
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ, ГЕНОМНЫЕ И НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ
В МОДЕЛИ НЕЙРОТРАВМЫ НА ВЗРОСЛЫХ РЫБАХ ЗЕБРАДАНИО
(*DANIO RERIO*)

© 2023 г. Н. П. Ильин^{1, 2, 3}, Д. С. Галстян^{1, 2, 3}, К. А. Демин^{1, 2}, А. В. Калыев^{1, 2, 3, 4, 5, *}

¹Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

³Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

⁵Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 01.10.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Травматическое повреждение мозга (ТПМ, нейротравма) представляет собой серьезную биомедицинскую проблему, особенно в связи с высокой распространенностью и риском смертности. Поэтому необходимо понимание механизмов патогенеза ТПМ как в клинике, так в экспериментальных моделях на животных. В исследовании использовали модель проникающей травмы мозга (теленцефалона) для изучения поведенческих и молекулярных последствий ТПМ у взрослых рыб зебрании (*zebrafish*, *Danio rerio*). Спустя четыре дня после индукции нейротравмы зебрании демонстрировали гиполокомоцию в тесте незнакомого аквариума, нарушение рабочей памяти в Y-образном лабиринте и активацию экспрессии в теленцефалоне гена *isg15*, который является биомаркером повреждения нейронов. Кроме того, повреждение теленцефалона вызвало значительное снижение уровня норадреналина (но не дофамина и серотонина) в мозге зебрании, что может отчасти объяснить наблюдаемые когнитивные дефициты, и подчеркивает потенциальное вовлечение нейротрансмиттерных систем в патогенез ТПМ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, зебрании, конечный мозг, поведение, норадреналин, ген *isg15*

DOI: 10.31857/S0869813923110043, EDN: HNGJDI

ВВЕДЕНИЕ

Травматическое повреждение мозга (ТПМ) является повреждением ткани мозга в результате механического воздействия, варьируя от легких сотрясений до тяжелых, угрожающих жизни черепно-мозговых травм [1]. Ежегодно более 60 миллионов человек подвергаются ТПМ, и более 2% населения живут с вызванными им неврологическими нарушениями, позволяя говорить о своеобразной “тихой эпидемии” ТМП [2]. Данная гетерогенная группа патологических состояний имеет разнообразную этиологию и функциональные проявления [3]. Открытые ТПМ ха-

рактируются видимыми повреждениями, кровотечением, возможной инфекцией и серьезными последствиями. Закрытая травма, в свою очередь, происходит без нарушения целостности черепа, но сам мозг при этом повреждается за счет деформации, сдавливания и растяжения [3]. Кроме того, ТПМ может быть классифицировано как очаговое или диффузное, в зависимости от распределения повреждения в мозге [4]. ТПМ влечет за собой ряд функциональных последствий, которые выходят за рамки острого периода травмы и могут сохраняться в течение длительного времени. В частности, распространенным эффектом ТПМ являются когнитивные дисфункции, в том числе нарушение внимания, памяти, исполнительных функций и скорости обработки информации [5]. Эти дисфункции являются характерным маркером ТПМ и наблюдаются как клинически, так и в разнообразных моделях на животных. При ТПМ также распространены моторные нарушения (затруднения двигательной активности и координации движений) [6], изменения эмоциональных состояний (перепады настроения, раздражительность, депрессия, тревога и эмоциональная неустойчивость) [7, 8], а также развитие целого ряда других заболеваний ЦНС, в том числе эпилепсии и болезней Альцгеймера и Паркинсона [9–11].

Эксайтотоксичность является одним из ключевых механизмов вторичного повреждения нейронов при ТПМ [12] и опосредована гиперактивацией рецепторов возбуждающих нейротрансмиттеров (прежде всего глутамата), повышающих внутриклеточную концентрацию кальция через ионотропные рецепторы [13]. Исследования на грызунах [14, 15] и на людях [16, 17] указывают на увеличение внеклеточной концентрации глутамата в мозге после ТПМ. Вероятно, при ТПМ происходит растяжение мембран нейронов, что создает микропоры, обеспечивающие приток ионов натрия внутрь клетки [12], это приводит к деполяризации мембраны, активации потенциал-зависимых кальциевых каналов и высвобождению глутамата во внеклеточное пространство, и, в итоге, избыточному притоку кальция в постсинаптические нейроны [18].

Увеличение внутриклеточной концентрации кальция нарушает нормальное функционирование клетки и активирует ее программируемую смерть [19]. Например, рост его концентрации приводит к активации кальций-зависимых протеаз, липаз и эндонуклеаз, которые инициируют разрушение клеточных структур [20], что приводит к нарушению синаптической передачи, дисфункции нейронных сетей, нарушению нейропластичности и расстройствам поведения, памяти и внимания.

Воспалительный процесс инициируется в первые минуты ТПМ в результате механического повреждения ткани, а также высвобождения молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs) [21, 22]. Первичное повреждение вызывает активацию резидентных иммунных клеток микроглии, которые служат первой линией защиты ЦНС. Микроглия быстро претерпевает морфологические и функциональные изменения, переходя из состояния покоя в активированное [23], высвобождая провоспалительные медиаторы (цитокины, хемокины и простагландины) и способствуя окислительному стрессу и нейродегенерации [24].

Астроциты также быстро реагируют на ТПМ, претерпевая морфологические и функциональные изменения (реактивный астроглиоз) [25] и образуя глиальный рубец, который действует как физический барьер, ограничивающий распространение повреждения. Активированные астроциты способны выделять провоспалительные медиаторы, а также наблюдается нарушение обратного захвата ими глутамата из внеклеточного пространства, что способствует эксайтотоксичности [26]. Нарушение целостности гематоэнцефалического барьера при ТПМ открывает возможность для инфильтрации в мозг периферических иммунных клеток – нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов, которые модулируют нейровоспаление, секретируя провоспалительные медиаторы [27]. В этом процессе особую роль играют фактор некроза опу-

холи-альфа (ФНО- α), интерлейкин-1 β (ИЛ- β) и интерлейкин-6 (ИЛ-6), содержание которых в мозге стремительно растет в первые часы после ТПМ [28–31]. Эти цитокины способствуют выработке и высвобождению других провоспалительных медиаторов, усиливая нейровоспаление и нейроапоптоз.

Изучение патофизиологических аспектов ТПМ и их молекулярных механизмов требует широкого спектра экспериментальных моделей на животных. Помимо грызунов, следует отметить растущую роль альтернативных моделей ТПМ на рыбах зебрании (*zebrafish*, *Danio rerio*) [32, 33]. Цель настоящей работы – валидировать на зебрании модель ТПМ, вызванной проникающим повреждением теленцефалона, и оценить нейрохимические и геномные изменения в мозге зебрании в данной модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и их содержание

В исследовании использовали 36 взрослых зебрании дикого коротко-плавникового типа, возраст 3–5 мес., которые были приобретены у компании ООО “Аксолотль” (Санкт-Петербург, Россия). Животные содержались в виварии Центра доклинических и трансляционных исследований Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова в соответствии со стандартными условиями [34]. Аутбредная линия дикого типа была использована в настоящем исследовании с учетом популяционной валидности модели патогенеза ЦНС. В частности, в то время как инбредные линии зебрании более надежны для нейрогенетических исследований, моделирование патологий ЦНС предполагает достижение сходства с “реальными” заболеваниями человека, которые поражают генетически гетерогенные популяции. Таким образом, использование аутбредных зебрании является более популяционно обоснованным и трансляционно релевантным подходом, соответствующим задачам настоящего исследования.

Для обеспечения оптимальных условий содержания использовалась автоматическая система распределения и очистки воды ZebTec Active Blue Stand (Tecniplast, West Chester, США). Рыбы размещались в ней группами по 15 особей в аквариумах объемом 3 литра. Температура воды автоматически поддерживалась на уровне $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$, а значение pH составляло 7.4. Интенсивность освещения составляла 950–960 люкс, с циклом свет/темнота 12/12 ч. Перед началом эксперимента животные прошли акклиматизацию в течение 2 недель. Все животные были экспериментально наивны и не подвергались никаким экспериментальным манипуляциям до начала данного исследования. Все рыбы принадлежали одной популяции и были случайным образом разделены на экспериментальные группы с помощью онлайн-генератора случайных чисел. Распределение рыб по группам, проведение поведенческих тестов и анализ данных выполнялись разными исследователями. При этом каждой группе были присвоены кодовые обозначения, что обеспечивало независимый анализ данных экспериментаторами относительно воздействия. Графическая иллюстрация плана экспериментов представлена на рис. 1.

Постановка модели проникающего повреждения теленцефалона

Постановка модели проводилась согласно методике, описанной ранее [35]. В начале эксперимента животные подвергались анестезии путем погружения в раствор трикаина (170 мг/мл этил-3-аминобензоат метансульфоната, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, США) на 40–60 с, затем фиксировались с помощью губки, также смоченной в трикаине, и помещались под микроскоп. Травмирующее повреждение наносилось путем введения медицинской иглы (30 G) в медиальную область

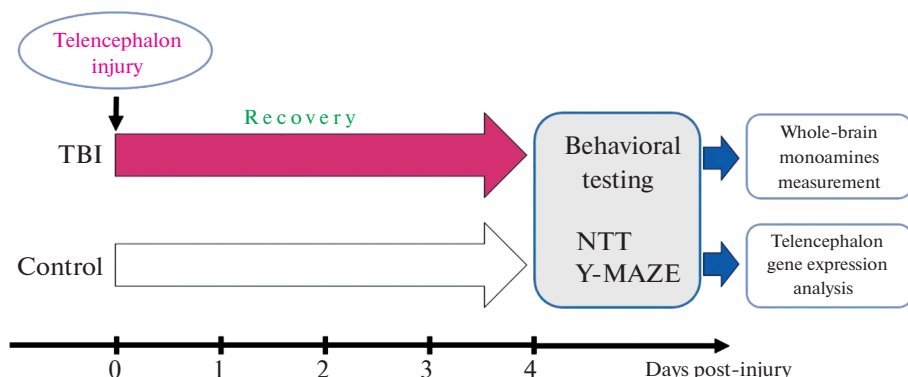


Рис. 1. Общий дизайн исследования. TBI – травматическое повреждение мозга (с периодом адаптации, recovery) в сравнении с контрольной группой (Control), NTT – тест незнакомого аквариума, Y-maze – тест Y-образного лабиринта. По оси приведены дни после TBI.

правой полусферы теленцефалона через крышу черепа на глубину 1.5–2 мм. После этого рыб выпускали в аквариум с чистой водой для восстановления. В результате описанных процедур выживаемость животных составляла 100%. Рыбы контрольной группы были экспериментально наивны, не подвергаясь экспериментальным воздействиям ранее (рис. 1).

Поведенческие тесты

Тест незнакомого аквариума был выбран как наиболее чувствительный и широко используемый метод для оценки параметров поведения и локомоции зебраданио [36, 37]. Он представлял собой акриловый прямоугольный аквариум размером 20 см (высота) × 20 см (длина) × 5 см (ширина), заполненный водой до уровня 19 см. Задняя и боковые стороны аквариума были окрашены в белый цвет для увеличения контрастности, а передняя сторона оставалась прозрачной. На расстоянии 1 м от аквариума располагалась видеокамера SJCAM SJ4000 (SJCAM Ltd., Шэньчжэнь, Китай). Запись производилась в течение 5 мин (после помещения зебраданио в аквариум) с частотой 60 кадров в секунду. Далее с помощью программного обеспечения Noldus IT EthoVision XT11.5 (Noldus IT, Wageningen, Нидерланды) были проанализированы поведенческие параметры зебраданио из сделанных видеозаписей: преодоленная дистанция (см), средняя скорость (см/с), время, проведенное в неподвижном состоянии (с), латентный период первого заплыва в верхнюю часть аквариума (с), время, проведенное в верхней половине аквариума (с) и количество переходов в верхнюю половину аквариума.

Y-образный лабиринт является распространенным тестом для оценки рабочей памяти зебраданио [38]. В ходе тестирования рыб помещали по одной в белые акриловые Y-образные аквариумы, заполненные водой. Каждый аквариум состоял из трех идентичных рукавов (длина 50, ширина 20, высота 140 мм), расположенных под углом 120° друг к другу. Рыбы имели возможность свободно исследовать все ответвления лабиринта в течение 15 мин, при этом их перемещение фиксировалось на камеру. За это время животное делало определенное количество дискретных выборов (как правило, более 100) – поворотов налево (L) или направо (R). Полученные видеозаписи анализировались в программе Noldus Ethovision, фиксируя время, когда рыба заплывала в каждое плечо (рукав) лабиринта и когда покидала его.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Целевой ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>eef1a1l1</i>	CCCAGTGCTGGATTGCCACA	GCGGCATCTCCGGATTGAG
<i>casp3a</i>	CCAGGGTCAACCATAAAGTAGC	TCTTTGGTGAGCATTGAGACGA
<i>Tnfa</i>	GGGCAATCAACAAGATGGAAG	GCAGCTGATGTGCAAAGACAC
<i>isg15</i>	ACTTGATTTCGGTGCGACTTGC	GCTGCATCGTCACCGAGTTAT

Эти данные были преобразованы в последовательность символов L и R, обозначающих левые и правые повороты соответственно [39]. Полученные для каждой рыбы последовательности были далее преобразованы в распределение по 16 тетрад (LLLL, LLLR, LLRL, LLRR, LRLR, LRRL, LRRR, RLLL, RLLR, RLRL, RLRR, RRLR, RRLR, RRRR), нормированным к общему количеству оборотов и выраженным в %, согласно стандартным методикам [38].

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Забор проб теленцефалона проводился непосредственно после проведения поведенческих экспериментов. Рыб умерщвляли путем погружения в ледяную воду, до полной остановки дыхательных движений, после чего под микроскопом вскрывали крышу черепа и извлекали конечный мозг. Выделение РНК осуществлялось с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) по стандартному протоколу для TriZol-опосредованной экстракции. Обратная транскрипция была выполнена с помощью коммерческого набора MMLV RT kit (Евроген). Для проведения ПЦР-РВ использовали коммерческую реакционную смесь 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Сама реакция проводилась в системе ПЦР реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, США). Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых в данной работе, приведены в табл. 1.

Дизайн праймеров был осуществлен с использованием базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для расчета изменения относительной экспрессии генов использовался метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [40]. В качестве референсного гена был выбран *eef1a1l1* – ген домашнего хозяйства, кодирующий эукариотический фактор инициации трансляции.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭХД) использовалась для анализа содержания моноаминов (норадреналина, дофамина, серотонина) и их метаболитов (3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты – ДОФУК, гомованилиновой кислоты – ГВК и 5-гидроксииндолуксусной кислоты – 5-ГИУК) в пробах головного мозга зебраданио. Методика основана на модифицированной версии протокола, разработанного [41]. Анализ проводился на хроматографе HTEC-500 (Eicom, San Diego, США) с использованием колонки EICOMPAK CA-50DS. Подвижная фаза для ВЭЖХ-ЭХД состояла из 0.1 М фосфатного буфера (pH 6.0), содержащего октансульфонат натрия (1.9 мМ), этилендиаминтетрауксусную кислоту (0.17 мМ) и метанол (1.13 М), pH подвижной фазы – 4.5. Для нормализации данных был использован внутренний стандарт – 1%-ный раствор 3,4-дигидроксibenзиламина в 0.1 М HClO₄ (добавлялся в пробы в соотношении 10 мкл на 1 мг ткани) и внешний стандарт – 0.1 М растворы серотонина, дофамина,

норадrenalина, ДОФУК, ГВК, 5-ГИУК и 3,4-дигидроксibenзиламина (10 мкл каждого раствора на 930 мкл 0.1 М HClO_4). Все реактивы для ВЭЖХ были получены из Sigma Aldrich, St. Louis, США.

Статистическая обработка данных

Полученные данные анализировали с использованием языка программирования R (версия 4.2.1) в среде R-Studio (версия 2022.02.2). Проверка данных на нормальность проводилась с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Ввиду отсутствия нормального распределения у исследуемых переменных, данные теста незнакомо аквариума, хроматографии и ПЦР анализировались с использованием непараметрического теста Вилкоксона–Манна–Уитни для независимых выборок. Для анализа распределения тетраграмм переходов в Y-образном лабиринте была построена обобщенная линейная модель (GLM, Poisson distribution, log link), где факторы “Группа”, “Тетраграмма”, и взаимодействие “Группа” $\times$ “Тетраграмма” использовались в качестве предикторов. При обнаружении значимого влияния одного из факторов или когда взаимодействие между факторами было значимым, проводилось попарное сравнение с использованием оцененных маргинальных средних (пакет R “emmeans”, коррекция значения p по методу Сидака). Различия считались статистически значимыми при значении $p < 0.05$.

Расчет размера выборки (n) проводился на основании данных пилотного исследования с использованием функции `power.tn.test` пакета `power` в R. Данная функция позволяет определить примерное n для теста Вилкоксона с учетом желаемой мощности теста (0.80), уровня значимости (0.05), а также значений среднего и стандартного отклонения среднего выбранной переменной для двух групп. В качестве зависимой переменной была выбрана дистанция в тесте незнакомо аквариума как один из наиболее важных поведенческих показателей. В пилотном исследовании значения среднего и стандартного отклонения среднего составили 954 ± 371 см для контрольной группы и 643 ± 245 см для ТПМ (размер эффекта – 0.478). На основании этих данных было получено значение $n = 16$, которое было скорректировано до $n = 18$ с учетом возможной смертности в результате экспериментальных воздействий. В ходе анализа данных удаления выбросов не проводилось. Ввиду повреждения видеофайлов результаты теста незнакомо аквариума не были получены для трех животных (два из контрольной группы и одно из группы ТПМ). Критерием для исключения из финального анализа в тесте Y-образного лабиринта являлось меньшее, чем 100 число поворотов за время теста (отмечалось для двух зебрании из каждой группы).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ТПМ на поведение в тесте незнакомо аквариума

ТПМ оказало статистически значимое влияние на поведение зебрании в тесте незнакомо аквариума, что выражалось в изменении дистанции, числа переходов между зонами и времени нахождения в верхней половине аквариума (рис. 2 и табл. 2). Рыбы, подвергнутые ТПМ, преодолевали меньшую дистанцию за время теста, а также совершали меньшее число переходов между зонами в сравнении с контрольной группой ($p < 0.05$), что говорит о снижении локомоторной активности. В то же время травма мозга привела к увеличению времени, проведенному в верхней половине аквариума ($p < 0.05$).

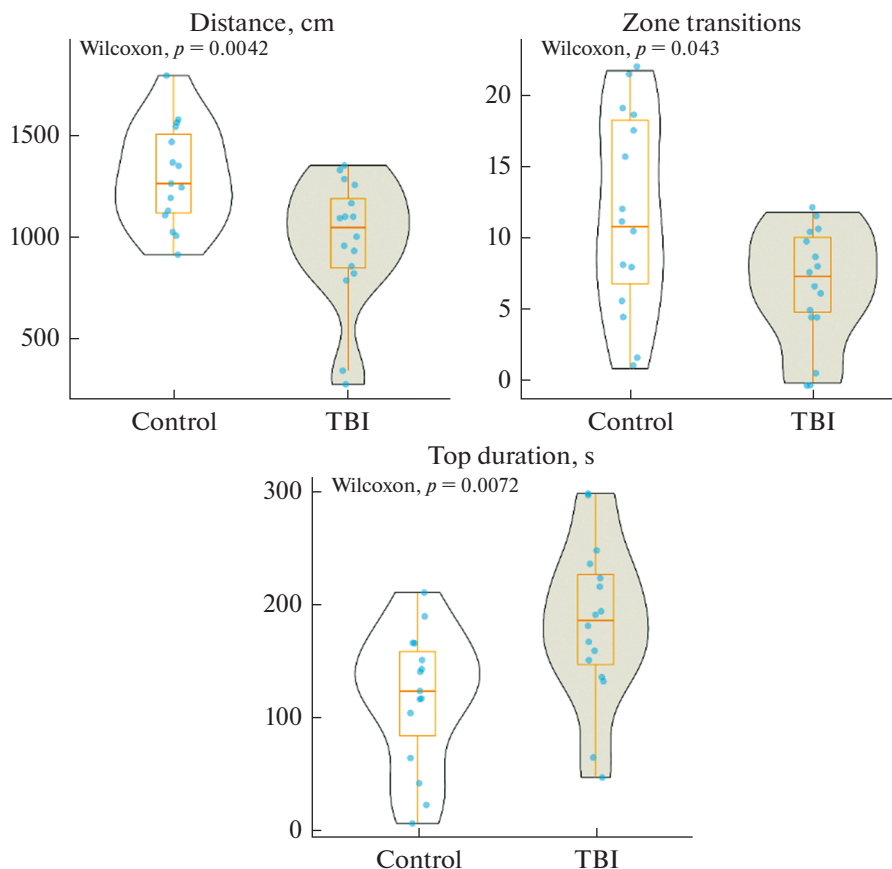


Рис. 2. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на поведение зебрании в тесте незнакомой аквариума. Control – контрольная группа. Оценивали суммарное расстояние, преодоленное животным за время теста (Distance), число переходов между верхней и нижней половинами аквариума (Zone transitions) и суммарное время в верхней половине аквариума (Top duration). Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах ($n = 16–17$ в группе) и проанализированы тестом Вилкоксона–Манна–Уитни (Wilcoxon).

Таблица 2. Сравнение ключевых поведенческих показателей теста незнакомой аквариума у зебрании

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение p
Дистанция (см)						
Контроль	1274.35	1130.12	1515.2	385.08	191	<0.01
ТПМ	1059.64	860.83	1200.11	339.27		
Количество переходов между зонами						
Контроль	11	7	18.5	11.5	171.5	<0.05
ТПМ	7.5	5	10.25	5.25		
Время в верхней половине аквариума (с)						
Контроль	126.4	87.2	161.13	73.93	51.5	<0.01
ТПМ	188.6	149.9	228.9	79		

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 16–17$ в группе). ТПМ – травматическое повреждение мозга. IQR – межквартильный размах (interquartile range).

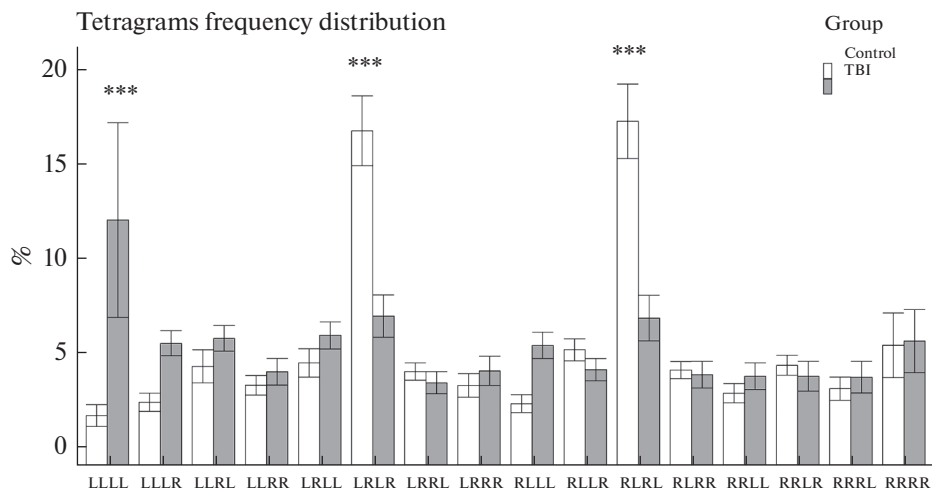


Рис. 3. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на распределение тетраграмм альтернативных выборов в тесте Y-образного лабиринта (Tetragrams frequency distribution, $n = 16$ в группе). Control – контрольная группа. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. *** – $p < 0.001$ (парное сравнение оцененных маргинальных средних значений с коррекцией значений p методом Сидака для множественных сравнений).

Влияние ТПМ на поведение в Y-образном лабиринте.

Анализ обобщенной линейной модели показал значимое влияние фактора “тетраграмма” ($p < 0.001$), а также взаимодействия факторов “тетраграмма” $\times$ “группа” ($p < 0.001$) на процентное распределение альтернативных выборов зебраданию в Y-образном лабиринте (рис. 3). Так, рыбы контрольной группы демонстрировали естественное чередование (спонтанную альтернацию) левых и правых поворотов, о чем свидетельствует характерное распределение переходов с преобладанием тетраграмм LRLR и RLRL (рис. 2, табл. 3). Подобное распределение соответствует типичному поведению рыб в данном тесте, описанному в литературе [38, 42]. В группе ТПМ спонтанная альтернация не была выражена, о чем говорит значительно меньший процент тетрад LRLR и RLRL в сравнении с контрольной группой ($p < 0.001$). При этом рыбы из группы ТПМ показали большую склонность к повторению левых поворотов, о чем говорит увеличение процентного отношения тетраграмм LLLL в сравнении с контрольной группой ($p < 0.001$, рис. 3, табл. 3).

Дальнейший анализ распределения тетраграмм выявил статистически значимые различия между группами по ключевым показателям теста – процентному отношению чередований (тетраграммы LRLR + RLRL) и повторений (тетраграммы LLLL + RRRR). Так, зебраданию из группы ТПМ показали увеличение процента повторений относительно контрольной группы и снижение процента чередований ($p < 0.05$, рис. 4 и табл. 4). Данные изменения принято интерпретировать как нарушение спонтанной альтернации как показателя рабочей памяти у зебраданию в данном тесте [38].

Влияние ТПМ на содержание моноаминов и их метаболитов в мозге зебраданию

Анализ содержания моноаминов (норадреналина, дофамина и серотонина), а также их метаболитов (гомованилиновой кислоты, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и диоксифенилуксусной кислоты) в целом мозге зебраданию представлены на рис. 5 и в табл. 5. Травматическое повреждение теляцефалона вызвало статисти-

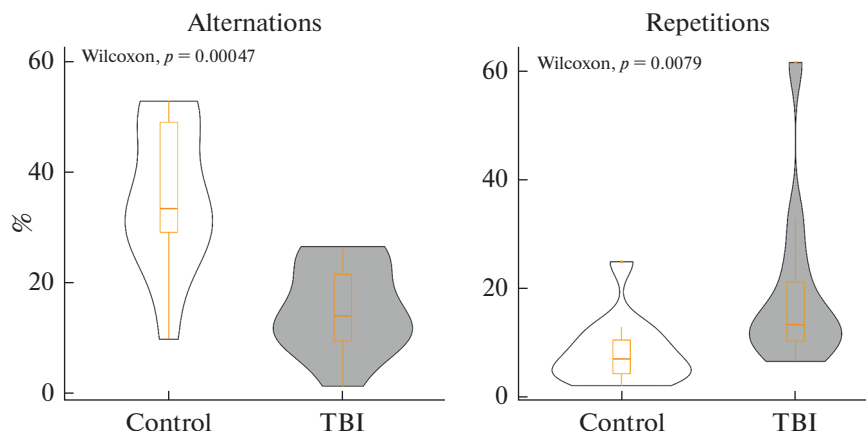


Рис. 4. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на поведение зебрланио в тесте Y-образного лабиринта, в том числе процентное отношение чередований (Alternations) и повторений (Repetitions) левых и правых поворотов. Control – контрольная группа. Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах ($n = 16$ в группе) и проанализированы тестом Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon).

чески значимое снижение уровня норадреналина в мозге зебрланио ($p < 0.05$ против контрольной группы), при этом содержание других анализируемых веществ между группами не различалось ($p > 0.05$).

Влияние ТПМ на экспрессию генов *casp3a*, *tnfa* и *isg15* в теленцефалоне зебрланио

Анализ результатов ПЦР-РВ показал, что травматическое повреждение оказало статистически значимое влияние на уровень экспрессии гена *isg15* в теленцефало-

Таблица 3. Сравнение частоты тетраграмм в тесте Y-образного лабиринта между экспериментальными группами зебрланио

Сравнение	Тетраграммы	Estimate	SE	z-ratio	<i>p</i> value
Контроль–ТПМ	LLLL	–1.59	0.29	–5.52	<0.001
Контроль–ТПМ	LLLR	–0.66	0.29	–2.29	0.02
Контроль–ТПМ	LLRL	–0.25	0.25	–1	0.32
Контроль–ТПМ	LLRR	–0.15	0.28	–0.55	0.58
Контроль–ТПМ	LRLL	–0.24	0.25	–0.97	0.33
Контроль–ТПМ	LRLR	0.81	0.18	4.41	<0.001
Контроль–ТПМ	LRRL	0.13	0.28	0.46	0.65
Контроль–ТПМ	LRRR	–0.17	0.28	–0.59	0.56
Контроль–ТПМ	RLLL	–0.56	0.29	–2.28	0.06
Контроль–ТПМ	RLLR	0.19	0.26	0.74	0.46
Контроль–ТПМ	RLRL	0.85	0.18	4.64	<0.001
Контроль–ТПМ	RLRR	0.05	0.27	0.18	0.86
Контроль–ТПМ	RRLL	–0.21	0.29	–0.72	0.47
Контроль–ТПМ	RRLR	0.12	0.27	0.43	0.67
Контроль–ТПМ	RRRR	–0.14	0.29	–0.48	0.63
Контроль–ТПМ	RRRL	–0.03	0.24	–0.14	0.89

Статистически значимые различия выделены жирным шрифтом (попарное сравнение оцененных маргинальных средних значений с коррекцией значений *p* методом Сидака для множественных сравнений). Estimate – разница между оцененными маргинальными средними, SE – стандартная ошибка среднего, ТПМ – травматическое повреждение мозга.

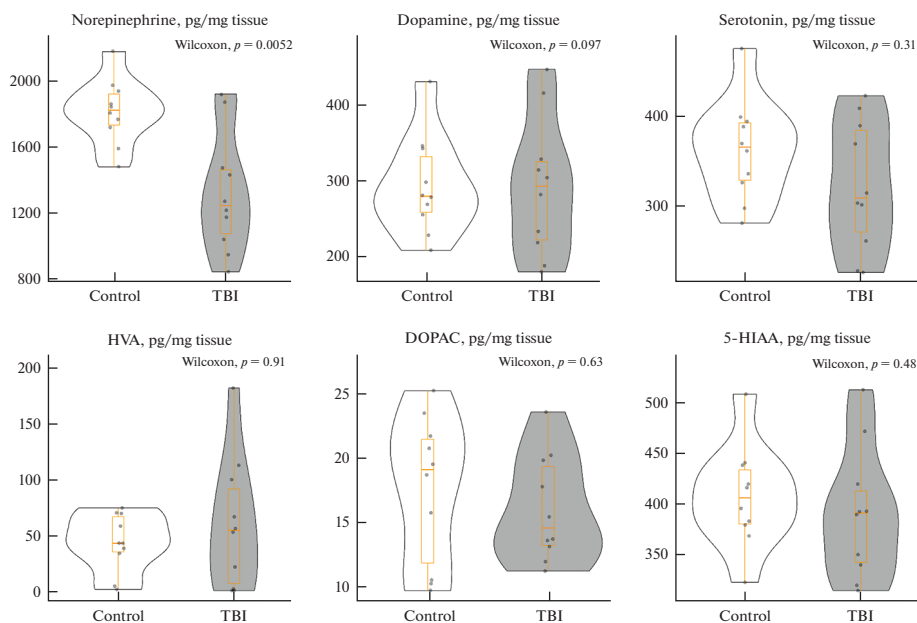


Рис. 5. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на содержание моноаминов и их метаболитов в целом мозге зебраданию ($n = 10$ в группе). Control – контрольная группа. Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах и проанализированы тестом Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon). Norepinephrine – норадrenalин, Dopamine – дофамин, Serotonin – серотонин, HVA – гомованилиновая кислота, DOPAC – дигидроксифенилуксусная кислота, 5-HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота.

не зебраданию ($p < 0.001$ против контрольной группы), при этом изменений в экспрессии генов *casp3* и *tnfa* обнаружено не было ($p > 0.05$; рис. 6 и табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на высокую гетерогенность клинических форм ТПМ, можно выделить некоторые общие закономерности, присущие всем видам данной патологии [43]. Первичные ТПМ возникают при физическом воздействии и вызывают разрушение оболочек мозга и гематоэнцефалического барьера, разрыв кровеносных сосу-

Таблица 4. Сравнение ключевых поведенческих показателей спонтанной альтернации в тесте Y-образного лабиринта у зебраданию

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение p
Повторения (%)						
Контроль ТПМ	7.58	4.9	11.04	6.14	25.5	<0.01
	13.85	10.86	21.65	10.79		
Чередования (%)						
Контроль ТПМ	33.7	29.42	49.28	19.86	133	<0.001
	14.36	9.84	21.87	12.03		

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, $p < 0.05$, $n = 16-17$ в группе). Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль, IQR – межквартильный размах. ТПМ – травматическое повреждение мозга.

Таблица 5. Сравнение содержания моноаминов в мозге зебраданио на фоне нейротравмы

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение <i>p</i>
Норадреналин (пг/мг ткани)						
Контроль	1825.61	1736.71	1922.6	185.89	86	0.005
ТПМ	1250.67	1082.43	1466	383.56		
Дофамин (пг/мг ткани)						
Контроль	281.42	260.62	333.32	72.7	51	0.971
ТПМ	294.76	224.18	326.57	102.38		
Серотонин (пг/мг ткани)						
Контроль	367.21	330.52	394.06	63.54	64	0.315
ТПМ	310.89	273.36	385.85	112.49		
ГБК (пг/мг ткани)						
Контроль	44.11	36.23	67.7	31.47	48	0.912
ТПМ	55.5	8.36	92.27	83.91		
ДОФУК (пг/мг ткани)						
Контроль	19.07	11.85	21.41	9.56	57	0.631
ТПМ	14.57	13.22	19.29	06.08		
5-ГИУК (пг/мг ткани)						
Контроль	405.9	380.46	433.45	52.99	60	0.481
ТПМ	391.03	342.72	412.89	70.17		

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 10$ в группе). Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль, IQR – межквартильный размах. ТПМ – травматическое повреждение мозга, ГБК – гомованилиновая кислота, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота, 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота.

Таблица 6. Сравнение экспрессии генов *casp3a*, *tnfa* и *isg15* в теленцефалоне зебраданио на фоне нейротравмы

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение <i>p</i>
<i>casp3a</i> (относительный уровень экспрессии)						
Контроль	1.04	0.7	1.26	0.56	46	0.16
ТПМ	0.64	0.38	0.86	0.49	46	
<i>tnfa</i> (относительный уровень экспрессии)						
Контроль	0.54	0.45	01.01	0.56	42	0.33
ТПМ	0.4	0.26	0.79	0.52	42	
<i>isg15</i> (относительный уровень экспрессии)						
Контроль	1.03	0.8	1.39	0.59	0	<0.001
ТПМ	25.81	16.37	30.93	14.55	0	

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 8$ в группе). Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль, IQR – межквартильный размах. ТПМ – травматическое повреждение мозга.

дов, растяжение и разрыв аксонов, гибель нейронов и глиальных клеток [44]. В ходе первичных повреждений происходит неспецифическая гибель клеток. Первичные повреждения инициируют возникновение вторичных повреждений, которые проявляются в системных нарушениях (отек мозга, увеличение внутричерепного давления, ишемия), а также активацией физиологических и клеточных механизмов, таких как эксайтотоксичность, нейровоспаление, окислительный стресс,

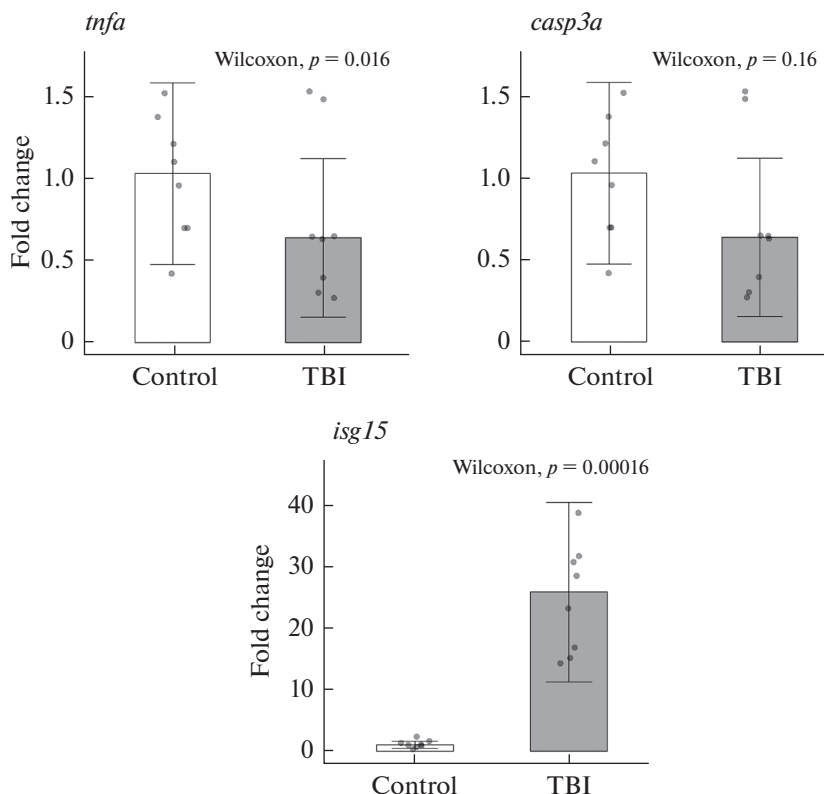


Рис. 6. Влияние травматического повреждения мозга (ТБИ) на относительный уровень экспрессии (fold change) генов *casp3a*, *tnfa* и *isg15* в теленцефалоне зебрании ($n = 8$ в группе). Данные нормированы относительно гена *eefla1l1*. Control – контрольная группа. Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах.

митохондриальная дисфункция, программируемая клеточная смерть [12]. Вторичные повреждения могут развиваться в течение часов, дней или даже недель после первичной травмы, а также выходить за пределы места первоначального повреждения, затрагивая соседние и отдаленные области мозга, и именно от характера и тяжести вторичных повреждений во многом зависят итоговые функциональные последствия ТПМ.

Хотя ТПМ приводит к неспецифической смерти нервных клеток в результате некроза в первые минуты после травмы, клинические и экспериментальные данные указывают на важность “второй волны” клеточной гибели за счет апоптоза и других механизмов программируемой смерти клеток [45]. При ТПМ происходят характерные апоптотические изменения морфологии клеток (сморщивание, фрагментация ядер, конденсация хроматина, образование апоптотических телец), а также маркеров фрагментации ДНК и активации проапоптотических белков [46–50], прежде всего каспаз, которые расщепляют белки и вызывают гибель клеток (каспазы 3, 6 и 7) либо активируют другие каспазы (каспазы 2, 8 и 9) [51]. При ТПМ наиболее распространенной причиной апоптоза является чрезмерный уровень внутриклеточного кальция, вызванный эксайтотоксичностью [12], что приводит к активации каспаз и разрушению клеточных структур при апоптозе. Кроме того, апоптоз инициируется связыванием лигандов смерти (ФНО- α) с соответствующи-

ми рецепторами [52], также активируя каскад каспаз и, в результате, апоптоз. Помимо апоптоза, описано еще несколько механизмов программируемой смерти клеток, активируемых в результате ТПМ, в том числе некроптоз, аутофагия, пироптоз и ферроптоз [53–55].

В настоящем исследовании травматическое повреждение конечного мозга зебраданию привело к выраженным поведенческим нарушениям, свидетельствуя об успешности постановки модели нейротравмы. Так, на 4-й день после ТПМ рыбы демонстрировали гиполокомоцию, выраженную в снижении преодоленной дистанции в тесте незнакомого аквариума, а также в нарушении рабочей памяти, выраженное в снижении относительного количества чередований и увеличении количества повторений в тесте Y-образного лабиринта. Эти данные согласуются с результатами других работ на модели зебраданию, в которых повреждение мозга вызывало подобные поведенческие изменения [56–58], а также с моделями ТПМ на млекопитающих, в которых когнитивные и моторные нарушения являются одними из наиболее распространенных функциональных последствий травмы мозга [59–61].

Интересным наблюдением является значительное увеличение экспрессии *isg15* в группе с ТПМ (рис. 5). Данный ген кодирует убиквитин-подобный белок ISG15 (interferon-stimulated gene 15), который может связываться с другими белками-мишенями в процессе ISG-илирования (ISGylation), похожем на убиквитинирование [62]. Показано, что ISG15 может играть важную роль в патогенезе ТПМ, о чем свидетельствует многократное увеличение экспрессии его гена *ISG15*, а также степени ISG-илирования белков в моделях нейротравмы на мышцах и пациентов с ТПМ [63]. Более того, активация этого гена наблюдается при повреждениях нервной ткани различной этиологии, что позволяет говорить о ISG15 как об общем маркере повреждений нейронов. Тем не менее, физиологическая функция ISG15, а также функциональные последствия его активации в ответ на травму, еще плохо изучены [64]. Результаты настоящей работы впервые указывают на активацию системы ISG15 при ТПМ у зебраданию, что свидетельствует о высокой эволюционной консервативности данного ответа, и позволяет использовать зебраданию в качестве модели для ISG15-ассоциированных патологий.

Любопытно, что повреждение теленцефалона не оказало влияния на уровень экспрессии генов каспазы-3 и ФНО- α (рис. 5). Каспаза-3 является ключевым фактором апоптоза, а ФНО- α – важным провоспалительным цитокином, участвующим в инициации нейровоспаления при ТПМ, а также индуктором апоптоза. Увеличение экспрессии генов этих биомаркеров описано в моделях ТПМ как на рыбах [65–67], так и на млекопитающих [28, 68–71]. В настоящей работе отсутствие эффекта на них после примененного ТПМ может быть связано с более поздним сроком забора проб для анализа (4 дня после травмы), когда основная острая фаза воспалительного ответа уже миновала. В пользу такого предположения говорит резкое увеличение уровня экспрессии *tnfa* в первые часы после травмы, сменившееся постепенным снижением, с возвратом к физиологическим значениям на 3–4-й день в той же модели ТПМ [66]. Увеличение экспрессии гена каспазы-3 в модели ТПМ рыб наблюдалось через 20 ч после повреждения, но не через 3 дня [65]. Аналогично, в моделях на грызунах увеличение экспрессии гена ФНО- α наблюдается в первые часы после травмы мозга, после чего этот показатель возвращается к норме [28, 68]. Напротив, увеличение экспрессии гена каспазы-3, а также содержания активированной формы этого белка у млекопитающих наблюдается через дни или даже месяцы с момента травмы [69–71]. Таким образом, настоящее исследование указывает как на сходства, так и на различия молекулярного ответа на нейротравму у зебраданию и млекопитающих.

Наконец, повреждение теленцефалона вызвало значительное снижение уровня норадреналина в ткани головного мозга зебраданию (рис. 4). У зебраданию, как и у

млекопитающих, тела норадренергических нейронов локализованы в голубом пятне ствола головного мозга, откуда восходящие проекции направляются к другим отделам [72]. Учитывая локальность наносимой травмы, наблюдаемые нейрохимические изменения, вероятнее всего, связаны со вторичными повреждениями, вызванными ТПМ, нежели с механическим повреждением нервной ткани. Норадренергические нейроны, наряду с дофаминергическими, наиболее подвержены метаболическим нарушениям, возникающим в результате их повреждения [73]. Так, норадренергические нейроны голубого пятна демонстрируют высокую чувствительность к окислительному стрессу, вызванному нейровоспалением [74]. Показано снижение содержания норадреналина и уменьшение числа норадренергических нейронов в стволе мозга в ответ на проникающую травму сенсомоторной коры у крыс, что может быть связано с окислительным стрессом [75]. Поскольку норадреналин играет важную роль в регуляции многих функций ЦНС [76], снижение уровня этого моноамина в мозге зебраданио может быть отчасти ответственно за наблюдаемые в работе когнитивные и моторные нарушения.

В целом, перспективность использования зебраданио в моделях ТПМ связана с сочетанием этим организмом как эволюционно консервативных, так и отличных от млекопитающих особенностей. Так же, как у грызунов, ТПМ у зебраданио вызывает развитие вторичных повреждений, связанных с эксайтотоксичностью, нейровоспалением, окислительным стрессом и апоптозом [57, 77, 78]. При этом рыбы обладают несопоставимо большей способностью к нейрорегенерации за счет интенсивного нейрогенеза — мозг взрослой зебраданио содержит 16 зон активной пролиферации нейронов в сравнении с двумя у млекопитающих [79]. Таким образом, в то время как у млекопитающих ТПМ приводит к перманентному разрушению нейронных связей, аккумуляции вторичных повреждений и образованию глиального рубца, зебраданио способны достаточно быстро регенерировать обширные повреждения без долгосрочных последствий [35]. Раскрытие молекулярных механизмов регенерации мозга у рыб может позволить определить потенциальные терапевтические мишени, способствующие репарации нейронов и функциональному восстановлению при повреждениях ЦНС у человека. Кроме того, сравнительный анализ ответа на травму мозга у зебраданио и млекопитающих может дать ценную информацию о барьерах, препятствующих нейрорегенерации у высших позвоночных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом настоящее исследование показало, что нейротравма конечного мозга зебраданио вызывает когнитивные и моторные нарушения, увеличение экспрессии *isg15* и снижение содержания норадреналина в мозге. Поведенческие изменения, наблюдаемые в настоящей модели, согласуются с таковыми в моделях на млекопитающих и у пациентов с ТПМ, что свидетельствует о ее трансляционном потенциале. Для зебраданио активация экспрессии *isg15* в ответ на травму была показана впервые, что может указывать на наличие эволюционно консервативного механизма ответа на травму ЦНС, опосредованного ISG15. Кроме того, было впервые описано влияние ТПМ на состояние моноаминергических систем зебраданио, что является важным дополнением к существующему описанию нейрохимических изменений в данной модели при нейротравмах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено Этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа поддержана средствами Санкт-Петербургского государственного университета (проект 93020614).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (А.В.К., К.А.Д., Н.П.И.), подготовка черновика статьи (Н.П.И., К.А.Д., Д.С.Г., А.В.К.), редактирование и подготовка финальной версии (Н.П.И., А.В.К.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Антону Шевлякову, Алексею Икрину и Анастасии Москаленко (НТУ “Сириус”) за их помощь в выполнении исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Risdall JE, Menon DK* (2011) Traumatic brain injury. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 366: 241–250.
<https://doi.org/10.1098%2Frstb.2010.0230>
2. *Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung Y-C, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrimme MG, Rubiano AM* (2018) Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 130: 1080–1097.
<https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS17352>
3. *Parikh S, Koch M, Narayan RK* (2007) Traumatic brain injury. *Int Anesthesiol Clin* 45: 119–135.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318078cfe7>
4. *Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE* (2010) Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med* 14: 2381–2392.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x>
5. *Walker KR, Tesco G* (2013) Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci* 5: 29.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00029>
6. *Galea OA, Cottrell MA, Treleaven JM, O’Leary SP* (2018) Sensorimotor and physiological indicators of impairment in mild traumatic brain injury: a meta-analysis. *Neurorehabil Neural Repair* 32: 115–128.
<https://doi.org/10.1177/1545968318760728>
7. *Mallya S, Sutherland J, Pongracic S, Mainland B, Ornstein TJ* (2015) The manifestation of anxiety disorders after traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma* 32: 411–421.
<https://doi.org/10.1089/neu.2014.3504>
8. *Yang C-C, Hua M-S, Lin W-C, Tsai Y-H, Huang S-J* (2012) Irritability following traumatic brain injury: divergent manifestations of annoyance and verbal aggression. *Brain Injury* 26: 1185–1191.
<https://doi.org/10.3109/02699052.2012.666374>
9. *Delic V, Beck KD, Pang KC, Citron BA* (2020) Biological links between traumatic brain injury and Parkinson’s disease. *Acta Neuropathol Commun* 8: 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s40478-020-00924-7>
10. *Ding K, Gupta PK, Diaz-Arrastia R* (2016) Epilepsy after traumatic brain injury. *Transl Res Trauma Brain Injury Chapter* 14.
<https://doi.org/10.1201/b18959-19>
11. *Sivanandam TM, Thakur MK* (2012) Traumatic brain injury: a risk factor for Alzheimer’s disease. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 1376–1381.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.013>
12. *Krishnamurthy K, Laskowitz DT* (2016) Cellular and molecular mechanisms of secondary neuronal injury following traumatic brain injury. *Transl Res Trauma Brain Injury, CRC Press/Taylor and Francis Group / Boca Raton (FL), Chapter* 5.
<https://doi.org/10.1201/b18959-10>
13. *Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A* (2015) Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15: 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11910-015-0545-1>
14. *Hinzman JM, Thomas TC, Quintero JE, Gerhardt GA, Lifshitz J* (2012) Disruptions in the regulation of extracellular glutamate by neurons and glia in the rat striatum two days after diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 29: 1197–1208.
<https://doi.org/10.1089/neu.2011.2261>

15. *Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST* (1993) Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem* 61: 2015–2024.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07437.x>
16. *Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C* (2010) Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg* 113: 564–570.
<https://doi.org/10.3171/2009.12.jns.09689>
17. *Lakshmanan R, Loo JA, Drake T, Leblanc J, Ytterberg AJ, McArthur DL, Etchepare M, Vespa PM* (2010) Metabolic crisis after traumatic brain injury is associated with a novel microdialysis proteome. *Neurocrit Care* 12: 324–336.
<https://doi.org/10.1007/s12028-010-9342-5>
18. *Aiba I, Shuttleworth CW* (2012) Sustained NMDA receptor activation by spreading depolarizations can initiate excitotoxic injury in metabolically compromised neurons. *J Physiol* 590: 5877–5893.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234476>
19. *Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B* (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>
20. *Sattler R, Tymianski M* (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24: 107–129.
<https://doi.org/10.1385/mn.24:1-3:107>
21. *Balu R* (2014) Inflammation and immune system activation after traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14: 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s11910-014-0484-2>
22. *Lehnardt S* (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58: 253–263.
<https://doi.org/10.1002/glia.20928>
23. *Karve IP, Taylor JM, Crack PJ* (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 173: 692–702.
<https://doi.org/10.1111/bph.13125>
24. *Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI* (2014) Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 73: 14–29.
<https://doi.org/10.1097/nen.0000000000000021>
25. *Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV* (2016) Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275: 305–315.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
26. *Landeghem FKV, Weiss T, Oehmichen M, Deimling AV* (2006) Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 23: 1518–1528.
<https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1518>
27. *Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS* (2012) New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammat* 9: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-236>
28. *Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK* (1996) Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- α mRNA in the CNS. *Mol Brain Res* 36: 287–291.
[https://doi.org/10.1016/0169-328x\(95\)00274-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(95)00274-v)
29. *Chio C-C, Chang C-H, Wang C-C, Cheong C-U, Chao C-M, Cheng B-C, Yang C-Z, Chang C-P* (2013) Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing early microglial expression of tumor necrosis factor- α . *BMC Neurosci* 14: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-33>
30. *Lu K-T, Wang Y-W, Yang J-T, Yang Y-L, Chen H-I* (2005) Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 22: 885–895.
<https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.885>
31. *Shohami E, Bass R, Wallach D, Yamin A, Gallily R* (1996) Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF α) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 378–384.
<https://doi.org/10.1097/00004647-199605000-00004>
32. *Babchenko VY, Belova AS, Bashirzade AA, Tikhonova MA, Demin KA, Zabegalov KN, Petersen EV, Kalueff AV, Amstislavskaya TG* (2022) Traumatic brain injury models in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Behav Physiol* 52: 405–414.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0777>
33. *Zulazmi NA, Arulsamy A, Ali I, Zainal Abidin SA, Othman I, Shaikh MF* (2021) The utilization of small non-mammals in traumatic brain injury research: A systematic review. *CNS Neurosci Ther* 27: 381–402.
<https://doi.org/10.1111/cns.13590>

34. Westerfield M (2007) The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*).
35. Schmidt R, Beil T, Strähle U, Rastegar S (2014) Stab wound injury of the zebrafish adult telencephalon: a method to investigate vertebrate brain neurogenesis and regeneration. J Vis Exp 90: e51753. <https://doi.org/10.3791/51753>
36. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT (2007) Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. Physiol Behav 90: 54–58. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1718v2>
37. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavella PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. Behav Brain Res 205: 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
38. Cleal M, Fontana BD, Ranson DC, McBride SD, Swinny JD, Redhead ES, Parker MO (2021) The Free-movement pattern Y-maze: A cross-species measure of working memory and executive function. Behav Res Methods 53: 536–557. <https://doi.org/10.3758/s13428-020-01452-x>
39. Fontana BD, Cleal M, Clay JM, Parker MO (2019) Zebrafish (*Danio rerio*) behavioral laterality predicts increased short-term avoidance memory but not stress-reactivity responses. Anim Cogn 22: 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01296-9>
40. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. Methods 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
41. Alburges ME, Narang N, Wamsley JK (1993) A sensitive and rapid HPLC-ECD method for the simultaneous analysis of norepinephrine, dopamine, serotonin and their primary metabolites in brain tissue. Biomed Chromatogr 7: 306–310. <https://doi.org/10.1002/bmc.1130070605>
42. Fontana BD, Cleal M, Gibbon AJ, McBride SD, Parker MO (2021) The effects of two stressors on working memory and cognitive flexibility in zebrafish (*Danio rerio*): the protective role of D1/D5 agonist on stress responses. Neuropharmacology 196: 108681. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108681>
43. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, Duckworth JL, Head BP (2017) Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. Cell Mol Neurobiol 37: 571–585. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0400-1>
44. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT (2019) A review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury. World Neurosurg 131: 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
45. Akamatsu Y, Hanafy KA (2020) Cell death and recovery in traumatic brain injury. Neurotherapeutics 17: 446–456. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00840-7>
46. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH (1999) Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. FASEB J 13: 813–821. <https://doi.org/10.1097/00008506-200007000-00019>
47. Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD (2007) Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. Int J Legal Med 121: 365–375. <https://doi.org/10.1007/s00414-006-0126-6>
48. Ng I, Yeo T-T, Tang W-Y, Soong R, Ng P-Y, Smith DR (2000) Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. Neurosurgery 46: 949–956. <https://doi.org/10.1227/00006123-200004000-00034>
49. Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC, Clark RS (2003) Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. FASEB J 17: 1367–1369. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1067fje>
50. Zhang X, Alber S, Watkins SC, Kochanek PM, Marion DW, Graham SH, Clark RS (2006) Proteolysis consistent with activation of caspase-7 after severe traumatic brain injury in humans. J Neurotrauma 23: 1583–1590. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1583>
51. McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2015) Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 7: 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
52. Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10964–10967. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.10964>
53. Kenny EM, Fidan E, Yang Q, Anthonymuthu TS, New LA, Meyer EA, Wang H, Kochanek PM, Dixon CE, Kagan VE (2019) Ferroptosis contributes to neuronal death and functional outcome

- after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 47: 410.
<https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000003555>
54. Zhang L, Wang H (2018) Autophagy in traumatic brain injury: a new target for therapeutic intervention. *Front Mol Neurosci* 11: 190.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00190>
 55. Zhao P, Li C, Chen B, Sun G, Chao H, Tu Y, Bao Z, Fan L, Du X, Ji J (2020) Up-regulation of CHMP4B alleviates microglial necroptosis induced by traumatic brain injury. *J Cell Mol Med* 24: 8466–8479.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15406>
 56. Chaoul V, Awad M, Harb F, Najjar F, Hamade A, Nabout R, Soueid J (2022) Saffron Extract Attenuates Anxiogenic Effect and Improves Cognitive Behavior in an Adult Zebrafish Model of Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 23: 11600.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911600>
 57. McCutcheon V, Park E, Liu E, Sobhebidari P, Tavakkoli J, Wen X-Y, Baker AJ (2017) A novel model of traumatic brain injury in adult zebrafish demonstrates response to injury and treatment comparable with mammalian models. *J Neurotrauma* 34: 1382–1393.
<https://doi.org/10.1089/neu.2016.4497>
 58. Tikhonova MA, Maslov NA, Bashirzade AA, Nehoroshev EV, Babchenko VY, Chizhova ND, Tsiulskaya EO, Akopyan AA, Markova EV, Yang Y-L (2022) A novel laser-based zebrafish model for studying traumatic brain injury and its molecular targets. *Pharmaceutics* 14: 1751.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081751>
 59. Chou A, Krukowski K, Jopson T, Zhu PJ, Costa-Mattioli M, Walter P, Rosi S (2017) Inhibition of the integrated stress response reverses cognitive deficits after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E6420–E6426.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1707661114>
 60. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, McIntosh TK (2004) Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 365–378.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.002>
 61. Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz J, Mullins P, Pick C (2003) Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 118: 949–955.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00048-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00048-4)
 62. Mirzalieva O, Juncker M, Schwartzburg J, Desai S (2022) ISG15 and ISGylation in human diseases. *Cells* 11: 538.
<https://doi.org/10.3390/cells11030538>
 63. Nakka VP, Mohammed AQ (2020) A critical role for ISGylation, ubiquitination and, SUMOylation in brain damage: implications for neuroprotection. *Neurochem Res* 45: 1975–1985.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03066-3>
 64. Kang JA, Kim YJ, Jeon YJ (2022) The diverse repertoire of ISG15: More intricate than initially thought. *Exp Mol Med* 54: 1779–1792.
<https://doi.org/10.1038/s12276-022-00872-3>
 65. Demirci Y, Cucun G, Poyraz YK, Mohammed S, Heger G, Papatheodorou I, Ozhan G (2020) Comparative transcriptome analysis of the regenerating zebrafish telencephalon unravels a resource with key pathways during two early stages and activation of wnt/ β -catenin signaling at the early wound healing stage. *Front Cell Dev Biol* 8: 584604.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584604>
 66. Kanagaraj P, Chen JY, Skaggs K, Qadeer Y, Connors M, Cutler N, Richmond J, Kommidi V, Poles A, Afrunti D (2020) Microglia stimulate zebrafish brain repair via a tumor necrosis factor- α -initiated inflammatory cascade. *BioRxiv* 2020–10.
<https://doi.org/10.1101/2020.10.08.330662>
 67. Yin G, Du M, Li R, Li K, Huang X, Duan D, Ai X, Yao F, Zhang L, Hu Z (2018) Glia maturation factor beta is required for reactive gliosis after traumatic brain injury in zebrafish. *Exp Neurol* 305: 129–138.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.008>
 68. Knoblach SM, Fan L, Faden AI (1999) Early neuronal expression of tumor necrosis factor- α after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 95: 115–125.
[https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00273-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00273-2)
 69. Glushakova OY, Glushakov AO, Borlongan CV, Valadka AB, Hayes RL, Glushakov AV (2018) Role of caspase-3-mediated apoptosis in chronic caspase-3-cleaved tau accumulation and blood–brain barrier damage in the corpus callosum after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 35: 157–173.
<https://doi.org/10.1089/neu.2017.4999>
 70. Kaneko Y, Tajiri N, Yu S, Hayashi T, Stahl CE, Bae E, Mestre H, Franzese N, Rodrigues Jr A, Rodrigues MC (2012) Nestin overexpression precedes caspase-3 upregulation in rats exposed to controlled cortical impact traumatic brain injury. *Cell Med* 4: 55–63.
<https://doi.org/10.3727/215517912x639306>

71. Ringger NC, Tolentino PJ, McKinsey DM, Pike BR, Wang KKW, Hayes RL (2004) Effects of injury severity on regional and temporal mRNA expression levels of calpains and caspases after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 21: 829–841.
<https://doi.org/10.1089/0897715041526177>
72. Schweitzer J, Löhr H, Filippi A, Driever W (2012) Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72: 256–268.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20911>
73. Jenkins PO, Mehta MA, Sharp DJ (2016) Catecholamines and cognition after traumatic brain injury. *Brain* 139: 2345–2371.
<https://doi.org/10.1093/brain/aww128>
74. Wang Q, Oyarzabal EA, Song S, Wilson B, Santos JH, Hong J-S (2020) Locus coeruleus neurons are most sensitive to chronic neuroinflammation-induced neurodegeneration. *Brain Behav Immun* 87: 359–368.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.01.003>
75. Bueno-Nava A, Montes S, DelaGarza-Montano P, Alfaro-Rodriguez A, Ortiz A, Gonzalez-Pina R (2008) Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats. *Neurosci Lett* 443: 32–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.046>
76. Bari BA, Chokshi V, Schmidt K (2020) Locus coeruleus-norepinephrine: basic functions and insights into Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 15: 1006.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.270297>
77. Kyritsis N, Kizil C, Zocher S, Kroehne V, Kaslin J, Freudenreich D, Iltzsche A, Brand M (2012) Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338: 1353–1356.
<https://doi.org/10.1126/science.1228773>
78. Anand SK, Sahu MR, Mondal AC (2021) Induction of oxidative stress and apoptosis in the injured brain: potential relevance to brain regeneration in zebrafish. *Mol Biol Rep* 48: 5099–5108.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-549302/v1>
79. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Dev* 8: 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>

Behavioral, Genomic and Neurochemical Deficits Evoked by Neurotrauma in Adult Zebrafish (*Danio rerio*)

N. P. Ilyin^{a, b, c}, D. S. Galstyan^{a, b, c}, K. A. Demin^{a, b}, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, *}

^a*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^b*Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia*

^c*Granov Russian Scientific Research Center for Radiology and Surgical Technologies,
St. Petersburg, Russia*

^d*Division of Neurobiology, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Russia*

^e*Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia*

*e-mail: avkalueff@gmail.com

Traumatic brain injury (TBI) is a serious biomedical problem with high prevalence and mortality risks. Understanding TBI in traditional (e.g., rodent) animal models often presents challenges due to the complexity of their brain and its limited regenerative capabilities. Here, we present novel data obtained using the zebrafish TBI model based on a stab wound of telencephalon, aiming to investigate behavioral and molecular consequences of TBI in zebrafish. Four days following the injury, adult zebrafish displayed hypolocomotion in the novel seen tank test and impaired working memory in the Y-maze test, paralleling behavioral deficits in rodent models and human TBI patients. Molecular analyses of key genes involved in the inflammatory response and cell death pathways revealed a remarkable upregulation of the interferon-stimulated gene 15 (*isg15*) in the injured telencephalon, a general biomarker for neuronal damage. Furthermore, noradrenaline (but not dopamine or serotonin) levels in whole-brain tissue declined following TBI, likely contributing to the observed cognitive deficits and implicating neurotransmitter dysregulation in TBI pathogenesis.

Keywords: traumatic brain injury, zebrafish, telencephalon, behavior, noradrenaline, *isg15*