

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.822+615.21+591.18+591.513

САЛИФЕН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ВЫЗВАННЫЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ
ГИПОКСИЕЙ НАРУШЕНИЯ СПОСОБНОСТИ К ОБУЧЕНИЮ
И ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГАМК_B-РЕЦЕПТОРОВ
В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС

© 2023 г. В. И. Миронова¹, А. В. Притворова¹ *, В. К. Акулова¹, В. А. Михайленко¹,
В. А. Отеллин¹, Л. И. Хожай¹, Н. Э. Ордян¹

¹ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: pritvorovaav@infran.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

В работе изучали последствия воздействия острой нормобарической гипоксии в раннем постнатальном периоде развития (2-е постнатальные сутки) на способность к обучению и экспрессию ГАМК_B-рецепторов в неокортексе (медиальной префронтальной коре) крыс adolescentного возраста (55–60-е постнатальные сутки), а также возможность коррекции выявленных нарушений отечественным препаратом салифеном – производным ГАМК. Показано, что перинатальная гипоксия ухудшает формирование и сохранение памятного следа в тестах “распознавание нового объекта” и “условный рефлекс пассивного избегания”, а также снижает способности к пространным обучению в тесте “водный лабиринт Морриса”. Анализ результатов Вестерн-блоттинга показал увеличение количества белка ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной области неокортекса крыс, подвергавшихся перинатальной гипоксии. Введение салифена в течение 14 суток после гипоксического воздействия в дозе 15 мг/кг улучшало когнитивные способности крыс, а также нормализовало уровень экспрессии белка ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной коре крыс. Результаты данного исследования представляют интерес для решения прикладной задачи неонатологии – поиска эффективных средств для фармакологической коррекции последствий перинатальной гипоксии.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, ГАМК_B-рецепторы, медиальная префронтальная кора, память и обучение, салифен, крысы Вистар

DOI: 10.31857/S0044467723040081, EDN: WHMWYZ

Пренатальное развитие – критически важный период формирования структур мозга, вовлеченных в когнитивные функции, включая память и обучение. Любые нарушения этого процесса могут привести к изменению функционирования нейронных сетей, имеющему долгосрочные последствия (Babenko et al., 2015; Desplats, 2015). Наиболее частой причиной патологии развития головного мозга является гипоксия-ишемия плода и новорожденного (Пальчик, Шабалов, 2006). К настоящему времени накоплен большой массив данных в клинической практике и фундаментальной науке о последствиях гипоксии/ишемии плода и новорожденного, включающих чрезвычайно широкий спектр

нарушений структуры и функций головного мозга, которые проявляются в виде моторных, психических и когнитивных отклонений в последующем онтогенезе и определяются как перинатальная энцефалопатия (Володин и др., 2001; Семченко и др., 1999; Nalivaeva et al., 2018; Zhuravin et al., 2019). Понимание механизмов формирования патологических состояний развивающегося мозга вследствие перенесенной перинатальной гипоксии важно для разработки стратегий фармакотерапии данных аномалий развития, поскольку в настоящее время в реестре лекарственных препаратов отсутствуют средства для фармакологической коррекции структурных повреждений мозга, являющихся последствием воздействия гипоксии в

ранний послеродовой период. Исследования в моделях на животных дают бесспорные преимущества для решения этой задачи.

Установлено, что перинатальная гипоксия провоцирует пролонгированную гибель нейронов и последующее сокращение численности популяций нейронов в разных областях неокортекса (Моргун и др., 2013; Отеллин и др., 2012; Nalivaeva et al., 2018; Northington et al., 2011; Реѣа, Ramirez, 2005), причем особо уязвима к гипоксии популяция ГАМК-ергических нейронов (Хожай, Отеллин, 2014; Louzoun-Kaplan et al., 2008; Nisimov et al., 2018; Robinson et al., 2006). В развивающемся мозге γ -аминомасляная кислота (ГАМК) является основным нейромедиатором, а ГАМК-ергическая трансмиссия играет принципиальную роль в регуляции нейро- и синаптогенеза на ранних стадиях развития (Gaiarsa et al., 2011; Gozlan, Ben-Ari, 2003; Wu, Sun, 2015). Полагают, что спровоцированное гипоксией нарушение ГАМК-ергической трансмиссии в развивающемся мозге может являться одной из причин неврологических отклонений в детском возрасте и впоследствии, во взрослой жизни (Robinson et al., 2006; Van de Berg et al., 2003).

ГАМК реализует свои эффекты через активацию ионотропных ГАМК_A/ГАМК_C- и метаботропных ГАМК_B-рецепторов (Bettler et al., 2004; Macdonald, Olsen, 1994). В последние годы особое внимание уделяется изучению роли так называемых медленных метаботропных ГАМК_B-рецепторов в механизмах памяти и обучения и при нарушении этих процессов, в том числе в результате перинатальной гипоксии (Enna, Bowery, 2004; Heaney, Kinney, 2016; Kumar et al., 2013), а также в связи с разработкой методов фармакологической коррекции постгипоксических повреждений мозга новорожденных. Нарушения функции/активности ГАМК_B-рецепторов сопровождаются значительным числом неврологических и психиатрических расстройств, а сами рецепторы рассматриваются как мишень для разработки терапевтических подходов к лечению широкого спектра нарушений структуры и функций головного мозга различного генеза (Fritzius, Bettler, 2020; Heaney, Kinney, 2016). Исследования роли ГАМК_B-рецепторов в когнитивных процессах отличает крайняя противоречивость полученных данных, однако все авторы сходятся во мнении, что надлежащее функционирование ГАМК_B-рецепторов — необходимый компонент обучения.

Реакции ГАМК_B-рецепторов на воздействие гипоксии исследованы крайне мало и в основном в гиппокампе, а работы, посвященные изучению роли кортикальных ГАМК_B-рецепторов в постгипоксических нарушениях мозга, в мировой литературе единичны.

В наших предыдущих исследованиях воздействия перинатальной гипоксии на мозг лабораторных животных был обнаружен нейротропный эффект нового отечественного препарата салифена (Миронова и др., 2019; Отеллин и др., 2016), разработанного на кафедре органической химии Российского педагогического университета им. А.И. Герцена (Васильева и др., 2018). Салифен представляет собой производное ГАМК, композицию γ -амино- β -фенилмасляной (фенибута) и салициловой кислот, является агонистом ГАМК_B-рецепторов и заявлен как “средство, сохраняющее популяцию ГАМК-ергических нейронов после острой перинатальной гипоксии” (Васильева и др., 2018, Lapin, 2001). Также было продемонстрировано корректирующее действие препарата на рефлекторную деятельность и стрессорное поведение крыс, подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии (Ордян и др., 2017, 2019). В настоящей работе мы продолжили исследование эффектов салифена в разработанной нами модели энцефалопатии новорожденных, являющейся следствием воздействия гипоксии в ранний постнатальный период развития.

Целью данной работы было изучение воздействия острой перинатальной гипоксии и последующего применения салифена на когнитивные процессы (память и обучение) и содержание ГАМК_B-рецепторов в образцах нервной ткани неокортекса (медиальной префронтальной коре) у крыс адолесцентного возраста (55–60 дней).

МЕТОДИКА

Работа выполнена на крысах линии Вистар из коллекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, содержащихся в стандартных условиях вивария без ограничения в доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протоколы опытов были утверждены Комиссией

Таблица 1. Протокол эксперимента
Table 1. The research design

Экспериментальные группы	Постнатальные сутки			
	2	3–16	55	60
Серия 1:		Инъекции:	} Распознавание нового объекта	} УРПИ
Контроль ($n = 6$)	-----	физраствора		
Гипоксия ($n = 6$)	Гипоксия (1 ч)	физраствора		
Гипоксия + салифен ($n = 6$)	Гипоксия (1 ч)	салифена		
Серия 2:		Инъекции:	} Тест Морриса	
Контроль ($n = 8$)	-----	физраствора		
Гипоксия ($n = 8$)	Гипоксия (1 ч)	физраствора		
Гипоксия + салифен ($n = 8$)	Гипоксия (1 ч)	салифена		
Серия 3:		Инъекции:	} Вестерн-блоттинг	
Контроль ($n = 6$)	-----	физраствора		
Гипоксия ($n = 6$)	Гипоксия (1 ч)	физраствора		
Гипоксия + салифен ($n = 6$)	Гипоксия (1 ч)	салифена		

по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Перинатальная гипоксия. Для изучения воздействия острой перинатальной гипоксии на развивающийся мозг ранее нами была разработана клинически и физиологически обоснованная модель энцефалопатии новорожденных с учетом особенностей недоношенных детей (Отеллин и др., 2012, 2015), поскольку степень развития головного мозга двухдневных крысят, подвергавшихся гипоксии в наших экспериментах, по структурно-функциональным показателям соответствует уровню развития мозга у недоношенных детей (Clancy et al., 2001). Непосредственно после рождения число крысят в помете выравнивали, оставляя по 8–10 крысят. В возрасте 2-го постнатального дня крысят случайным образом отбирали из разных пометов в 3 группы по 6–8 животных:

– крысята, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии и получавшие подкожные инъекции салифена через сутки после воздействия гипоксии в терапевтической дозе 15 мг/кг в течение 14 дней (группа “гипоксия + салифен”);

– крысята, подвергавшиеся аналогичному гипоксическому воздействию, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме в те же сроки, что и салифен (группа “гипоксия”);

– контрольная группа крысят, которых помещали в барокамеру без гипоксического воздействия на 1 ч, а через сутки вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме в течение 14 дней (группа “контроль”).

Протокол эксперимента представлен в табл. 1. Крысята подвергались воздействию нормобарической гипоксии в барокамере, куда подавалась газовая смесь, содержащая 7.6–7.8% кислорода, 0.15–0.21% углекислого газа, 91.8% азота, при температуре 21.3–23.0°C и нормальном атмосферном давлении (760 мм рт. ст.), как было описано ранее (Отеллин и др., 2012). Длительность воздействия составляла 1 ч. Эксперименты выполнены на самцах. Субстанция салифена любезно предоставлена чл.-корр. РАН И.Н. Тюренковым (Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград). Доза препарата выбрана по результатам предшествующих экспериментальных исследований (Миронова и др., 2019; Отеллин и др., 2016; Тюренков и др., 2012).

Тестирование когнитивных функций проводили у крыс в возрасте 55–60 дней, что соответствует adolescentному периоду развития. Формирование долговременной памяти оценивали в тестах “распознавание нового объекта” и “условный рефлекс пассивного избегания” (УРПИ).

Распознавание нового объекта. Тест основан на естественном стремлении грызунов исследовать новое, используется для исследования внимания, измеряет способность животного обнаруживать изменение в физических свойствах объекта или в его пространственном расположении (Antunes, Biala, 2012). В первый день теста крысу помещали в камеру размером $90 \times 90 \times 50$ см и непрозрачными стенками и в течение 5 мин позволяли исследовать камеру, регистрацию параметров не осуществляли. На следующий день в центре камеры были размещены два одинаковых объекта (A1 и A2) на расстоянии 20 см друг от друга. Крысу помещали на 5 мин в камеру и фиксировали время исследования животным каждого объекта. Через 24 ч знакомый объект (A1) заменяли на новый (B1) и тестирование повторяли. В качестве предъявляемых объектов использовали пирамиды (знакомый объект, A1 и A2) и куб (новый объект, B1). Фиксировали время, затраченное животным на исследование знакомого и нового объекта. Исследованием объекта считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта. Полученные результаты выражались в индексе распознавания (ИР), отражающем отношение времени исследования нового объекта к суммарному времени исследования нового и знакомого объектов. ИР рассчитывался по формуле
$$\text{ИР} (\%) = \left(\frac{N}{N + F} \right) \times 100,$$
 где N – время (с) исследования нового объекта (B1), F – время исследования известного объекта (A1). Уменьшение ИР расценивали как ухудшение когнитивных процессов, поскольку в норме грызуны проводят больше времени рядом с новым объектом, а равное время исследования нового и знакомого объектов свидетельствует о когнитивном дефиците.

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Камера для выработки УРПИ состояла из двух отсеков, разделенных отверстием с дверцей: светлого (50×50 см) и темного (15×15 см) с электрифицированным полом (Буреш и др., 1991). Перед началом эксперимента животные привыкали к экспериментальной установке в течение 3 дней. На стадии обучения (обусловливания) крысу помещали в светлый отсек, который животное стремилось покинуть в силу врожденного предпочтения грызунами темных и закрытых участков пространства. Сразу же после перехода крысы в темный отсек камеры дверца закрывалась, а животное получало удар током (сила тока 1 мА, частота

50 Гц) длительностью 5 с. Затем животное возвращалось в домашнюю клетку. Воспроизведение УРПИ тестировали через 24 ч после обучения. Для этого крысу вновь помещали в светлый отсек и фиксировали латентный период входа животного в темный отсек камеры. Длительность тестирования составляла 3 мин.

Водный лабиринт Морриса. Способность к пространственному обучению животных анализировали в водном лабиринте Морриса. Мы применяли одну из модификаций теста (Буткевич, Михайленко, 2017; Левина и др., 2018; Vorhees, Williams, 2006). Водный лабиринт представлял собой бассейн диаметром 120 см и высотой 50 см, заполненный водой до уровня 35 см. Температуру воды в бассейне поддерживали на уровне $22 \pm 3^\circ\text{C}$. В бассейне находилась прозрачная платформа диаметром 10 см, скрытая под водой на глубине 1 см. Бассейн был условно разделен на квадранты. В качестве визуальных ориентиров выступали элементы обстановки экспериментального помещения, положение которых оставалось стабильным на протяжении всего времени исследования. Каждая крыса обучалась поиску скрытой платформы, находящейся в одном из квадрантов бассейна. Положение платформы не менялось, точки старта располагались в остальных трех квадрантах, порядок варьировали случайным образом. Эксперименты по пространственному обучению проводили в течение 4 дней. Крыс опускали в воду в одной из стартовых точек по периметру бассейна, выбранных таким образом, чтобы расстояние от них до платформы было приблизительно равным. Регистрировали время нахождения скрытой платформы (латентный период, с). Если крыса была неспособна найти платформу в течение 60 с, она помещалась на платформу принудительно на 20 с. В этом случае латентный период принимали за 60 с. Первые четыре попытки с перерывом между ними в 15 с составляли первый тест. Следующий второй аналогичный тест предъявлялся крысе через четыре мин отдыха в сухой клетке. Анализировали средний латентный период поиска платформы по сумме двух тестов в течение 4 дней обучения.

Вестерн-блоттинг. Уровень белка ГАМК_B-рецепторов в неокортексе определяли методом Вестерн-блоттинга. Животных декапитировали на 55-й постнатальный день, извлекали мозг из черепной коробки, выделяли на льду ткань неокортекса. Образцы содержали медиальную префронталь-

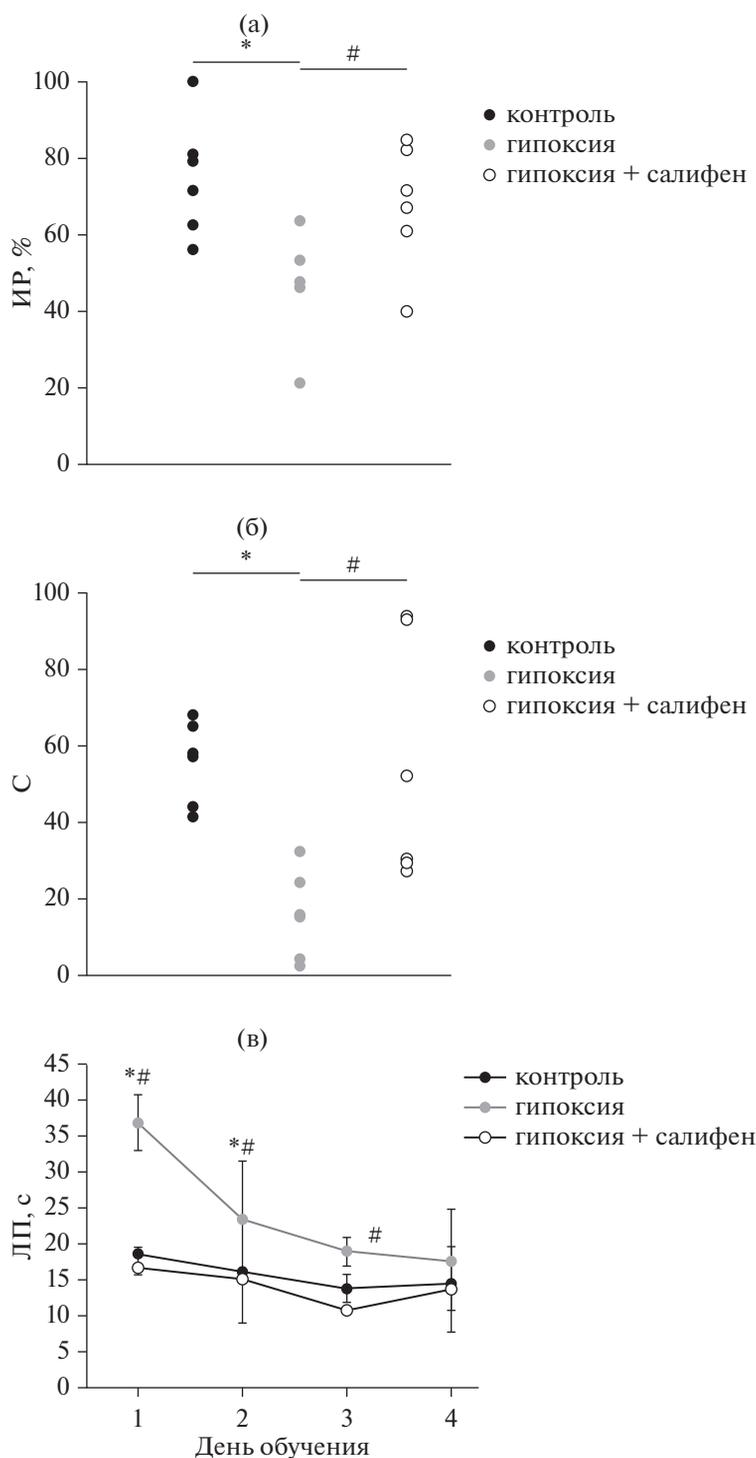
ную кору, включая цингулярную, пре- и инфраламбическую области (Bregma 4.20–2.52 мм) (Paxinos and Watson, 2007). Материал гомогенизировали в десятикратном объеме лизирующего буфера (0.02 M TRIS, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (Roche Diagnostic, Канада) согласно инструкции производителя. Подготовленные гомогенаты центрифугировали 20 мин при 4°C и 12000 g. Общую концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури. Индивидуальные пробы, содержащие одинаковое количество белка (20 мкг), смешивали с буфером Лэммли, после чего белок денатурировали путем нагрева до 95°C в течение 5 мин. Разделение белков проходило с помощью метода гель-электрофореза в 10%-м бис-АА-акриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE) на оборудовании Bio-Rad Laboratories (США) с использованием маркера молекулярной массы (Bio-Rad Precision Plus Protein, США). Белковые фракции из геля электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) в течение 1 часа. После переноса мембрану инкубировали в течение 30 минут в блокирующем растворе (сухое молоко, разведенное в Трис-буфере с 0.1% Tween-20, pH 7.6). После блокировки мембрану инкубировали в течение ночи при 4°C в растворе первичных антител, разведенных в блокирующем растворе. Поскольку считается, что субъединица V1 ГАМК_B-рецептора важна для лиганд-рецепторного взаимодействия (Galvez et al., 2001), мы использовали поликлональные кроличьи антитела к ГАМК_{B1}-субъединице для определения содержания ГАМК_B-рецепторов в образцах нервной ткани неокортекса крыс (1 : 1000; Abscam, Великобритания). После тщательной промывки мембраны инкубировали 1 ч в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой хрена, разведенных в блокирующем растворе (1 : 5000, Sigma, США). Визуализацию белков проводили с помощью хемилюминесцентной системы ECL-Prime и рентгеновской пленки (Retina, США), которую проявляли фотонабором (Cargestream Health, Франция). Пленки сканировали с помощью фотосканера CanoScan 8800F, полученные изображения анализировали с помощью программы Image J, оценивая оптиче-

скую плотность полос для белка ГАМК_B-рецепторов. Результаты определения уровня экспрессии исследованного вещества были нормированы на общее содержание белка. Данные представлены в относительных единицах – в процентах по отношению к контрольному значению, которое принято за 100%.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, пакет программ STATISTICA 8.0) с предварительной проверкой совокупностей на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка и последующими попарными апостериорными сравнениями групп между собой с помощью post-hoc-критерия Бонферрони. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После перенесенной на 2-й постнатальный день острой гипоксии у крыс adolescentного возраста (55–60-й постнатальный день) обнаружены нарушения формирования долговременной памяти и ухудшение пространственного обучения, что было выявлено в тестах “распознавание нового объекта”, “УРПИ” и “водный лабиринт Морриса”. Однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние фактора воздействия гипоксии на индекс распознавания в тесте “распознавание нового объекта” ($F_{(2,15)} = 11.42$, $p = 0.007$). Крысы, подвергнутые перинатальной гипоксии, в одинаковой мере исследовали знакомый и новый объекты во второй день теста, что отразилось в сниженном индексе распознавания по сравнению с контрольными животными ($p < 0.01$). Это свидетельствует об ухудшении когнитивных процессов (рис. 1 (а)). У крыс, подвергавшихся гипоксии на 2-е постнатальные сутки, выявлено нарушение способности к воспроизведению УРПИ. Дисперсионный анализ показал значимый эффект воздействия гипоксии на латентный период входа в темный отсек камеры ($F_{(2,15)} = 38.19$, $p = 0.0001$). Последующие post-hoc-сравнения отдельных групп животных выявили значимые различия между группами “гипоксия” и “контроль” ($p < 0.01$). Крысы, подвергавшиеся гипоксии, демонстрировали меньший латентный



период входа в темный отсек камеры по сравнению с контрольными, что свидетельствует о нарушении у них формирования долговременной памяти (рис. 1 (б)). После воздействия перинатальной гипоксии у крыс подросткового возраста обнаружены нарушения способности к пространственному обучению в

водном лабиринте Морриса (рис. 1 (в)). Однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние воздействия перинатальной гипоксии на латентный период поиска скрытой платформы ($F_{(2,21)} = 15.74, p = 0.0014$). Средний латентный период поиска скрытой платформы по сумме 1-го и 2-го испытаний

Рис. 1. Влияние острой перинатальной гипоксии и инъекций салифена на фоне острой перинатальной гипоксии на когнитивные функции adolescentных крыс. (а) — индекс распознавания в тесте “распознавание нового объекта”; (б) — латентный период входа в темный отсек камеры для выработки УРПИ через 24 ч после обучения, с; (в) — кривые обучения в тесте “водный лабиринт Морриса”, с. Данные о времени нахождения платформы усреднены для четырех попыток в двух тестах каждого дня обучения и представлены в виде средних по группе и стандартных ошибок средних. * — значимые различия между группами “контроль” и “гипоксия”, $p < 0.05$; # — значимые различия между группами “гипоксия” и “гипоксия + салифен”, $p < 0.05$.

Fig. 1. Effects of acute perinatal hypoxia and salifen injections following acute perinatal hypoxia on cognitive functions in adolescent rats. (a) — recognition index in the novel object recognition test; (б) — latency to step into the darkened chamber in the passive avoidance task 24 hours after the acquisition phase, s; (в) — learning curves in the “Morris water maze”, s. Data from 4 trials in 2 tests of each training day are averaged and presented as group mean + S. E. M. * — significant difference, $p < 0.05$ for “control” versus “hypoxia” groups; # — significant difference, $p < 0.05$ for “hypoxia” versus “hypoxia + salifen” groups.

был значительно повышен у крыс, подвергавшихся гипоксии, по сравнению с контрольными животными ($p < 0.01$).

Введение салифена оказало положительное влияние на долговременную память и пространственное обучение крыс, подвергнутых гипоксическому воздействию в перинатальный период развития. Во всех использованных тестах (УРПИ, распознавание нового объекта, водный лабиринт Морриса) эти животные по исследованным параметрам когнитивной деятельности практически не отличались от контрольных животных (рис. 1 (а–в)), при этом post-hoc-анализ выявил значимые различия между группами “гипоксия” и “гипоксия + салифен” ($p < 0.01$).

Однофакторный дисперсионный анализ показал значимый эффект воздействия перинатальной гипоксии на уровень белка ГАМК_B-рецептора в медиальной префронтальной коре adolescentных крыс ($F_{(2,15)} = 17.72$, $p = 0.002$). Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют повышение экспрессии белка ГАМК_B-рецептора в медиальной префронтальной области неокортекса крыс adolescentного возраста (55-й постнатальный день), подвергавшихся перинатальной гипоксии на 2-й день жизни, в сравнении с интактными животными на 35% ($p < 0.01$). Инъекции салифена на фоне перинатальной гипоксии снижали уровень белка ГАМК_B-рецептора в неокортексе животных до контрольных значений (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предполагается, что нарушение ГАМК_B-рецепторного сигналинга в мозге является триггером многих неврологических и психиатрических расстройств (Fritzius, Bettler, 2020; Terunuma, 2018). При этом роль ГАМК_B-рецепторов в

постгипоксическом повреждении структуры и функций мозга исследована мало и активно изучается в настоящее время. Проведенное нами исследование показало, что острая перинатальная гипоксия вызывает повышение экспрессии белка ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной области неокортекса adolescentных крыс, сопровождающееся нарушением когнитивных функций. Хроническое введение производного ГАМК салифена предотвращало вызванные гипоксией изменения пула ГАМК_B-рецепторов медиальной префронтальной коры и когнитивную дисфункцию у крыс.

ГАМК_B-рецепторы представляют собой метаботропные гетеродимерные трансмембранные белки, сопряженные с G-белками и обеспечивающие медленное продолжительное синаптическое торможение в центральной нервной системе (Bettler et al., 2004; Frangaj, Fan, 2018). ГАМК_B-рецепторы могут располагаться как пре-, так и постсинаптически, обеспечивая регуляцию процессов возбуждения и торможения в нейронных контурах (Koulen et al., 1998). Пресинаптические ГАМК_B-рецепторы делятся на ауторецепторы, располагающиеся на ГАМК-ергических терминалях, и гетерорецепторы — на терминалях, выделяющих другие медиаторы: глутамат, ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин (Kobayashi et al., 2012; Waldmeier et al., 2008). Блокируя выброс различных нейромедиаторов, ГАМК_B-рецепторы могут осуществлять как тормозные, так и возбуждающие эффекты на уровне нейронных контуров. В нашем эксперименте перинатальная гипоксия вызывала увеличение экспрессии ГАМК_B-рецепторов в неокортексе крыс и, как следствие, можно предположить усиление торможения выброса возбуждающих нейромедиаторов, и в первую

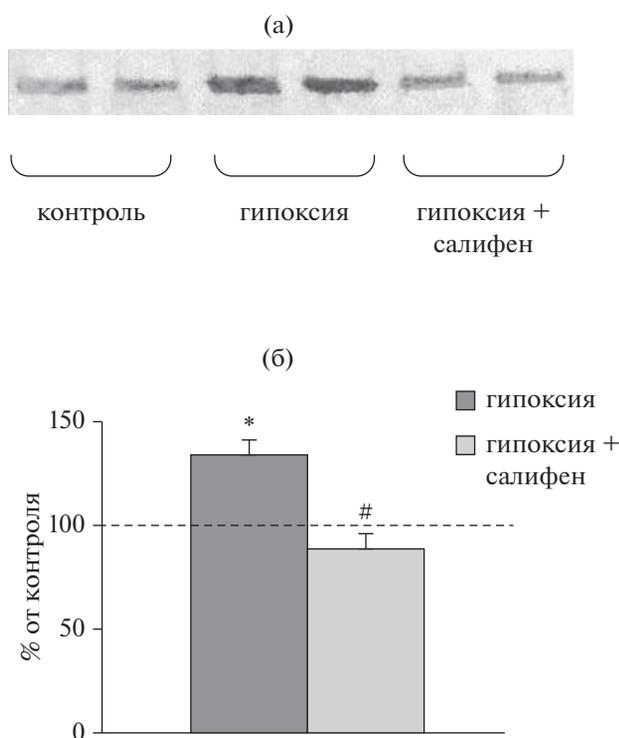


Рис. 2. Влияние острой перинатальной гипоксии и инъекций салифена на фоне острой перинатальной гипоксии на уровень белка ГАМК_B-рецептора в медиальной префронтальной коре adolescentных крыс. (а) — образец вестерн-блотта; (б) — количественная обработка результатов вестерн-блоттинга, условные единицы оптической плотности. Данные представлены в % от контрольных значений. Пунктирная линия — контроль (100%). * — значимые различия между группами “контроль” и “гипоксия”, $p < 0.05$; # — значимые различия между группами “гипоксия” и “гипоксия + салифен”, $p < 0.05$.

Fig. 2. Effect of acute perinatal hypoxia and salifen injections following acute perinatal hypoxia on GABA_B receptor protein levels in medial prefrontal cortex of adolescent rats. (a) — representative image of western-blot; (б) — quantification of the data, conventional units of optical density scale. Data are shown as a percentage of control levels. The dotted line — control group (100%). * — significant difference, $p < 0.05$ for “contro” versus “hypoxia” groups; # — significant difference, $p < 0.05$ for “hypoxia” versus “hypoxia + salifen” groups.

очередь глутаматергической трансмиссии, поскольку показано, что для неокортекса характерно постсинаптическое расположение ГАМК_B-рецепторов, при этом большинство ГАМК_B-рецепторов располагается на глутаматергических синапсах (Chalifoux, Carter, 2011; Kasten, Boehm, 2015; Rose, Wickman, 2020). Параллельно животные, подвергавшиеся гипоксии, демонстрировали ухудшение когнитив-

ных функций. Следует заметить, что в процессах консолидации памяти в тестах “УРПИ”, “водный лабиринт Морриса” и “распознавание нового объекта” важную роль играет медиальная префронтальная кора (Akirav, Maroun, 2006; Sutherland et al., 1982; Zhang et al., 2011). Известно, что префронтальные отделы неокортекса наряду с гиппокампом играют существенную роль в интегративной деятельности мозга, связанной с обучением и памятью (Euston et al., 2012; Jones, 2002; Morici et al., 2015). Показано, что вызванные гипоксией повреждения префронтальной коры вызывают нарушения обучения и памяти (Силачев и др., 2008; Kauser et al., 2014). Эти нарушения связывают в первую очередь с гибелью нейронов, в особенности ГАМК-ергических (Louzoun-Kaplan et al., 2008; Nisimov et al., 2018; Robinson et al., 2006), однако роль рецепторного звена ГАМК-ергической системы префронтальных отделов неокортекса в вызванных гипоксией когнитивных нарушениях практически не исследована, особенно это касается воздействия перинатальной гипоксии. В нашем исследовании животные после перенесенной в раннем онтогенезе гипоксии демонстрировали ухудшение показателей когнитивной деятельности в тестах “УРПИ”, “распознавание нового объекта” и водном лабиринте Морриса, что предполагает нарушение функции медиальной префронтальной коры, как один из возможных механизмов когнитивной дисфункции. Мы изучали вовлечение в нарушение обучения и памяти, вызванных перинатальной гипоксией, ГАМК_B-рецепторов медиальной префронтальной области неокортекса у крыс.

О важности ГАМК_B-рецепторов для процессов обучения и памяти говорят исследования на нокаутных животных: “выключение” гена субъединицы ГАМК_{B1} и/или ГАМК_{B2} вызывает существенные нарушения когнитивных функций (Heaney, Kinney, 2016; Jurado-Parras et al., 2016; Schuler et al., 2001). Блокада ГАМК_B-рецепторов улучшает когнитивные функции у приматов и крыс, очевидно, посредством облегчения глутаматергической и холинергической нейротрансмиссии (Almasi et al., 2018; Vanuelos et al., 2014; Kleschevnikov et al., 2012; Li et al., 2016), тогда как чрезмерная стимуляция ГАМК_B-рецепторов подавляет когнитивное поведение у лабораторных животных, что было показано в различных тестах и моделях (DeSousa et al., 1994; Heaney, Kinney, 2016; Terunuma et al.,

2014). Обнаруженное нами в настоящем исследовании ухудшение показателей в тестах, оценивающих способность запоминать и воспроизводить информацию, и параллельное увеличение экспрессии ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной коре крыс после перинатальной гипоксии вполне согласуются с этими данными.

В различных моделях гипоксии/ишемии *in vivo* и *in vitro* были получены противоречивые результаты оценки экспрессии ГАМК_B-рецепторов в разных областях мозга. На переживающих срезах гиппокампа было показано, что гипоксия/ишемия снижала экспрессию субъединицы ГАМК_{B2}, а уровень экспрессии субъединицы ГАМК_{B1} не изменялся (Cimarosti et al., 2009). В модели гипоксии/ишемии *in vivo* продемонстрировано снижение экспрессии обеих субъединиц в гиппокампе половозрелых грызунов (Vollenweider et al., 2006) и неокортексе 4-дневных крысят (Anju et al., 2010). Однако в модели ишемического очага в сенсомоторной области неокортекса крыс, вызванного фототромбозом кровеносных сосудов, показано повышение плотности ГАМК_B-рецепторов вокруг зоны поражения (Que et al., 1999). Противоречия в данных о воздействии гипоксии/ишемии на экспрессию ГАМК_B-рецепторов в мозге авторы объясняют различными моделями, возрастом экспериментальных животных, разными временными отрезками после гипоксии/ишемии, а также интерпретируют результаты с позиций компенсаторного или патологического процесса. В литературе высказывается мысль, что зачастую невозможно определить, являются ли изменения в функции, экспрессии и связывании ГАМК_B-рецепторов, сопутствующие заболеванию, отражением патологического или компенсаторного процесса и, в зависимости от этого, усиление или ослабление этих модификаций может способствовать успешной терапии. Несмотря на эти ограничения, анализ активности ГАМК_B-рецепторного пула отделов мозга при различных условиях может дать важную информацию для поиска новых терапевтических стратегий лечения неврологических и психиатрических заболеваний. Высказываются предположения, что препараты, модулирующие активность ГАМК_B-рецепторов, имеют терапевтический потенциал для лечения широкого спектра психических и неврологических отклонений. Эта группа препара-

тов находится в фокусе внимания ученых и медиков в настоящее время.

Мы изучали влияние отечественного препарата салифена, производного ГАМК, на нарушения когнитивных процессов и изменения экспрессии белка ГАМК_B-рецепторов в неокортексе, являющиеся следствием перенесенной острой перинатальной гипоксии. У крыс, получавших инъекции салифена после гипоксического воздействия, результаты тестов “УРПИ” и “распознавание нового объекта”, оценивающих формирование долговременной памяти, а также теста “водный лабиринт Морриса”, оценивающего пространственное обучение, не отличались от показателей контрольных групп. Количество белка ГАМК_B-рецептора в медиальной префронтальной области неокортекса животных из группы “перинатальная гипоксия + салифен” также не отличалось от контрольных значений. Ранее было показано, что салифен и его аналоги оказывают нейропротективное действие в моделях фокальной церебральной ишемии (Vavers et al., 2016) и энцефалопатии новорожденных (Отеллин и др., 2016, 2020), а в последнем случае – для ГАМК-нейронов неокортекса. Нейропротективный эффект активации ГАМК-ергической трансмиссии в различных отделах мозга в условиях гипоксии описан и в мировой литературе: в моделях гипоксии/ишемии *in vivo* и *in vitro* показан нейропротективный эффект применения агонистов ГАМК_B-рецепторов (Babcock et al., 2002; Cimarosti et al., 2009; Wu, Sun, 2015). Таким образом, салифен оказывает нейропротективный эффект и нормализует уровень экспрессии ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной коре подростков крыс, подвергавшихся острой перинатальной гипоксии, что можно интерпретировать как нормализацию ГАМК-ергической трансмиссии в этой области мозга. Показан модулирующий эффект препаратов с ГАМК_B-рецепторным компонентом действия на экспрессию данных рецепторов в гиппокампе и префронтальной коре крыс при различных экспериментальных условиях (Ковалев и др., 2021; Fairfax et al., 2004; Li et al., 2014). Можно предположить, что салифен, помимо нейропротективного эффекта, воздействовал на мембранную экспрессию ГАМК_B-рецепторов в нейронах медиальной префронтальной коры, восстанавливая их количество до контрольного уровня, что и было продемонстрировано результатами Вестерн-блоттинга. Далее, восстановление пула кор-

тикальных ГАМК_B-рецепторов в результате хронического применения салифена у крыс, подвергавшихся перинатальной гипоксии, снижало вызванное гипоксией избыточное торможение синаптической передачи и восстанавливало импульсную активность в нейронных контурах, что нормализовало функцию медиальной префронтальной коры и, как следствие, когнитивные способности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе показано, что острая перинатальная гипоксия вызывает нарушения когнитивных процессов и повышение экспрессии белка ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной области неокортекса у adolescentных крыс. Новый отечественный препарат салифен, представляющий собой производное ГАМК, применяемый после острой перинатальной гипоксии, предотвращает индуцируемые гипоксией нарушения в когнитивной сфере и изменения содержания ГАМК_B-рецепторов в медиальной префронтальной коре крыс. Результаты данного исследования представляют интерес для решения прикладной задачи неонатологии — поиска эффективных средств для фармакологической коррекции последствий перинатальной гипоксии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФ № 16-15-10272.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: “Высшая школа”, 1991. 399 с.
- Буткевич И.П., Михайленко В.А.* Пренатальное влияние флуоксетина на адаптивное поведение и когнитивную сферу у самцов крыс в препубертатный период развития. Рос. физиол. журн. 2017. 103 (7): 744–754.
- Васильева О.С., Макаренко С.В., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Тюренков И.Н.* Средство, сохраняющее популяцию ГАМК-ергических нейронов после острой перинатальной гипоксии. Патент на изобретение РФ № 2672884 С1. 2018. Бюл. № 32.
- Володин Н.Н., Медведев М.И., Рогаткин С.О.* Актуальные проблемы перинатальной неврологии на современном этапе. Журн. неврологии и психиатрии. 2001. 7: 4–8.
- Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М.* Анализ поведенческих и нейроцепторных эффектов атомоксетина и фенибута у мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания. Эксперим. и клин. фармакол. 2021. 84 (4): 3–11.
- Левина А.С., Захаров Г.А., Ширяева Н.В., Вайдо А.И.* Сравнительная характеристика поведения крыс двух линий, различающихся по порогу возбудимости нервной системы, в модели пространственного обучения в водном лабиринте Морриса. Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2018. 68 (3): 366–377.
- Миронова В.И., Акулова В.К., Хожай Л.И., Притворова А.В., Ордян Н.Э., Отеллин В.А.* Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов в мозге крыс после перинатальной гипоксии и при фармакологической коррекции. Нейрохимия. 2019. 36 (2): 170–176.
- Моргун А.В., Кувачева Н.В., Таранушенко Т.Е., Хилажева Е.Д., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Фролова О.В., Салмина А.Б.* Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции. Вестник РАМН. 2013. 12: 26–35.
- Ордян Н.Э., Акулова В.К., Миронова В.И., Отеллин В.А.* Вызванные перинатальной гипоксией поведенческие нарушения у ювенильных крыс и их коррекция производным ГАМК. БЭБиМ. 2017. 164 (8): 140–144.
- Ордян Н.Э., Акулова В.К., Пивина С.Г., Отеллин В.А., Тюренков И.Н.* Нарушения вследствие перинатальной гипоксии поведенческой и гормональной стресс-реакций крыс adolescentного возраста и их коррекция новым производным ГАМК. Журн. эволюц. биохимии и физиол. 2019. 55 (1): 59–64.
- Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А.* Влияние гипоксии в раннем перинатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга крыс. Журн. эволюц. биохимии и физиол. 2012. 48 (5): 467–473.
- Отеллин В.А., Хожай Л.И., Тюренков И.Н.* Воздействие перинатальной гипоксии на структуры гематоэнцефалического барьера у крыс при введении салифена. Морфология. 2015. 148 (6): 34–37.
- Отеллин В.А., Хожай Л.И., Тюренков И.Н.* Влияние фенибута на количество ГАМК-ергических нейронов в неокортексе у крыс в ювенильном и препубертатном периодах после острой гипоксии в перинатальный период. Эксперим. и клин. фармакол. 2020. 83 (2): 3–7.
- Отеллин В.А., Хожай Л.И., Шишко Т.Т., Тюренков И.Н.* Отдаленные последствия перинатальной гипоксии и их возможная фармако-

- логическая коррекция: реакции нервных клеток и синапсов неокортекса. Морфология. 2016. 150 (6): 7–12.
- Пальчик А.Б., Шабалов Н.П.* Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 256 с.
- Семченко В.В., Степанов С.С., Алексеева Г.В.* По-станоксическая энцефалопатия. Омск: Омск. гос. мед. акад. 1999. 446 с.
- Силачев Д.Н., Шрам С.И., Шакова С.М., Романова Г.А., Мясоедов Н.Ф.* Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга; эффекты синтетического аналога АКТГ (4-7). Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2008. 58 (4): 458–466.
- Тюренок И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Литвинов А.А., Бакулин Д.А.* Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга. Сибирский медицинский журн. 2012. 8: 61–63.
- Хожай Л.И., Отеллин В.А.* Распределение ГАМК-ергических нейронов в неокортексе у крыс в постнатальном периоде после перинатальной гипоксии. Морфология. 2014. 146 (4): 7–10.
- Akirav I., Maroun M.* Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb. Cortex.* 2006. 16 (12): 1759–1765.
- Almasi A., Zarei M., Raoufi S., Sarihi A., Salehi I., Komaki A., Hashemi-Firouzi N., Shahidi S.* Influence of hippocampal GABA_B receptor inhibition on memory in rats with acute β -amyloid toxicity. *Metab. Brain Dis.* 2018. 33 (6): 1859–1867.
- Anju T.R., Abraham P.M., Antony S., Paulose C.S.* Alterations in cortical GABAB receptors in neonatal rats exposed to hypoxic stress: role of glucose, oxygen, and epinephrine resuscitation. *Mol. Cell. Biochem.* 2010. 343 (1–2): 1–11.
- Antunes M., Biala G.* The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure and its modifications. *Cogn. Process.* 2012. 13 (2): 93–110.
- Babcock A.M., Everingham A., Paden C.M., Kimura M.* Baclofen is neuroprotective and prevents loss of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II immunoreactivity in the ischemic gerbil hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 2002. 67 (6): 804–811.
- Babenko O., Kovalchuk I., Metz G.A.* Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015. 48: 70–91.
- Bañuelos C., Beas B.S., McQuail J.A., Gilbert R.J., Frazier C.J., Setlow B., Bizon J.L.* Prefrontal cortical GABAergic dysfunction contributes to age-related working memory impairment. *J. Neurosci.* 2014. 34 (10): 3457–3466.
- Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M.* Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol. Rev.* 2004. 84 (3): 835–867.
- Chalifoux J.R., Carter A.G.* GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. 21 (2): 339–344.
- Cimarosti H., Kantamneni S., Henley J.M.* Ischaemia differentially regulates GABA(B) receptor subunits in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology.* 2009. 56 (8): 1088–1096.
- Clancy B., Darlington R.B., Finlay B.L.* Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience.* 2001. 105 (1): 7–17.
- DeSousa N.J., Beninger R.J., Jhamandas K., Boegman R.J.* Stimulation of GABAB receptors in the basal forebrain selectively impairs working memory of rats in the double Y-maze. *Brain Res.* 1994. 641 (1): 29–38.
- Desplats P.A.* Perinatal programming of neurodevelopment: epigenetic mechanisms and the prenatal shaping of the brain. *Adv. Neurobiol.* 2015. 10: 335–361.
- Enna S.J., Bowery N.G.* GABA(B) receptor alterations as indicators of physiological and pharmacological function. *Biochem. Pharmacol.* 2004. 68 (8): 1541–1548.
- Euston D.R., Gruber A.J., McNaughton B.L.* The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron.* 2012. 76 (6): 1057–1070.
- Fairfax B.P., Pitcher J.A., Scott M.G.H., Calver A.R., Pangalos M.N., Moss S.J., Couve A.* Phosphorylation and chronic agonist treatment atypically modulate GABA_B receptor cell surface stability. *J. Biol. Chem.* 2004. 279 (13): 12565–12573.
- Frangaj A., Fan Q.R.* Structural biology of GABA_B receptor. *Neuropharmacology.* 2018. 136: 68–79.
- Fritzius T., Bettler B.* The organizing principle of GABA_B receptor complexes: Physiological and pharmacological implications. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2020. 126 (Suppl. 6): 25–34.
- Gaiarsa J.-L., Kuczewski N., Porcher C.* Contribution of metabotropic GABA(B) receptors to neuronal network construction. *Pharmacol. Ther.* 2011. 132 (2): 170–179.
- Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prezeau L., Pin J.P.* Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *EMBO J.* 2001. 20 (9): 2152–2159.
- Gozlan H., Ben-Ari Y.* Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. *Cereb. Cortex.* 2003. 13 (6): 684–692.

- Heaney C.F., Kinney J.W. Role of GABA(B) receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016. 63: 1–28.
- Jones M.W. A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. *Curr. Mol. Med.* 2002. 2 (7): 639–647.
- Jurado-Parras M.T., Delgado-García J.M., Sanchez-Campusano R., Martín Gassmann M., Bettler B., Gruart A. Presynaptic GABAB receptors regulate hippocampal synapses during associative learning in behaving mice. *PLoS One.* 2016. 11 (2): e0148800.
- Kasten C.R., Boehm S.L. 2nd. Identifying the role of pre- and postsynaptic GABA_B receptors in behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015. 57: 70–87.
- Kauser H., Sahu S., Kumar S., Panjwani U. Guanfacine ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial working memory deficits. *Physiol. and Behav.* 2014. 123: 187–192.
- Kleschevnikov A.M., Belichenko P.V., Faizj M., Jacobs L.F., Htun K., Shamloo M., Mobley W.C. Deficits in cognition and synaptic plasticity in a mouse model of Down syndrome ameliorated by GABAB receptor antagonists. *J. Neurosci.* 2012. 32 (27): 9217–9227.
- Kobayashi K., Takei H., Yamamoto K., Hatanaka H., Koshikawa N. Kinetics of GABAB autoreceptor-mediated suppression of GABA release in rat insular cortex. *J. Neurophysiol.* 2012. 107 (5): 1431–1442.
- Koulen P.L., Malitschek B., Kuhn R., Bettler B., Wässle H., Brandstätter J.H. Presynaptic and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in neurons of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 1998. 10 (4): 1446–1456.
- Kumar K., Sharma S., Kumar P., Deshmukh R. Therapeutic potential of GABA(B) receptor ligands in drug addiction, anxiety, depression and other CNS disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2013. 110: 174–184.
- Lapin I. Phenibut (beta-phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug. *CNS Drug Rev.* 2001. 7 (4): 471–481.
- Li G., Lv J., Wang J., Wan P., Li Y., Jiang H., Jin Q. GABAB receptors in the hippocampal dentate gyrus are involved in spatial learning and memory impairment in a rat model of vascular dementia. *Brain Res. Bull.* 2016. 124: 190–197.
- Louzoun-Kaplan V., Zuckerman M., Perez-Polo J.R., Golan H.M. Prenatal hypoxia down regulates the GABA pathway in newborn mice cerebral cortex; partial protection by MgSO₄. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2008. 26 (1): 77–85.
- Macdonald R.L., Olsen R.W. GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994. 17: 569–602.
- Morici J.F., Bekinschtein P., Weisstaub N.V. Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behav. Brain Res.* 2015. 292: 241–251.
- Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 2018. 12: 825.
- Nisimov H., Orenbuch A., Pleasure S.J., Golan H.M. Impaired organization of GABAergic neurons following prenatal hypoxia. *Neuroscience.* 2018. 384: 300–313.
- Northington F.J., Chavez-Valdez R., Martin L.J. Neuronal cell death in neonatal hypoxia – ischemia. *Ann. Neurol.* 2011. 69 (5): 743–758.
- Paxinos G., Watson C. The Rat brain in stereotaxic coordinates, 6th edition. Elsevier: Acad. Press. 2007. 446 с.
- Peña F., Ramirez J.-M. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol. Neurobiol.* 2005. 32 (3): 251–283.
- Que M., Witte O.W., Neumann-Haefelin T., Schiene K., Schroeter M., Zilles K. Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience.* 1999. 93 (4): 1233–1240.
- Robinson S., Qing Li, Dechant A., Cohen M.L. Neonatal loss of gamma-aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. *J. Neurosurg.* 2006. 104 (6 Suppl): 396–408.
- Rose T.R., Wickman K. Mechanisms and regulation of neuronal GABAB receptor-dependent signaling. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2020. https://doi.org/10.1007/7854_2020_129
- Schuler V., Lüscher C., Blanchet C., Klux N., Sansig G., Klebs K., Schmutz M., Heid J., Gentry C., Urban L., Fox A., Spooren W., Jaton A.L., Vigouret J., Pozza M., Kelly P.H., Mosbacher J., Froestl W., Käslin E., Korn R., Bischoff S., Kaupmann K., van der Putten H., Bettler B. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron.* 2001. 31 (1): 47–58.
- Sutherland R.J., Kolb B., Whishaw I.Q. Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. *Neurosci. Lett.* 1982. 31 (3): 271–276.
- Terunuma M. Diversity of structure and function of GABA B receptors: a complexity of GABA B-mediated signaling. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2018. 94 (10): 390–411.
- Terunuma M., Revilla-Sanchez R., Quadros I.M., Deng Q., Deeb T.Z., Lumb M., Sicinski P., Haydon P.G., Pangalos M.N., Moss S.J. Postsynaptic GABAB receptor activity regulates excitatory neuronal architecture and spatial memory. *J. Neurosci.* 2014. 34 (3): 804–816.
- Van de Berg W.D.J., Kwijtaal M., de Louw A.J.A., Lissone N.P.A., Schmitz C., Faull R.L.M., Blokland A., Blanco C.E., Steinbusch H.W.M. Im-

- pect of perinatal asphyxia on the GABAergic and locomotor system. *Neuroscience*. 2003. 117 (1): 83–96.
- Vavers E., Zvejniece L., Svalbe B., Volska K., Makarova E., Liepinsh E., Rizhanova K., Liepins V., Dambrova M. The neuroprotective effects of R-phenibut after focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Res.* 2016. 113 (Pt B): 796–801.
- Vollenweider F., Bendfeldt K., Maetzler W., Otten U., Nitsch C. GABA(B) receptor expression and cellular localization in gerbil hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci. Lett.* 2006. 395 (2): 118–123.
- Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. protoc.* 2006. 1 (2): 848–858.
- Waldmeier P.C., Kaupmann K., Urwyler S. Roles of GABAB receptor subtypes in presynaptic auto- and heteroreceptor function regulating GABA and glutamate release. *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2008. 115 (10): 1401–1411.
- Wu C., Sun D. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab. Brain Dis.* 2015. 30 (2): 367–379.
- Zhang Y., Fukushima H., Kida S. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol. Brain*. 2011. 4: 4.
- Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Postnikova T.Y., Zaitsev A.V. Prenatal hypoxia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2019. 164: 107066.

SALIFEN PREVENTS PERINATAL HYPOXIA-INDUCED COGNITIVE IMPAIRMENTS AND CHANGES IN GABA_B RECEPTOR EXPRESSION IN THE RAT NEOCORTEX

V. I. Mironova^a, A. V. Pritvorova^{a, #}, V. K. Akulova^a, V. A. Mikhailenko^a, V. A. Otellin^a, L. I. Khozhai^a, and N. E. Ordyan^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, RAS, Saint Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: pritorovaav@infran.ru*

We have studied the effects of acute normobaric hypoxia in the early postnatal period of the development (the 2nd postnatal day) on learning and memory abilities and the expression of GABA_B receptors in the neocortex (medial prefrontal cortex) in adolescent rats (the 55–60th postnatal day), as well as the possibility of correction of the revealed impairments by GABA derivative salifen. It was shown that perinatal hypoxia disrupts task acquisition and consolidation in the novel object recognition test, impairs passive avoidance performance, and also reduces spatial learning abilities in the Morris water maze. Western blotting analysis revealed increased levels of GABA_B receptor protein in the medial prefrontal cortex of the rats following the exposure to perinatal hypoxia. Post-hypoxic daily salifen injections over 14 days at a dose of 15 mg/kg improved cognitive abilities in rats, and also normalized GABA_B receptor content in the rat medial prefrontal cortex. The results of the present research are of considerable significance for solution of applied problem of neonatology – the search for effective drug candidates for the pharmacological correction of the impacts of perinatal hypoxia.

Keywords: perinatal hypoxia, GABA_B receptors, medial prefrontal cortex, learning and memory, salifen, Wistar rats