ нейронаук и медицины (Новосибирск, Россия). Протокол № 3-О от 18.03.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в отношении публикации данной рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM* (2011) Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension* 57(2): 132–140. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576>
2. *Schiffrin EL* (2013) The immune system: Role in hypertension. *Can J Cardiol* 29(5): 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2012.06.009>
3. *Mian MO, Paradis P, Schiffrin EL* (2014) Innate immunity in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 16(2): 413. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0413-9>

4. *Trott DW, Harrison DG* (2014) The immune system in hypertension. *Adv Physiol Educ* 38(1): 20. <https://doi.org/10.1152/advan.00063.2013>
5. *Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Johnson RJ* (2017) Role of the Immune System in Hypertension. *Physiol Rev* 97(3): 1127–1164. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2016>
6. *Nguyen BA, Alexander MR, Harrison DG* (2024) Immune mechanisms in the pathophysiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol* 20(8): 530–540. <https://doi.org/10.1038/s41581-024-00838-w>
7. *Singh MV, Chapleau MW, Harwani SC, Abboud FM* (2014) The immune system and hypertension. *Immunol Res* 59(1-3): 243–253. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8548-6>
8. *Lu X, Crowley SD* (2022) The Immune System in Hypertension: A Lost Shaker of Salt 2021 Lewis K. Dahl Memorial Lecture. *Hypertension* 79(7): 1339–1347. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.18554>
9. *Rapp JP* (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80: 135–172. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.135>
10. *Ryazanova MA, Plekanchuk VS, Prokudina OI, Makovka YV, Alekhina TA, Redina OE, Markel AL* (2023) Animal Models of Hypertension (ISIAH Rats), Catatonia (GC Rats), and Audiogenic Epilepsy (PM Rats) Developed by Breeding. *Biomedicines* 11(7): 1814. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071814>
11. *Markel AL* (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: *Sassart J, Libbey J* (eds) *Genetic Hypertension*. Colloque INSERM. London. 218: 405–407.
12. *Markel AL, Redina OE, Gilinsky MA, Dymshits GM, Kalashnikova EV, Khvorostova YuV, Fedoseeva LA, Jacobson GS* (2007) Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J Endocrinol* 195: 439–450. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0254>
13. *Цейликман ВЭ, Козочкин ДА, Маркель АЛ, Вязовский ИА, Гиенко ИА, Колесникова АА, Афанасьев ОА, Лифшиц РИ* (2008) Влияние повторных стрессорных воздействий на иммунную реактивность и монооксигеназную активность печени нормотензивных и гипертензивных крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 94(5): 574–580. [*Tseylikman VE, Kozochkin DA, Markel AL, Vyazovsky IA, Gienko IA, Kolesnikova AA, Afanasyev AA, Lifshits RI* (2008) Influence of repeated stress on immune responsiveness and monooxygenase activity of normotensive and hypertensive rats. *Russ J Physiol* 94(5): 574–580. (In Russ)].
14. *Shurlygina AV, Melnikova EV, Panteleeva NG, Tenditnik MV, Dushkin MI, Khrapova MV, Trufakin VA* (2013) Effects of Experimental Desynchronization on the Organs of Immune System in WAG and ISIAH Rats. *Bull Exp Biol Med* 155: 659–662. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2219-9>
15. *Елизеева ЛС* (2005) Особенности иммунных реакций у крыс с наследственной артериальной гипертензией (НИСАГ) в норме и при охлаждении. *Бюл сибирск мед* 4: 99. [*Eliseeva LS* (2005) Features of immune reactions in rats with hereditary arterial hypertension (ISIAH) under normal conditions and during cooling. *Bull Sibirsk Med* 4: 99. (In Russ)].
16. *Kozyreva TV, Eliseeva LS, Khranova GM* (2011) Arterial hypertension changes the effects of cold and calcium on immune response. *J Exp Integr Med* 1(4): 243–248. <https://doi.org/10.5455/jeim.280911.or.013>
17. *Kozyreva TV, Khranova GM, Eliseeva LS* (2012) The influence of TRPM8 ion channel activation on immune response at different temperature conditions. *J Therm Biol* 37: 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.08.005>
18. *Kozyreva TV, Khranova GM, Voronova IP, Evtushenko AA* (2016) The influence of cooling and TRPM8 ion channel activation on the level of pro-inflammatory cytokines in normotensive and hypertensive rats. *J Therm Biol* 61: 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.09.004>
19. *Wang Y, Wang DH* (2006) A novel mechanism contributing to development of Dahl salt-sensitive hypertension: Role of the transient receptor potential vanilloid type 1. *Hypertension* 47: 609–614. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000197390.10412.c4>
20. *Firth AL, Remillard CV, Yuan JX* (2007) TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1772(8): 895–906. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.009>
21. *Menè P, Punzo G, Pirozzi N* (2013) TRP channels as therapeutic targets in kidney disease and hypertension. *Curr Top Med Chem* 13(3): 386–397. <https://doi.org/10.2174/1568026611313030013>
22. *Jesus RLC, Araujo FA, Alves QL, Dourado KC, Silva DF* (2023) Targeting temperature-sensitive transient receptor potential channels in hypertension: Far beyond the perception of hot and cold. *J Hypertens* 41(9): 1351–1370. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003487>
23. *Clapham DE* (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>

24. *Toth BI, Olah A, Szöllosi AG, Biro T* (2014) TRP channels in the skin. *Br J Pharmacol* 171(10): 2568–2581.
<https://doi.org/10.1111/bph.12569>
25. *Wyatt A, Wartenberg P, Candlish M, Krasteva-Christ G, Flockerzi V, Boehm U* (2017) Genetic strategies to analyze primary TRP channel-expressing cells in mice. *Cell Calcium* 67: 91–104.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.009>
26. *Zhang M, Ma Y, Ye X, Zhang N, Pan L, Wang B* (2023) TRP (transient receptor potential) ion channel family: Structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduct Target Ther* 8(1): 261.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>
27. *Yan Q, Gao C, Li M, Lan R, Wei S, Fan R, Cheng W* (2024) TRP Ion Channels in Immune Cells and Their Implications for Inflammation. *Int J Mol Sci* 25(5): 2719.
<https://doi.org/10.3390/ijms25052719>
28. *Jordt SE, McKemy DD, Julius D* (2003) Lessons from peppers and peppermint: The molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* 13(4): 487–492.
[https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00101-6](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00101-6)
29. *Tominaga M, Kashio M* (2024) Thermosensation and TRP Channels. In: Tominaga M, Takagi M (eds) *Thermal Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer. Singapore. 1461.
https://doi.org/10.1007/978-981-97-4584-5_1
30. *Caterina MJ, Pang Z* (2016) TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel)* 9(4): 77.
<https://doi.org/10.3390/ph9040077>
31. *Parenti A, De Logu F, Geppetti P, Benemei S* (2016) What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *Br J Pharmacol* 173(6): 953–969.
<https://doi.org/10.1111/bph.13392>
32. *Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhé V, Plée-Gautier E, Carré JL, Lefeuvre L, Misery L, Le Garrec R* (2017) TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: Pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 8(9): 644–661.
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>
33. *Khalil M, Alliger K, Weidinger C, Yerinde C, Wirtz S, Becker C, Engel MA* (2018) Functional Role of Transient Receptor Potential Channels in Immune Cells and Epithelia. *Front Immunol* 9: 174.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00174>
34. *Schwartz ES, La JH, Scheff NN, Davis BM, Albers KM, Gebhart GF* (2013) TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *J Neurosci* 33: 5603–5611.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1806-12.2013>
35. *McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D* (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416(6876): 52–58.
<https://doi.org/10.1038/nature719>
36. *Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P et al.* (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705–715.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00652-9)
37. *Kozyreva TV, Khranova GM* (2020) Effects of activation of skin ion channels TRPM8, TRPV1, and TRPA1 on the immune response. Comparison with effects of cold and heat exposure. *J Therm Biol* 93: 102729.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102729>
38. *Voronova IP, Tuzhikova AA, Markel AL, Kozyreva TV* (2015) Inherited stress-induced hypertension associates with altered gene expression of thermosensitive TRP ion channels in hypothalamus. *J Exp Integr Med* 5: 149–156.
39. *Voronova IP, Tuzhikova AA, Kozyreva TV* (2013) Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold. *J Therm Biol* 38: 300–304.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2013.03.009>
40. *Evtushenko AA, Voronova IP, Kozyreva TV* (2023) Effect of Long-Term Adaptation to Cold and Short-Term Cooling on the Expression of the TRPM2 Ion Channel Gene in the Hypothalamus of Rats. *Curr Issues Mol Biol* 45(2): 1002–1011.
<https://doi.org/10.3390/cimb45020065>
41. *Evtushenko AA, Orlov IV, Voronova IP, Kozyreva TV* (2024) Functional Changes in Aqp4 Gene Expression in the Rat Hypothalamus under Different Drinking Regimens and Arterial Hypertension. *J Evol Biochem Physiol* 60(2): 734–743.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024020224>
42. *Chomczynski P, Sacchi N* (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 162: 156–159.
<https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>

43. *Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC* (2019) Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* 4(33): eaau6085.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>
44. *Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN* (2001) The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* 107(3): 373–381.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00373-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00373-6)
45. *Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D* (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398(6726): 436–441.
<https://doi.org/10.1038/18906>
46. *Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I* (1999) Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* (3): 165–170.
<https://doi.org/10.1038/11086>
47. *Kowase T, Nakazato Y, Yoko-O H, Morikawa A, Kojima I* (2002) Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. *Endocr J* 49(3): 349–355.
<https://doi.org/10.1507/endocrj.49.349>
48. *Kozyreva TV, Eliseeva LS, Khranova GM, Voronova IP, Evtushenko AA* (2019) TRPM8 ion channel in neuro-immune regulation of antigen binding function of spleen cells. *Trends Med* 19: 3.
<https://doi.org/10.15761/tim.1000191>
49. *Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H* (2006) Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7: 159.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-159>
50. *Inada H, Iida T, Tominaga M* (2006) Different expression patterns of TRP genes in murine B and T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 350(3): 762–767.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.111>
51. *Bertin S, Aoki-Nonaka Y, de Jong PR, Nohara LL, Xu H, Stanwood SR, Srikanth S, Lee J, To K, Abramson L, Yu T, Han T, Touma R, Li X, González-Navajas JM, Herdman S, Corr M, Fu G, Dong H, Gwack Y, Franco A, Jefferies WA, Raz E* (2014) The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 15(11): 1055–1063.
<https://doi.org/10.1038/ni.3009>
52. *Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J* (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25(16): 4052–4061.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005>
53. *Sahoo SS, Majhi RK, Tiwari A, Acharya T, Kumar PS, Saha S, Kumar A, Goswami C, Chattopadhyay S* (2019) Transient receptor potential ankyrin1 channel is endogenously expressed in T cells and is involved in immune functions. *Biosci Rep* 39(9): BSR20191437.
<https://doi.org/10.1042/BSR20191437>
54. *Naert R, López-Requena A, Talavera K* (2021) TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells. *Int J Mol Sci* 22(21): 11460.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111460>
55. *Majhi RK, Sahoo SS, Yadav M, Pratheek BM, Chattopadhyay S, Goswami C* (2015) Functional expression of TRPV channels in T cells and their implications in immune regulation. *FEBS J* 282(14): 2661–2681.
<https://doi.org/10.1111/febs.13306>
56. *Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R* (2003) Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal* 15(3): 299–306.
[https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00086-4)
57. *Yamashiro K, Sasano T, Tojo K, Namekata I, Kurokawa J, Sawada N, Suganami T, Kamei Y, Tanaka H, Tajima N, Utsunomiya K, Ogawa Y, Furukawa T* (2010) Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 398(2): 284–289.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.082>
58. *Kajiya H, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Toh-Goto K, Nakayana S, Okabe K* (2010) RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium* 48(5): 260–269.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.010>
59. *Santoni G, Farfariello V, Liberati S, Morelli MB, Nabissi M, Santoni M, Amantini C* (2013) The role of transient receptor potential vanilloid type-2 ion channels in innate and adaptive immune responses. *Front Immunol* 4: 34.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00034>
60. *Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A* (2003) Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium* 33(5-6): 533–540.
[https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(03)00058-7)
61. *Nagasawa M, Nakagawa Y, Tanaka S, Kojima I* (2007) Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J Cell Physiol* 210(3): 692–702.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20883>

62. *Link TM, Park U, Vonakis BM, Raben DM, Soloski MJ, Caterina MJ* (2010) TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol* 11(3): 232–239. <https://doi.org/10.1038/ni.1842>
63. *Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B* (2007) TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* 3: 174–182. <https://doi.org/10.1038/nchembio862>
64. *Kozyreva TV, Kozaruk VP, Tkachenko EY, Kchramova GM* (2010) Agonist of TRPM8 channel menthol facilitates the initiation of thermoregulatory responses to external cooling. *J Therm Biol* 35: 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.09.004>
65. *Voronova IP, Khranova GM, Evtushenko AA, Kozyreva TV* (2022) Effect of Skin Ion Channel TRPM8 Activation by Cold and Menthol on Thermoregulation and the Expression of Genes of Thermosensitive TRP Ion Channels in the Hypothalamus of Hypertensive Rats. *Int J Mol Sci* 23(11): 6088. <https://doi.org/10.3390/ijms23116088>
66. *Kozyreva TV, Kozaruk VP, Meyta ES* (2019) Effect of the Peripheral *Trpm8* Ion Channel Activation on the Cardiovascular Parameters. *Int Arch Clin Pharmacol* 5: 019. <https://doi.org/10.23937/2572-3987.1510019>
67. *Hanson DF* (1993) Fever and the immune response. The effects of physiological temperatures on primary murine splenic T-cell responses in vitro. *J Immunol* 151: 436–448.
68. *Kozyreva TV, Eliseeva LS* (2000) Immune response in cold exposures of different types. *J Therm Biol* 25(5): 401–404. [https://doi.org/10.1016/s0306-4565\(99\)00113-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4565(99)00113-8)
69. *Castellani JW, M Brenner IK, Rhind SG* (2002) Cold exposure: Human immune responses and intracellular cytokine expression. *Med Sci Sports Exerc* 34(12): 2013–2020. <https://doi.org/10.1097/00005768-200212000-00023>
70. *McFarlin BK, Mitchell JB* (2003) Exercise in hot and cold environments: Differential effects on leukocyte number and NK cell activity. *Aviat Space Environ Med* 74(12): 1231–1236.
71. *Liu C, Yavar Z, Sun Q* (2015) Cardiovascular response to thermoregulatory challenges. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(11): 1793–1812. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00199.2015>
72. *Casas ALF, Santos GMD, Chiochetti NB, de Andrade M* (2016) Effects of Temperature Variation on the Human Cardiovascular System: A Systematic Review. In: *Leal FW, Azeiteiro U, Alves F* (eds) *Climate Change and Health. Climate Change Management*. Springer. Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24660-4_5
73. *Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN* (2009) TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: Interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* 29: 1568–1578. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06702.x>
74. *Patil MJ, Jeske NA, Akopian AN* (2010) Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca²⁺. *Neuroscience* 171: 1109–1119. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.031>
75. *Andrei SR, Sinharoy P, Bratz IN, Damron DS* (2016) TRPA1 is functionally co-expressed with TRPV1 in cardiac muscle: Co-localization at z-discs, costameres and intercalated discs. *Channels (Austin)* 10(5): 395–409. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1185579>
76. *Wang C, Jin X, Zhang Q, Wang H, Ji H, Zhou Y, Zhu C, Yang Y, Yu G, Tang Z* (2023) TRPV1 and TRPA1 channels interact to mediate cold hyperalgesia in mice. *Br J Anaesth* 131(5): e167–e170. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2023.08.010>
77. *Xu H, Blair NT, Clapham DE* (2005) Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 25: 8924–8937. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2574-05.2005>
78. *Xiao B, Dubin AE, Bursulaya B, Viswanath V, Jegla TJ, Patapoutian A* (2008) Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci* 28: 9640–9651. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2772-08.2008>
79. *Takaishi M, Uchida K, Suzuki Y, Matsui H, Shimada T, Fujita F, Tominaga M* (2016) Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. *J Physiol Sci* 66(2): 143–155. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0427-y>
80. *Nguyen THD, Itoh SG, Okumura H, Tominaga M* (2021) Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on TRP channels. *Commun Biol* 4(1): 293. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01776-0>
81. *Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM* (2006) More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32: 335–343.

82. *Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B* (2007) Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 27: 9874–9884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2221-07.2007>
83. *Zhang Z, Wu X, Zhang L, Mao A, Ma X, He D* (2020) Menthol relieves acid reflux inflammation by regulating TRPV1 in esophageal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 17: S0006-291X(20)30318-1. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.050>
84. *Chung MK, Wang S* (2011) Cold suppresses agonist-induced activation of TRPV1. *J Dent Res* 90: 1098–1102. <https://doi.org/10.1177/0022034511412074>
85. *Wang S, Lee J, Ro JY, Chung MK* (2012) Warmth suppresses and desensitizes damage-sensing ion channel TRPA1. *Mol Pain* 8: 22. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-22>
86. *Harrington AM, Hughes PA, Martin CM, Yang J, Castro J, Isaacs NJ, Blackshaw AL, Brierley SM* (2011) A novel role for TRPM8 in visceral afferent function. *Pain* 152(7): 1459–1468. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.01.027>
87. *Yamaguchi T, Uchida K, Yamazaki J* (2023) Canine, mouse, and human transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels show different sensitivity to menthol or cold stimulation. *J Vet Med Sci* 85(12): 1301–1309. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0327>

Thermosensitive TRP-Ion Channels Gene Expression in the Spleen in Normo- and Hypertensive Rats. Effect of the Cold and the Peripheral TRPM8 Ion Channel Activation

A. A. Evtushenko^{a,*}, I. P. Voronova^a, and T. V. Kozyreva^a

^a*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

^{*}*e-mail: evtushenkoaa@neuronm.ru*

Arterial hypertension leads to changes in the functioning of various organism systems, including the immune system. TRP-ion channels are increasingly attracting attention as targets for the correction of visceral organs, including for therapeutic purposes. The gene expression of the thermosensitive TRP-ion channels (TRPM8, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 and TRPV4) was studied in the immunocompetent organ, the spleen, using quantitative RT-PCR in normotensive and hypertensive animals under normal conditions, during cooling, and stimulation of the peripheral cold-sensitive ion channel TRPM8. The investigated genes express differently in the spleen of animals of both lines. The expression of cold-sensitive ion channel genes TRPM8 and TRPA1 is reduced in the spleen of hypertensive rats. This is consistent with obtained data on the decrease expression of the TRPM8 ion channel gene in the hypothalamus of hypertensive animals. Deep cooling of the organism, as well as activation of the peripheral (cutaneous) TRPM8-ion channel by menthol, lead to increase expression of the TRPA1 and TRPV1 ion channels genes in the spleen of hypertensive rats, without affecting the expression of genes in normotensive animals. Considering that the ion channels TRPA1 and TRPV1 are involved in inflammation processes, this may indicate a change in the nature of inflammatory reactions in hypertensive animals when organism is exposed to cold. The obtained data expand knowledge about the representation of thermosensitive TRP-ion channels in immunocompetent organs and may indicate a change in the immune status of organism with arterial hypertension.

Keywords: TRP-ion channels, gene expression, spleen, cold, TRPM8 activation, hypertension