



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 94–103

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 94–103

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-94-103>, EDN: FSIHWE

Научная статья

УДК 612.42[577.725]

Молекулярные механизмы звукового открытия гематоэнцефалического барьера у грызунов



Е. И. Саранцева ✉, Т. Д. Искра, О. В. Семячкина-Глушковская

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Саранцева Елена Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, sophora68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3507-7708>

Искра Татьяна Дмитриевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, tata-isk@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1895-8159>

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, glushkovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>

Аннотация. В экспериментах на 35 здоровых мышах-самцах линии C57BL/6 весом 25 ± 3 г было показано, что громкие звук/музыка в течение 2 ч вызывают временное повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера у грызунов. Для исследования изменений проницаемости гематоэнцефалического барьера были исследованы молекулярные механизмы, ответственные за его открытие с помощью лазерной спекл-контрастной визуализации регионального мозгового кровотока (rCBF), иммуногистохимического анализа и биохимического анализа адреналина в плазме крови. При звукозависимом повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера наблюдалось снижение интенсивности сигнала со стороны CLND-5, Oсс, JAM и повышение сигнала от ZO-1. Однако уже через 4 ч наблюдалось восстановление интенсивности сигнала от изучаемых белков, что может быть связано с их интернализацией. Результаты исследования о музыкально-звуковом открытии гематоэнцефалического барьера в интактном мозге требуют пересмотра традиционных знаний о барьерных функциях мозга и открывают новые возможности неинвазивных стратегий доставки лекарственных средств. Это может дать некоторое представление об этиологии расстройств головного мозга, которые возникают в результате непреднамеренного или преднамеренного воздействия очень громких звуков, например, боевых действий или рок-концертов.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, белки плотных контактов, лазерная спекл-контрастная визуализация, региональный мозговой кровоток, иммуногистохимический анализ

Для цитирования: Саранцева Е. И., Искра Т. Д., Семячкина-Глушковская О. В. Молекулярные механизмы звукового открытия гематоэнцефалического барьера у грызунов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 94–103. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-94-103>, EDN: FSIHWE

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Molecular mechanisms of the opening of the blood-brain barrier in rodents by means of sound

E. I. Sarantseva ✉, T. D. Iskra, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Elena I. Sarantseva, sophora68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3507-7708>

Tatyana D. Iskra, tata-isk@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1895-8159>

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, glushkovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>

Abstract. In this study, in experiments on 35 healthy male mice of the C57BL/6 line weighing 25 ± 3 g, it was shown that loud sound/music for 2 hours causes a temporary increase in the permeability of the blood-brain barrier (BBB) in rodents. To investigate changes in the permeability of the blood-brain barrier, the molecular mechanisms responsible for its discovery were investigated using laser speckle-contrast imaging of regional cerebral blood flow (rCBF), immunohistochemical analysis and biochemical analysis of adrenaline in blood plasma. With a sound-dependent increase in the permeability of the blood-brain barrier, there was a decrease in signal intensity from CLND-5, Oсс, JAM and an increase in the signal from ZO-1. However, after 4 hours, the signal intensity from the studied proteins was restored, which may be due to their internalization. The results of the study of the effects of music and sound on of BBB in the intact brain require a revision of



traditional knowledge about the barrier functions of the brain and open up new opportunities for non-invasive drug delivery strategies. They also may offer some insight into the etiology of brain disorders that follow inadvertent or deliberate exposure to very loud sounds, i.e. battle or rock concerts.

Keywords: blood-brain barrier, tight junction (TJ) assembly, laser speckle-contrast imaging regional Cerebral Blood Flow (rCBF), immunohistochemical analysis

For citation: Sarantseva E. I., Iskra T. D., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Molecular mechanisms of the opening of the blood-brain barrier in rodents by means of sound. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 94–103 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-94-103>, EDN: FSIHWE

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является серьезным препятствием для проникновения многих лекарственных средств в мозг. Поэтому неврологические расстройства, вызывающие инвалидность у миллиарда человек во всем мире, трудно поддаются лечению. Адресная доставка терапевтических средств к очагам заболевания была и остается одной из самых больших задач в медицине, поскольку она определяет эффективность применения многих лекарственных препаратов [1].

Гематоэнцефалический барьер является специфическим структурным образованием, необходимым для нормального функционирования мозга. Он препятствует поступлению макро- и микромолекул из крови в мозг для поддержания его гомеостаза. За счет физиологических и физико-химических механизмов структуры гематоэнцефалического барьера функционируют как единое целое и регулируют потоки веществ между кровью и тканями мозга [2]. Эта особенность позволяет пересмотреть уже известные пути доставки некоторых лекарственных препаратов в мозг, а также открывает большие возможности для новых стратегий, которые могут применяться в повседневной клинической практике для лечения болезней центральной нервной системы.

Не так давно было предложено более 70 различных методов обхода ГЭБ, включая интраназальную доставку лекарств [3], фотодинамические эффекты [4] или прямую внутричерепную инфузию [5]. Однако эти методы имеют ограничения для клинического применения из-за отсутствия специфичности, инвазивности или недостаточной концентрации препарата в ткани головного мозга. В настоящее время у людей изучены только два подхода к открытию ГЭБ. Первый из них – внутриартериальная инфузия маннита для химиотерапии, сопровождающаяся вскрытием ГЭБ у пациентов с первичной лимфомой ЦНС [6]. Второй – открытие гематоэн-

цефалического барьера у пациентов с болезнью Альцгеймера с помощью МР-направленного сфокусированного ультразвука [7]. Однако эти методы являются инвазивными и могут быть выполнены только высокопрофессиональными врачами со специальными препаратами в немногих неврологических центрах. Именно поэтому целью настоящих исследований стала разработка неинвазивных и легко выполняемых подходов для безопасной доставки лекарств в мозг в повседневной клинической практике, что по-прежнему является очень важным мероприятием для инновационных методов терапии заболеваний головного мозга. Молекулярные механизмы, лежащие в основе проницаемости гематоэнцефалического барьера, позволяют восстанавливать защитную функцию мозга после звукового воздействия. Особое внимание в данном случае привлекает громкая музыка и звук как естественный физический фактор, влияющий на проницаемость гематоэнцефалического барьера у мышей.

Материалы и методы

Объекты исследования. Исследования были выполнены на 35 мышах-самцах линии C57BL/6 весом 25 ± 3 г. Эксперименты проводились в пяти группах мышей: I – без музыки, контрольная группа; II – сразу после воздействия музыкой; III, IV, V – экспериментальные группы, включающие мышей через 1, 4 и 24 ч после воздействия музыки соответственно. $N = 7$ в каждой группе. Для наркотизации мышей использовали 2% изофлуран при 1л/мин $N_2O/O_2 - 70:30$.

Все процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Период адаптации животных к условиям содержания составлял не менее 7 дней. Протокол экспериментов одобрен Комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол № 13 от 07.02.2017 г.).



Музыкальная композиция Scorpions “Still loving you” использовалась для демонстрации эффекта громкой музыки (рис. 1).

Частотный диапазон музыки был рассчитан с использованием бесплатного программного

обеспечения для обработки звука (Audacity®).

Для получения громкого звука (70–90–100 дБ, 370 Гц) использовался звуковой динамик (7А, 12 В, ПАО «Авто ВАЗ», Тольятти, Россия) (рис. 2).

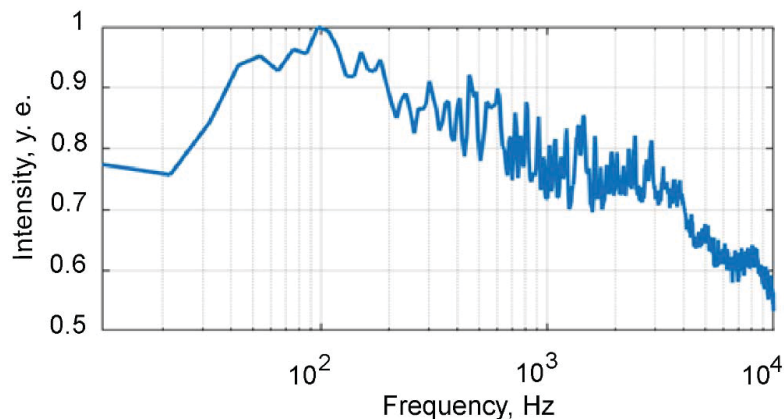


Рис. 1. Частотный диапазон музыки (Scorpions, Still Loving You), частоты в диапазоне 100–10 000 Гц и максимальная интенсивность около 100 дБ
Fig. 1. Frequency range of music (Scorpions, Still Loving You) frequencies in the range of 100–10 000 Hz and a maximum intensity of about 100 dB

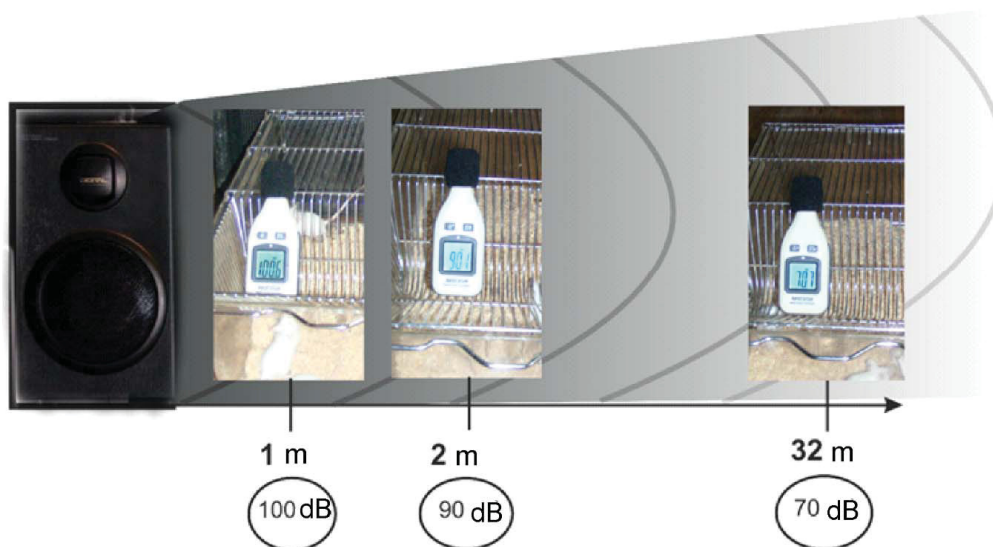


Рис. 2. Демонстрация эксперимента на мышах с применением громкого звука или музыки для открытия ГЭБ. Клетки размещали на заранее рассчитанных расстояниях от источника звука (100 дБ = 1 м, 90 дБ = 4 м и 70 дБ = 32 м)

Fig. 2. Demonstration of an experiment on mice using loud sound or music to open the BBB. The animal cages were placed at pre-calculated distances from the sound source (100 dB = 1 m, 90 dB = 4 m and 70 dB = 32 m)

Повторяющаяся экспозиция музыки/звука выполнялась с использованием последовательности: 60 с – звук включен, затем 60 с – звук выключен в течение 2 ч. Уровень звука измеряли непосредственно в клетке с животными с помощью шумомера (Мегеон 92130, Россия).

За три дня до экспериментов в бедренную вену был имплантирован полиэтиленовый катетер для внутривенного введения красителя *Evan Blue* бодрствующим мышам. Имплантация катетера проводилась под наркозом. До или через 1 ч/4 ч/24 ч после музыкальных/звуко-



вых вмешательств вводили краситель *Evans Blue*, который циркулировал в крови в течение 30 мин в соответствии с рекомендуемым протоколом [8]. По истечении времени циркуляции красителя мышей декапитировали, их мозг и кровь быстро собирали и помещали на лед (во время сбора крови антикоагуляция не использовалась). Перед удалением мозг был перфузирован физиологическим раствором, чтобы вымыть остатки красителя в сосудах головного мозга.

Флуоресцентный микроскоп использовался для визуализации экстравазации *Evans Blue* из сосудов головного мозга в его ткани через оптически очищенное окно черепа [9].

Лазерная спекл-контрастная визуализация регионального мозгового кровотока (rCBF). Изготовленная на заказ система лазерной спекл-контрастной визуализации использовалась для мониторинга rCBF до и через 1 ч / 4 ч после звукового воздействия у 7 мышей под ингаляционной анестезией (2% изофлурана, 70% N₂O и 30% O₂) через оптически очищенное окно черепа (диаметр: 5 мм) с использованием метода оптического очищения FDISCO, подробно описанного у Q. Yisong с соавторами 2019 [9]. Голова мыши была выбрита, по средней линии был сделан разрез. Затем скальп удаляли и поверхность черепа высушивали чистым сжатым воздухом. С помощью просветлителей изготавливали оптическое окно.

Свет от одномодового He-Ne лазера (Thorlabs, HNL210L, 632,8 нм, 21 МВт) был направлен в оптическое окно с одномодовой поляризацией (Thorlabs, P3-630PM-FC-1). Угол падения луча был установлен приблизительно на 45°. Полученный колеблющийся узор спеклов был проанализирован с помощью объектива Computar M1614-MP2 с одним удлинительным кольцом для увеличения, близкого к единице. F-stop для объектива был установлен на f/6, чтобы получить отношение спекла к пикселю около 15. Дополнительно использовалась металлооксидно-полупроводниковая (КМОП) камера Basler acA2500-14 gm с площадью пикселя 2,2 × 2,2 мкм². Частота кадров записанной последовательности составляла 40 кадров в секунду. Пространственный контраст спеклов был рассчитан с использованием отношения между стандартным отклонением и средним значением флуктуаций интенсивности в пределах скользящих окон размером 5 × 5 пикселей. Пятьдесят последовательных кадров спекл-контраста

были усреднены, чтобы улучшить соотношение сигнал/шум. Алгоритм автоматической сегментации использовался для вычисления среднего значения CBF на макро- (в сагиттальном синусе) и микроуровнях [10].

Иммуногистохимический анализ. Мышей в контрольной группе (до звука, $n = 7$) и в экспериментальных группах через 1–4–24 ч после воздействия звука ($n = 7$ в каждой группе) подвергали эвтаназии с помощью внутрибрюшинной инъекции смертельной дозы кетамина и ксилазина и внутрисердечной перфузии 0,1 М PBS в течение 5 мин. После чего мозг извлекали и фиксировали в 4% забуференном параформальдегиде в течение одного дня и в 20% сахарозе в течение еще одного дня.

Экспрессию антигенов на свободно плавающих срезах оценивали с использованием стандартного метода одновременного комбинированного окрашивания (протокол Abcam). Срезы мозга (50 мкм) фиксировали в 150 мкл 10% BSA/0,2% Triton X-100/PBS в течение 2 ч, затем инкубировали в течение ночи при 4°C и 2 ч при комнатной температуре с мышинным Rb-антителом к бета-2-адренорецепторам (1:500; Abcam, ab182136, Кембридж, США); Rb-антителом мышинового бета-аррестина 1 (1:500; Abcam, ab32099, Кембридж, США); CLND-5 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, sc-28670, Санта-Крус, США); ZO-1 (1:500; Биотехнология Санта-Крус, sc-8147, Санта-Крус, США); Occ (1:500; Abcam, ab58803, Кембридж, США); JAM (1:500, Abcam, ab1316, Кембридж, США). После нескольких промывок в PBS предметные стекла инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре с флуоресцентно мечеными вторичными антителами на 1% BSA/0,2% Triton X-100/PBS (1:500; Goat A/Rb, Alexa 555- Abcam, Великобритания, ab150078). Конфокальную микроскопию коры головного мозга мышей проводили с использованием полностью автоматизированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV10i-W (Olympus, Япония). ImageJ использовался для обработки и анализа данных изображений. Площади экспрессии антигенов были рассчитаны с помощью плагина «Анализировать частицы» на вкладке «Анализ», который вычисляет общую площадь антиген-экспрессирующих элементов ткани – показатель «Общая площадь». Во всех случаях были проанализированы 10 областей.



Биохимические анализы адреналина в плазме крови. Уровень адреналина в плазме (нг/мл) определяли с помощью наборов ELISA (Abnova, Тайвань) в нормальном состоянии (до звука), во время звукового стресса (в последнюю минуту (120 мин) звукового стресса) и в пост-стрессовый период (1 ч и 4 ч после звукового воздействия) у мышей ($n = 7$ в каждой группе). Пластины считывали при 450 нм с помощью устройства для считывания пластин ELx 800 (BioTek Instruments Inc.). Пределы обнаружения составляли 0,3 нг/мл (с коэффициентами вариации внутри и между анализами 11,2–16,3% и 8,7–12,6% соответственно).

Методика открытия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Для изучения звукового воздействия на ГЭБ была выбрана максимальная сила звука 100 дБ. С целью сравнения использовали звук 90 дБ, т.е. на порог ниже. Интенсивность звука 70 дБ была выбрана как минимальная точка.

На рис. 3 представлена схема проведения тестов по анализу звуко-зависимого открытия ГЭБ с применением в качестве маркера альбуминового комплекса *Evans Blue* (EBAC) проницаемости эндотелия церебральных сосудов с указанием времени их введения и забора мозга в опытах *ex vivo* и *in vivo*.

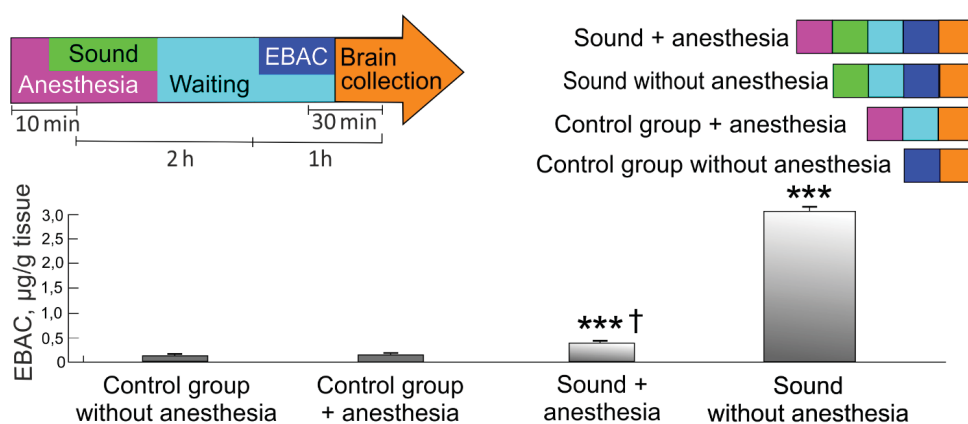


Рис. 3. Схема тестирования звукозависимого открытия ГЭБ с применением EBAC в опытах *ex vivo* (цвет онлайн)

Fig. 3. Testing scheme of sound-dependent BBB opening using EBAC in *ex vivo* experiments (color online)

Время воздействия звука во всех сериях экспериментов составляло 2 ч, но с периодичностью прослушивания звука 60 с и 60 с – пауза. Такой подход обусловлен тем, что в соответствии с рекомендациями для звука силой 90 дБ максимально возможное время непрерывного прослушивания составляет 2 ч, для 100 дБ – всего 15 мин. Однако в предварительных исследованиях с применением спектрофлуориметрического анализа экстравазации EBAC из церебральных сосудов в ткани мозга не показано повышения проницаемости ГЭБ при 15 мин и даже при 1-часовом воздействии звука 100 дБ. Чтобы адаптировать безопасное воздействие звука на мышей с применением разной его силы, был выбран алгоритм прерывного прослушивания звука на протяжении 2 ч. Уровень звука измеряли непосредственно в клетке животных с помощью измерителя уровня звука (Мегеон 92130, Россия).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Пространственный спекл-контраст был рассчитан с использованием отношения стандартного отклонения к среднему значению флуктуаций интенсивности в скользящих окнах 5×5 пикселей. Пятьдесят последовательных спекл-контрастных кадров были усреднены, чтобы улучшить отношение сигнал/шум. Автоматический алгоритм сегментации, описанный в работе [11], использовался для расчета среднего значения мозгового кровотока на макро- (в сагитальной синусе) и микроуровнях.

Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Отличия от исходного уровня в той же группе были оценены с помощью теста Вилкоксона. Межгрупповые различия оценивались с использованием критерия Манна – Уитни и ANOVA-2 (последующий анализ с ранго-



вым тестом Дункана). Уровни значимости были установлены на $p < 0,05-0,001$ для всех анализов.

Результаты и их обсуждение

Влияние громкого звука на мышей является стрессорным фактором. Было установлено, что сразу после звукового воздействия (через 2 ч воздействия звука) уровень адреналина в

плазме был в 7 раз выше по сравнению с нормальным состоянием ($23,1 \pm 2,7$ нг/мл против $3,3 \pm 0,9$ нг/мл, $p < 0,001$) (рис. 4). Однако через 1 ч после звукового воздействия уровень адреналина существенно снижался до $8,7 \pm 2,7$ нг/мл ($p < 0,001$), что, тем не менее, было выше базальных значений. Через 4 ч в момент восстановления барьерной функции мозга уровень гормона был в пределах нормы.

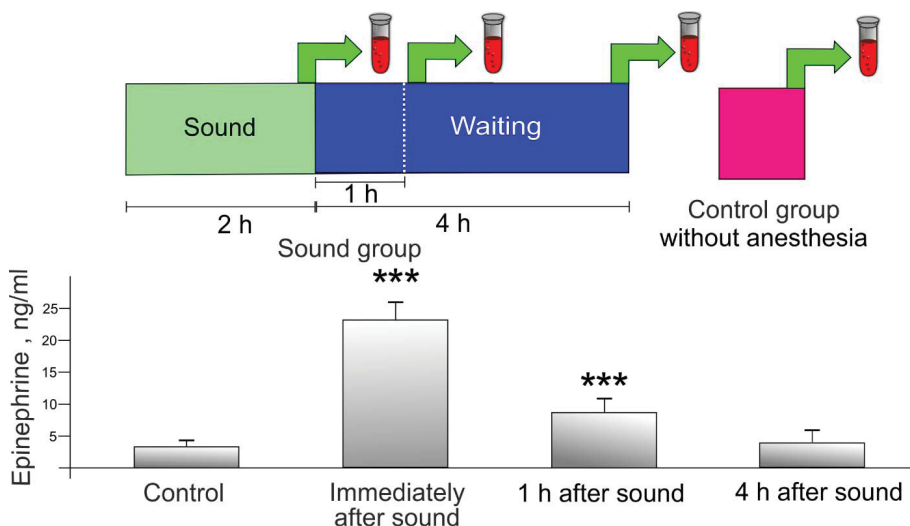


Рис. 4. Уровень адреналина в крови до и после звукового воздействия на ГЭБ у мышей: *** – $p < 0,05$ относительно контроля; † – $p < 0,05$ между экспериментальными группами, ($n = 7$) для каждой группы (цвет онлайн)

Fig. 4. The level of adrenaline in the blood before and after sound exposure on BBB in mice: *** – $p < 0,05$ relative to control; † – $p < 0,05$ between experimental groups, ($n = 7$) for each group (color online)

Было изучено состояние проницаемости ГЭБ к ЕВАС в условиях острого (иммобилизация в течение 2 ч) стресса. Результаты выявили, что острый стресс не приводит к изменению проницаемости ГЭБ сразу по окончании стресса и через 1, 4 и 24 ч после его отмены по сравнению с контрольной группой ($0,15 \pm 0,01$ мкг/г, $0,12 \pm 0,08$ мкг/г, $0,11 \pm 0,02$ мкг/г, ($0,15 \pm 0,05$ мкг/г и $0,11 \pm 0,07$ мкг/г соответственно, $n = 7$ в каждой группе).

Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что острый стресс не вызывает повышения проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям и молекулярные механизмы целостности ГЭБ не нарушаются, что было также показано в исследованиях на людях [11].

Сразу после звукового воздействия и через 1 ч после снятия звукового стресса мы наблюдали повышенный уровень адреналина и rCBF по сравнению с нормальным состоянием. Различные

стрессовые события, по-видимому, имеют общий адренергический механизм повышения rCBF и энергетического обмена [12]. Адренергический механизм вызванных стрессом изменений СВФ включает стимуляцию бета-2-адренергических рецепторов (B2-ADR) либо адреналином, секретруемым мозговым веществом надпочечников, либо, возможно, эндогенным норадреналином головного мозга [13]. Бета-аррестин-1 (ARRB1) является мембранным кофактором активации B2-ADR, играющим важную роль в сосудистых реакциях на стресс, а также важным адапторным белком, регулирующим проницаемость эндотелия и сборку плотных соединений [14, 15]. Принимая во внимание эти факты, на следующем этапе изучали влияние звука (100 дБ, 370 Гц, продолжительность 2 ч: 60 с – звук; 60 с – пауза) на комплекс белков плотных контактов (TJs), таких как клаудин-5 (CLDN-5), окклюдин (Occl), молекула адгезии (JAM) и зонала один (ZO-1) в тканях мозга (рис. 5).

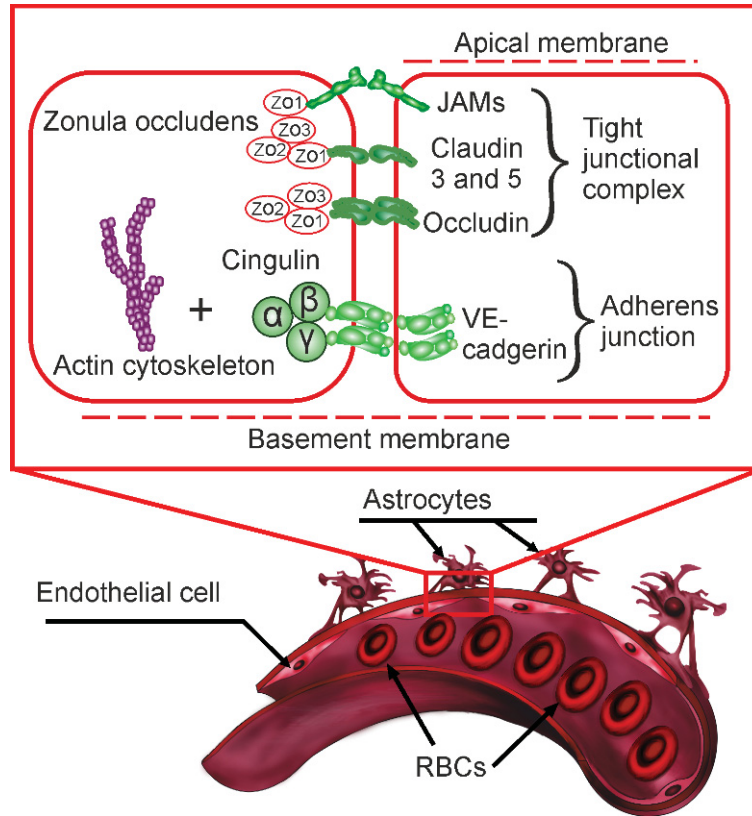


Рис. 5. Схема молекулярной структуры гематоэнцефалического барьера
Fig. 5. Diagram of the molecular structure of the blood-brain barrier

Данные на рис. 6 показывают, что сразу и через 1 ч после звукового воздействия, в момент открытия ГЭБ, наблюдалось снижение интенсивности сигнала от CLDN-5, Осс и JAM, а также

его увеличение со стороны ZO-1, сопровождаемое повышением уровня адреналина и rCBF по сравнению с нормальным состоянием, что свидетельствует о дезорганизации сборки TJ.

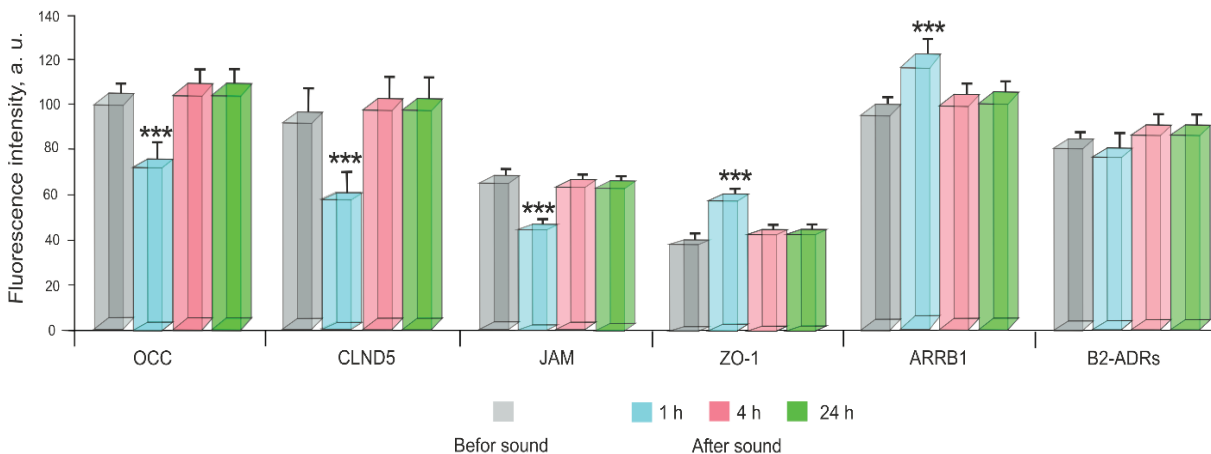


Рис. 6. Экспрессия молекулярных факторов регуляции проницаемости эндотелия в контрольной группе (до воздействия звука) и через 1–4–24 ч после звукового воздействия ($n = 7$ для каждой группы): *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (до воздействия звука) (цвет online)

Fig. 6. The expression of molecular factors of regulation of endothelial permeability in the control group (before sound exposure) and 1–4–24 hrs after sound impact ($n = 7$ for each group): *** – $p < 0,001$ vs. the control group (before sound) (color online)



Эти изменения были связаны со значительным повышением экспрессии ARRB1, вероятно, как компенсаторный механизм, который был показан в ситуациях с открытием ГЭБ после инсульта [16] и разрушением эндотелиального барьера тромбином [17]. Также можно предположить, что ARRB1 «останавливает» экспрессию CLND-5, Осс, JAM, стимулируя его интернализацию. Потеря поверхности белков TJ в пространстве между эндотелиальными клетками может быть одним из механизмов, лежащих в основе индуцированного звуком открытия ГЭБ.

Через 4 и 24 ч после действия звука интенсивность сигнала от изучаемых белков не отличалась от нормы до воздействия звука, что свидетельствует о быстром восстановлении комплекса

TJs. Экспрессия B2-ADR не изменилась во всех тестируемых группах, что позволяет предположить, что внешняя B2-ADR-адренергическая сигнальная система остается нормальной во время индуцированного звуком открытия ГЭБ.

Таким образом, открытие ГЭБ, индуцированное звуковым воздействием, сопровождается дезорганизацией TJ белков в пораженных эндотелиальных клетках головного мозга, что, однако, быстро восстанавливается.

Следующая серия опытов показала изменения церебрального кровотока до и после воздействия звуком (100 дБ, 370 Гц, продолжительность 2 ч: 60 с – звук; 60 с – пауза) с применением лазерной спекл-визуализации. Результаты исследований представлены на рис. 7.

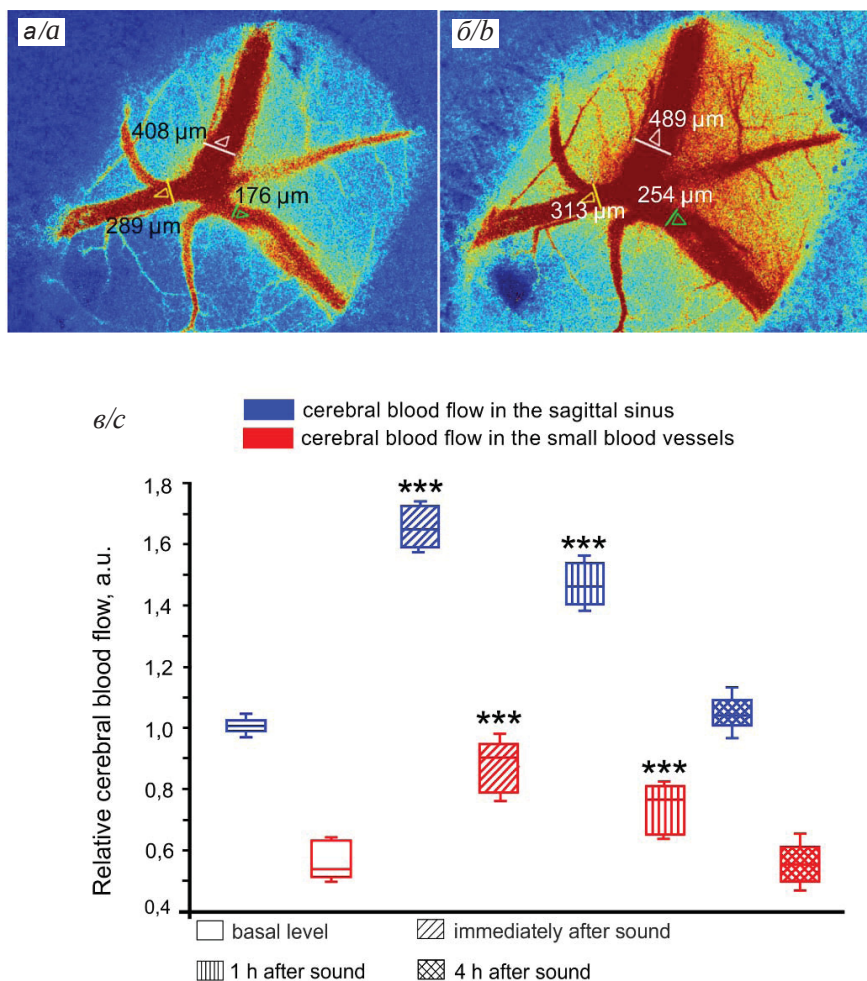


Рис. 7. Лазерная спекл-визуализация мозгового кровотока у мышей под воздействием музыки на венозном и микроциркуляторном уровнях: *** – $p < 0,001$ по сравнению с исходным уровнем мозгового кровотока (перед воздействием музыки), ($n = 7$) для каждой группы (цвет онлайн)

Fig. 7. Laser speckle imaging of cerebral blood flow in mice under the influence of music at the venous and microcirculatory levels: *** – $p < 0,001$ compared to the baseline level of cerebral blood flow (before exposure to music), ($n = 7$) for each group (color online)



Сразу после звуковых эффектов и через 1 ч воздействия музыкой церебральный кровоток был высоким, как на уровне венозного, так и микроциркуляторного уровня ($1,69 \pm 0,04$ усл.ед. против $1,03 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,001$ для сагиттального синуса и $0,91 \pm 0,07$ усл. ед. против $0,52 \pm 0,01$ усл. ед., $p < 0,001$).

Через 1 ч после отмены стресса в момент, когда ГЭБ открывался, отмечалась тенденция к снижению кровотока мозга, который, однако, оставался высоким по сравнению с нормой ($1,69 \pm 0,03$ усл. ед. против $1,03 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,001$ для сагиттального синуса и $0,80 \pm 0,02$ усл. ед. против $0,52 \pm 0,01$ усл. ед., $p < 0,001$) для микрососудов.

Через 4 ч после отмены стресса в момент нормализации ГЭБ отмечалось восстановление кровотока мозга ($1,08 \pm 0,07$ усл. ед. против $1,03 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,01$ для сагиттального синуса и $0,56 \pm 0,09$ усл. ед. против $0,52 \pm 0,01$ усл. ед., $p < 0,001$) для микрососудов.

Заключение

Звукозависимое повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера является обратимым и безопасным, что проявляется в быстром восстановлении барьерной функции мозга (через 4 ч после звукового воздействия) с сохранением нормальной функции гематоэнцефалического барьера на следующие сутки. Острый стресс не влияет на повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера. При звукозависимом повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера наблюдалось снижение интенсивности сигнала со стороны CLND-5, Осс, JAM и повышение сигнала от ZO-1. Однако уже через 4 ч наблюдалось восстановление интенсивности сигнала от изучаемых белков, что может быть связано с их интернализацией.

В момент открытия гематоэнцефалического барьера отмечается повышение кровотока мозга на микро- и макроуровнях, что сопровождается дилатацией сагиттального синуса.

Таким образом, звук оказывает существенное влияние на тонус церебральных сосудов, производя релаксирующие эффекты, что сопровождается обратимой дезорганизацией комплекса белков плотных контактов. Это также может дать некоторое представление об этиологии расстройств головного мозга, которые возникают в результате непреднамеренного или преднамеренного воздействия очень громких звуков, например, боевых действий или рок-концертов.

Список литературы

1. Ronaldson P., Davis T. Regulation of blood-brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2020. Vol. 40. P. 10–12. <https://doi.org/10.1177/0271678X20951995>
2. Banks W. From blood-brain barrier to blood-brain interface: New opportunities for CNS drug delivery // *Nature.* 2016. Vol. 15. P. 46–74. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.21>
3. Wu S., Li K., Yan Y., Gran B., Han Y., Zhou F., Guan Y., Rostami A., Zhang G. Intranasal Delivery of Neural Stem Cells: A CNS-specific, Non-invasive Cell-based Therapy for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. Vol. 4, iss. 3. PMID:24244890. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000142>
4. Semyachkina-Glushkovskaya O., Kurths J., Borisova E., Sokolovsky S., Mantareva N., Angelov I., Shirokov A., Navolokin N., Shushunova N., Khorovodov A., Ulanova M., Sagatova M., Ahranovich I., Sindeeva O., Gekalyuk A., Bordova A., Rafailov E. Photodynamic opening of blood-brain barrier // *BOE.* 2017. № 8 (11). P. 5040–5048. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005040>
5. Gill S., Patel N., Hotton G., O'Sullivan K., McCarter R., Bunnage M., Brooks D., Svendsen C., Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease // *Nat. Med.* 2003. Vol. 9. P. 589–595. <https://doi.org/10.1038/nm850>
6. Kiviniemi V., Korhonen V., Kortelainen J., Rytty S., Keinänen T., Tuovinen T., Isokangas M., Sonkajarvi E., Siniluoto T., Nikkinen J., Alahuhta S., Tervonen O., Turpeenniemi-Hujanen T., Myllylä T., Kuittinen O., Voipio J. Real-time monitoring of human blood-brain barrier disruption // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, iss. 3. P. 1–16. <https://doi.org/10.1731>
7. Lipsman N., Meng Y., Bethune A., Huang Y., Lam B., Masellis M., Herrmann N., Heyn C., Aubert I., Boutet A., Smith G. S., Hynynen K., Black S. E. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. P. 2336. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04529-6>
8. Wang H. L., Lai T. W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep06588>
9. Yisong Q., Tingting Yu., Jianyi X., Peng W., Yilin M., Jingtang Z., Yusha L., Gong H., Luo Q., Zhu D. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5. P. eaau8355. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8355>
10. Abdurashitov A., Lychagov V., Sindeeva O., Semyachkina-Glushkovskaya O., Tushin V. Histogram analysis of laser speckle contrast image for cerebral blood flow monitoring // *Front. Optoelectron.* 2015. Vol. 8, iss. 2. P. 187–194. <https://doi.org/10.1007/s12200-015-0493-z>
11. Roszkowski M., Bohacek J. Stress does not increase blood-brain barrier permeability in mice // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2016. Vol. 36, № 7. P. 43–46. <https://doi.org/10.1177/0271678X16647739>



12. Bryan R. M. Cerebral blood flow and energy metabolism during stress // *Am. J. Physiol.* 1990. Vol. 259. P. 269–280. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.2.H269>
13. Matter K., Balda M. S. Signalling to and from tight junctions // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 4, № 3. P. 225–236. <https://doi.org/10.1038/nrm1055>
14. Ghosh C., Gonzalez-Martinez J., Hossain M., Cucullo L., Fazio V., Damir Janigro D., Marchi N. Pattern of P450 expression at the human blood–brain barrier: Roles of epileptic condition and laminar flow // *Epilepsia*. 2010. Vol. 51. P. 1–3. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02428.x>
15. Hara M. R., Kovacs J. J., Whalen E. J. A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1 // *Nature*. 2011. Vol. 477, № 7364. P. 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature10368>
16. Kanki H., Sasaki T., Matsumura S., Satoru Yokawa S., Yukami T., Munehisa Shimamura M., Manabu Sakaguchi M., Furuno T., Suzuki T., Mochizuki H. β -arrestin-2 in PAR-1-biased signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF- β in stroke // *Cell Death and Disease*. 2019. Vol. 10, № 2. P. 456–459. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1375-x>
17. Soh U. J. K., Trejo J. A. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. Vol. 108, № 50. P. 1372–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112482108>
7. Lipsman N., Meng Y., Bethune A., Huang Y., Lam B., Masellis M., Herrmann N., Heyn C., Aubert I., Boutet A., Smith G. S., Hynynen K., Black S. E. Blood–brain barrier opening in Alzheimer’s disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, pp. 2336. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04529-6>
8. Wang H. L., Lai T. W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, pp. 1–7 <https://doi.org/10.1038/srep06588>
9. Yisong Q., Tingting Yu., Jianyi X., Peng W., Yilin M., Jingtang Z., Yusha L., Gong H., Luo Q., Zhu D. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Sci. Adv.*, 2019, vol. 5, pp. eaau8355. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8355>
10. Abdurashitov A., Lychagov V., Sindeeva O., Semyachkina-Glushkovskaya O., Tuchin V. Histogram analysis of laser speckle contrast image for cerebral blood flow monitoring. *Front. Optoelectron*, 2015, vol. 8, iss. 2, pp. 187–194. <https://doi.org/10.1007/s12200-015-0493-z>
11. Roszkowski M., Bohacek J. Stress does not increase blood-brain barrier permeability in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2016, vol. 36, no. 7, pp. 43–46. <https://doi.org/10.1177/0271678X16647739>
12. Bryan R. M. Cerebral blood flow and energy metabolism during stress. *Am. J. Physiol.*, 1990, vol. 259, pp. 269–280. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.2.H269>
13. Matter K., Balda M. S. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, vol. 4, no. 3, pp. 225–236. <https://doi.org/10.1038/nrm1055>
14. Ghosh C., Gonzalez-Martinez J., Hossain M., Cucullo L., Fazio V., Damir Janigro D., Marchi N. Pattern of P450 expression at the human blood–brain barrier: Roles of epileptic condition and laminar flow. *Epilepsia*, 2010, vol. 51, pp. 1–3. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02428.x>
15. Hara M. R., Kovacs J. J., Whalen E. J. A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*, 2011, vol. 477, no. 7364, pp. 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature10368>
16. Kanki H., Sasaki T., Matsumura S., Satoru Yokawa S., Yukami T., Munehisa Shimamura M., Manabu Sakaguchi M., Furuno T., Suzuki T., Mochizuki H. β -arrestin-2 in PAR-1-biased signaling has a crucial role in endothelial function via PDGF- β in stroke. *Cell Death and Disease*, 2019, vol. 10, no. 2, pp. 456–459. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1375-x>
17. Soh U. J. K., Trejo J. A. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 50, pp. 1372–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112482108>

References

1. Ronaldson P., Davis T. Regulation of blood–brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2020, vol. 40, pp. 10–12. <https://doi.org/10.1177/0271678X20951995>
2. Banks W. From blood-brain barrier to blood-brain interface: New opportunities for CNS drug delivery. *Nature*, 2016, vol. 15, pp. 46–74. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.21>
3. Wu S., Li K., Yan Y., Gran B., Han Y., Zhou F., Guan Y., Rostami A., Zhang G. Intranasal Delivery of Neural Stem Cells: A CNS-specific, Non-invasive Cell-based Therapy for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2013, vol. 4, iss. 3, PMID: 24244890, <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000142>
4. Semyachkina-Glushkovskaya O., Kurths J., Borisova E., Sokolovsky S., Mantareva N., Angelov I., Shirokov A., Navolokin N., Shushunova N., Khorovodov A., Ulanova M., Sagatova M., Ahranovich I., Sindeeva O., Gekalyuk A., Bordova A., Rafailov E. Photodynamic opening of blood-brain barrier. *BOE*, 2017, no. 8 (11), pp. 5040–5048. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005040>
5. Gill S., Patel N., Hotton G., O’Sullivan K., McCarter R., Bunnage M., Brooks D., Svendsen C., Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, pp. 589–595. <https://doi.org/10.1038/nm850>
6. Kiviniemi V., Korhonen V., Kortelainen J., Rytky S.,

Поступила в редакцию 14.11.22; одобрена после рецензирования 06.12.22; принята к публикации 07.12.22
The article was submitted 14.11.22; approved after reviewing 06.12.22; accepted for publication 07.12.22