

ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ИНТЕРВАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ НА ГРЫЗУНАХ

© 2023 г. М. Ю. Зенько¹, К. А. Баранова¹, М. В. Кукина¹, Е. А. Рыбникова¹ *

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: rybnikova@infran.ru

Поступила в редакцию 15.08.2023 г.

После доработки 28.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Разработка немедикаментозных способов коррекции стресс-индуцированных расстройств и улучшения адаптации к стрессорным воздействиям остается актуальной задачей физиологии, имеющей большой трансляционный потенциал. Ранее нами были предложены эффективные в данном отношении способы гипоксического гипобарического прекодиционирования и дистантного ишемического кондиционирования. Цель настоящей работы состояла в переносе принципов прекодиционирования на подходы нормобарической интервальной гипоксической тренировки (ИГТ). Исследованы эффекты пяти новых режимов ИГТ (3 пятиминутных сеанса гипоксии по 16% O₂ в день, 3 сеанса по 12% O₂, 7 сеансов по 12% O₂, 15 сеансов по 12% O₂, 3 сеанса по 9% O₂) в экспериментальных моделях депрессии и посттравматического стрессового расстройства у крыс. Прекодиционирующий режим высокой интенсивности 3 × 9%O₂ оказал наиболее выраженный антидепрессивный и анксиолитический эффект в моделях обеих патологий. При снижении уровня гипоксии до 12% O₂ частично сохраняли эффективность режимы ИГТ с увеличением количества сеансов. Тренировочный режим наибольшей длительности — 15 × 12%O₂, обладал эффективностью в отношении коррекции формирования экспериментальной депрессии. Переходный режим — 7 × 12%O₂ — оказывал анксиолитический эффект, тогда как прекодиционирующий режим средней интенсивности — 3 × 12%O₂ — продемонстрировал и антидепрессивный, и анксиолитический эффект. Результаты свидетельствуют, что наибольшее влияние на эффективность оказывала интенсивность гипоксического воздействия. При этом снижение интенсивности до 16% O₂ приводило к ослаблению или потере стресс-протективных свойств. В отношении режима 3 × 9%O₂ как наиболее перспективного целесообразно провести дальнейшие исследования по выявлению молекулярных механизмов, реализующих его стресс-протективное и анксиолитическое действие.

Ключевые слова: гипоксия, стресс, адаптация, интервальная гипоксическая тренировка, посттравматическое стрессовое расстройство, депрессия

DOI: 10.31857/S004446772306014X, EDN: XLISSQ

За последние несколько лет пандемия COVID-19, психотравматизация вследствие вооруженных конфликтов, вынужденного переселения или несчастных случаев коснулись миллионов людей по всему миру (Carpiniello, 2023). Возрастающий уровень стрессогенности, по различным экспертным оценкам, приводит к увеличению количества индуцированных ею психических расстройств. Так, у пациентов, уже успешно вылечившихся от COVID-19, в 31% случаев наблюдаются симптомы де-

прессии, в 28% — ПТСР и в 42% — тревожного расстройства (Mazza et al., 2022). У участников военных конфликтов впоследствии частота возникновения ПТСР может достигать 37.8%, у спасателей и пожарников — рекордные 57% (Iversen et al., 2008; Jakupcak et al., 2008; Obuobi-Donkor et al., 2022). По данным последних метаанализов, распространенность депрессии среди общей популяции в настоящее время может достигать 25–33.7%

(Cooke et al., 2020; Wang et al., 2020; Mahmud et al., 2023).

С учетом недостаточной эффективности имеющихся средств профилактики и терапии, разработка новых способов и подходов к повышению устойчивости организма к стрессорным воздействиям по-прежнему остается крайне актуальной проблемой. Одним из наиболее перспективных направлений может быть возрождение интереса к методу интервальной гипоксической тренировки как средству индукции перекрестной адаптации между гипоксией и психоэмоциональным стрессом, когда адаптация к одному из влияний сопровождается формированием толерантности к стрессорам другой модальности или природы (Zenko, Rybnikova, 2023).

Интервальная гипоксическая тренировка (ИГТ) представляет собой чередование эпизодов гипоксии с нормоксией, гипоксией меньшей интенсивности, гиперкапнией или даже гипероксией. Разработано большое количество вариаций сочетаний и циклов ИГТ, различающихся по модальности, интенсивности и количеству эпизодов, длительности каждого отдельного цикла и т.д. Описаны сочетания как коротких эпизодов гипоксии/нормоксии (от 1 до 20 мин) (Сао et al., 1992) в течение одного дня, так и намного более длительных эпизодов гипоксии/нормоксии до 12 часов и продолжительностью до 90 дней (Rodriguez et al., 1999). Наибольшее распространение получили режимы ИГТ с небольшим количеством эпизодов в день (3–15) в условиях умеренной гипоксии (10–16% O₂), которые считаются оптимальными по соотношению безопасности и эффективности, по сравнению с воздействием более интенсивной гипоксии (8–9% O₂) или большим количеством эпизодов (Navarrete-Opazo, Mitchell, 2014).

Изучение физиологических механизмов, лежащих в основе эффектов ИГТ, является актуальной задачей в связи с высоким терапевтическим потенциалом данного метода. Показано, что ИГТ повышает адаптивные возможности кардиореспираторной системы, улучшает гемореологические свойства, повышает активность метаболических процессов, в т.ч. в миокарде, уровень белков антиоксидантной защиты, шаперонов, эритропоэтина, индуцибельной NO-синтазы, подавляет окислительный стресс, модулирует стрессорный ответ и функцию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (Зенько, Рыб-

никова 2020; Balestra et al., 2021; Cai et al., 2010; Knaupp et al., 1992; Park et al., 2022; Rybnikova et al., 2023; Zembron-Lacny et al., 2020).

Наши предыдущие исследования по разработке нейропротективных способов с применением гипобарической гипоксии показали, что не тренировочные, а кондиционирующие режимы гипоксии, вызывающие срочную мобилизацию адаптационных ресурсов на молекулярно-клеточном и системном уровнях, могут быть наиболее эффективными (Зенько, Рыбникова, 2020; Rybnikova et al., 2022; Rybnikova et al., 2023). С использованием модели гипобарической гипоксии на крысах нами было показано, что гипобарическое пре- и посткондиционирование оказывает мощное стресс-протективное, антидепрессивное и анксиолитическое действие в моделях постгипоксических и постстрессорных патологий на крысах (Зенько, Рыбникова, 2020; Rybnikova et al., 2022; Rybnikova et al., 2023). Кроме того, принципы кондиционирования были успешно реализованы нами при разработке способов дистантного ишемического пре- и посткондиционирования, также оказывающего выраженное стресс-протективное действие в моделях на крысах (Баранова, Зенько, 2018).

Сравнение гипобарической и нормобарической гипоксии выявляет сходство молекулярных сенсоров и, соответственно, адаптивного ответа, однако при этом нормобарическая гипоксия оказывает меньше побочных эффектов, является более управляемым воздействием, и, как следствие, более безопасным (Millet et al., 2012). Нормобарическую гипоксию с использованием дыхательной смеси можно мгновенно остановить в случае возникновения неблагоприятных эффектов, сняв маску или подав кислород в камеру, в отличие от использования гипобарической барокамеры, где необходимо постепенное изменение давления во избежание баротравмы. В отличие от нормобарической, гипобарическая гипоксия может приводить к возникновению симптомов острой высотной болезни, легочной вазоконстрикции, изменениям вентилиционной реакции и жидкостного баланса (Conkin, Wessel, 2008; Loeppky et al., 2005; Millet et al., 2012). Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе была поставлена задача разработать эффективные способы нейропротекции и стресс-протекции с применением нормобарической гипоксии и подходов ИГТ. При этом на основании собственного многолетнего опыта было сделано предположение,

что принципы кондиционирования (снижение числа сеансов, дней воздействия, с увеличением интенсивности гипоксического фактора) могут быть также применимы и к парадигме нормобарической гипоксии (Rybnikova et al., 2022). С целью проверки данного предположения нами проведен сравнительный экспериментальный анализ эффективности прекодиционирующих режимов ($3 \times 9\%O_2$, $3 \times 12\%O_2$, $3 \times 16\%O_2$), тренировочных режимов ($15 \times 12\%O_2$), и переходных вариантов ($7 \times 12\%O_2$) в отношении коррекции патогенеза постстрессорных тревожно-депрессивных расстройств в моделях на крысах.

МЕТОДИКА

Исследования проведены на 96 взрослых самцах крыс линии Вистар из ресурсов ЦКП “Биоколлекция” ИФ РАН, содержащихся в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов были соблюдены принципы, изложенные в директивах Европейского Совета (2010/63/EU) и положениях ИФ РАН о работе с животными, используемыми в научных экспериментах.

Для моделирования гипоксических нормобарических условий использована автоматическая установка, создающая гипоксию требуемой интенсивности за счет кислорода воздуха и поступающего в камеру азота, поток которого находится под программным управлением компьютера через регулирующий блок и систему клапанов. Установка состоит из прозрачной камеры, разделенной съемной сеткой на 6 отсеков, плотно прилегающей к ней крышки с размещенными на ней редуктором и клапаном ввода азота, клапанами и патрубками с вентиляторами для продувки камеры атмосферным воздухом, цифровым датчиком уровня кислорода и электронным управляющим блоком (изготовитель АО “Технопарк Санкт-Петербурга”).

С использованием камеры одновременно для всей группы крыс создавали 5-минутную нормобарическую гипоксию с последующей 15-минутной реоксигенацией, 3 и более эпизодов гипоксии/реоксигенации (5/15 мин) в день подряд ежедневно в течение 3 дней. Это соотношение длительности эпизодов отражает оригинальный подход, который базируется на предыдущем опыте авторов, полученном при исследованиях действия гипобарического пре-/посткондиционирования и

дистантной ишемии (Зенько, Рыбникова, 2020; Rybnikova et al., 2022; Rybnikova et al., 2023).

Экспериментально исследованы эффекты пяти режимов интервальных тренировок: 3 пятиминутных сеанса гипоксии по $16\% O_2$ в день, 3 сеанса по $12\% O_2$, 7 сеансов по $12\% O_2$, 15 сеансов по $12\% O_2$, 3 сеанса по $9\% O_2$. Дизайн режимов базировался на гипотезе авторов о том, что трехкратное воздействие более интенсивной гипоксией может оказывать более выраженное влияние (соответственно, режимы сравнения — $9\% O_2$, 3 сеанса, и $16\% O_2$, 3 сеанса), а эффективность среднего по интенсивности режима гипоксии может увеличиваться с увеличением числа сеансов, что характерно для классических подходов ИГТ.

Эффекты данных тестовых гипоксических воздействий были исследованы в экспериментальных моделях психоэмоционального стресса и постстрессорных тревожно-депрессивных состояний у крыс.

“Выученная беспомощность” (ВБ)

В качестве экспериментальной модели депрессии была использована классическая модель “выученной беспомощности” (ВБ) (Henkel et al., 2002; Seligman, Maier, 1967; Seligman, Beagley, 1975; Willner, 1986). Крысы подвергались воздействию аверсивного неизбежаемого стрессора, электрокожного раздражения (1 мА, 60 Гц, 15 с), 60 раз с непредсказуемыми интервалами между ними от 15 до 45 с.

Модель ПТСР “стресс–рестресс”

Для индукции аналога посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) использовали модель “травматический стресс – рестресс”. Эта модель, предложенная И. Либерзоном и коллегами в 1997 году (Liberzon et al., 1997), выгодно отличается от других моделей своей этиологической обоснованностью. Ее основу составляет парадигма “травматический стресс – рестресс”, в которой воспроизводится патогенетическая роль предшествующей психотравматизации в ситуации, воспринимаемой как угроза для жизни. Процедура стрессирования включала условно “тяжелый” патогенный стресс (2 ч иммобилизации, 20 мин вынужденного плавания и, после 15-минутного перерыва, воздействие эфиром до обездвиживания). Через 7 сут производился напоминающий, условно более “мягкий”, рестресс (30 мин

иммобилизации), выполняющий роль триггера, запускающего развитие модельного аналога ПТСР с симптоматикой тревожного патологического состояния.

Поведенческое тестирование

Для оценки поведения, двигательной активности и уровня тревожности животных использовали тестирование в “открытом поле” (ОП) и “приподнятом крестообразном лабиринте” (ПКЛ).

Тест ОП, являющийся классическим методом исследования поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях (Hall, 1936), позволяет оценить уровни локомоторной активности и ориентировочно-исследовательского поведения крыс. Тестирование проводилось на 4-й день после стресса моделей ВБ и ПТСР в установке площадью 1 м² квадратной формы, разбитой на 36 секторов, с источником света сверху в центре установки. Испытуемое животное помещали в центр открытого поля и в течение 5 минут фиксировали его активность, в ходе эксперимента отмечали время латентного периода, количество пересеченных квадратов различных зон установки, время груминга, вертикальных стоек, иммобилизации.

Для изучения уровня тревожности животных и возможного анксиолитического эффекта ИГТ соответственно, был применен поведенческий тест “Приподнятый крестообразный лабиринт” (Pellow et al., 1985). Тестирование в ПКЛ проводилось на 5-й день после стресса моделей ВБ и ПТСР. ПКЛ представляет из себя приподнятый на 1 м над полом лабиринт с двумя открытыми освещенными (стрессогенными) и двумя закрытыми (темными, условно защищенными) рукавами. Крысу помещали в центр установки и в течение 5 минут регистрировали выбор рукавов и центра, время, проведенное во всех этих зонах (Pellow et al., 1985; Walf, Frye, 2007).

Функция гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы

Методом твердофазного иммуноферментного анализа проведено определение уровней кортикостерона в плазме туловищной крови, полученной при декапитации животных на 6-й день после модельного стрессирования. Использованы коммерческие ИФА-киты (K210R, Кортикостерон крыса/мышь ИФА, ООО Хема, Россия).

Статистическая обработка результатов

Был использован программный пакет STATISTICA 12.0. Распределение параметров, проанализированных в статье, было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова, после чего был использован непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование экспериментальной депрессии у животных в модели “выученной беспомощности” сопровождалось проявлением локомоторного дефицита, характерного для данного заболевания: крысы этой группы совершали достоверно меньше пересечений крайних квадратов ОП, то есть демонстрировали снижение горизонтальной двигательной активности ($p = 0.027$, рис. 1 (а), *), при сохранении вертикальной двигательной активности.

В группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ (все тестовые группы, кроме $3 \times 16\%O_2 + ВБ$) показатель горизонтальной активности крыс был достоверно выше, чем у животных с модельной депрессией ($p = 0.001$, $p < 0.01$, $p = 0.023$ и $p = 0.044$ соответственно; рис. 1 (а), #) и соответствовал значениям контроля, что свидетельствует об отсутствии депрессивно-подобной симптоматики. Наибольшие абсолютные показатели двигательной активности были отмечены в группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ и $15 \times 12\%O_2 + ВБ$ (рис. 1 (а)).

Иммобилизация, также характерная для развития модельной депрессии у крыс, была отмечена у части крыс в группах ВБ, $3 \times 16\%O_2 + ВБ$ ($p < 0.05$, рис. 1 (в), *), $7 \times 12\%O_2 + ВБ$ и у одной крысы в группе $3 \times 12\%O_2 + ВБ$; в контроле и группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$ иммобилизация полностью отсутствовала (рис. 1 (в)).

По сравнению с депрессивными состояниями, при развитии модельного ПТСР нарушений горизонтальной двигательной активности в тесте ОП обычно не отмечается, что также было продемонстрировано в нашем эксперименте (рис. 1, б). В группе ПТСР проявлений иммобилизации животных было достоверно больше, чем у контроля ($p < 0.05$, рис. 1 (г), *), в группах $15 \times 12\%O_2 + ПТСР$,

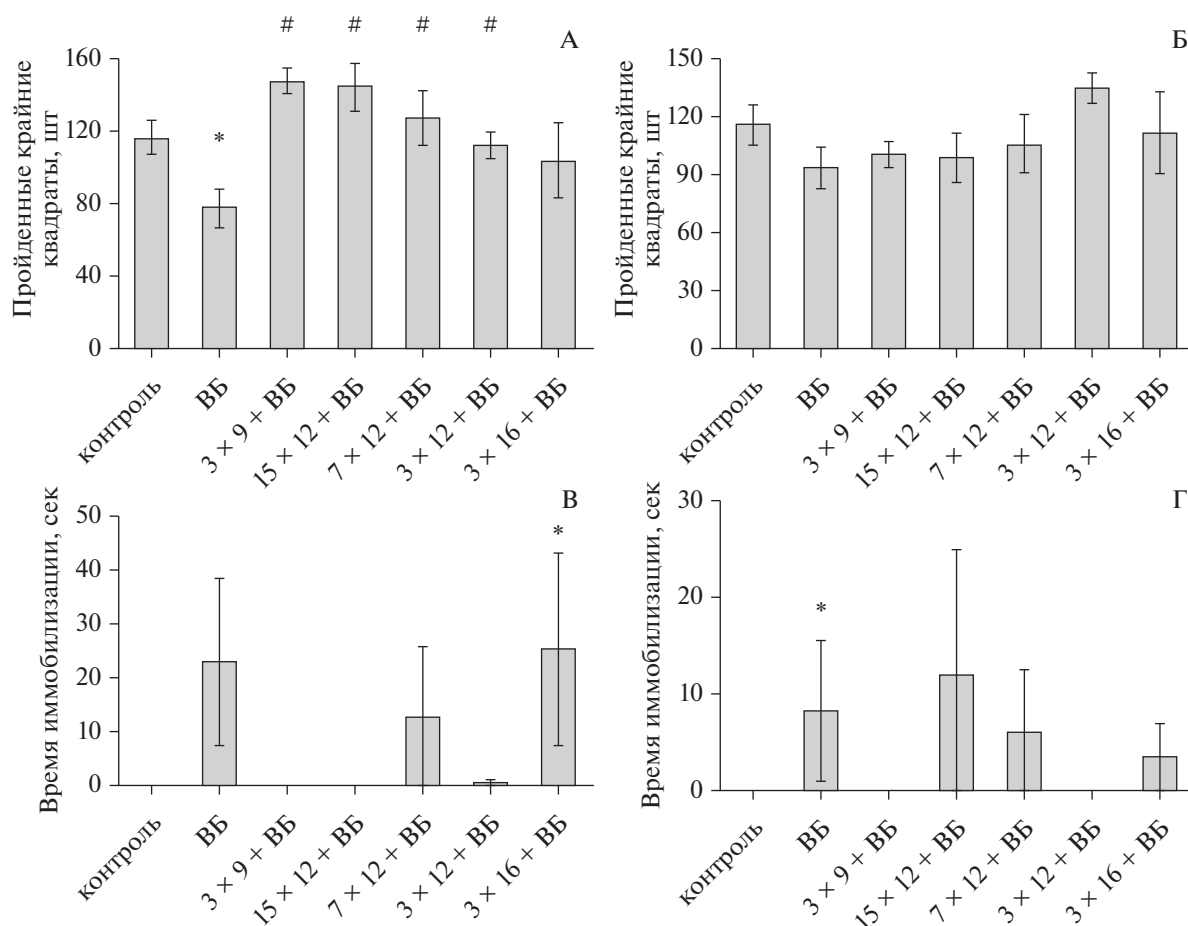
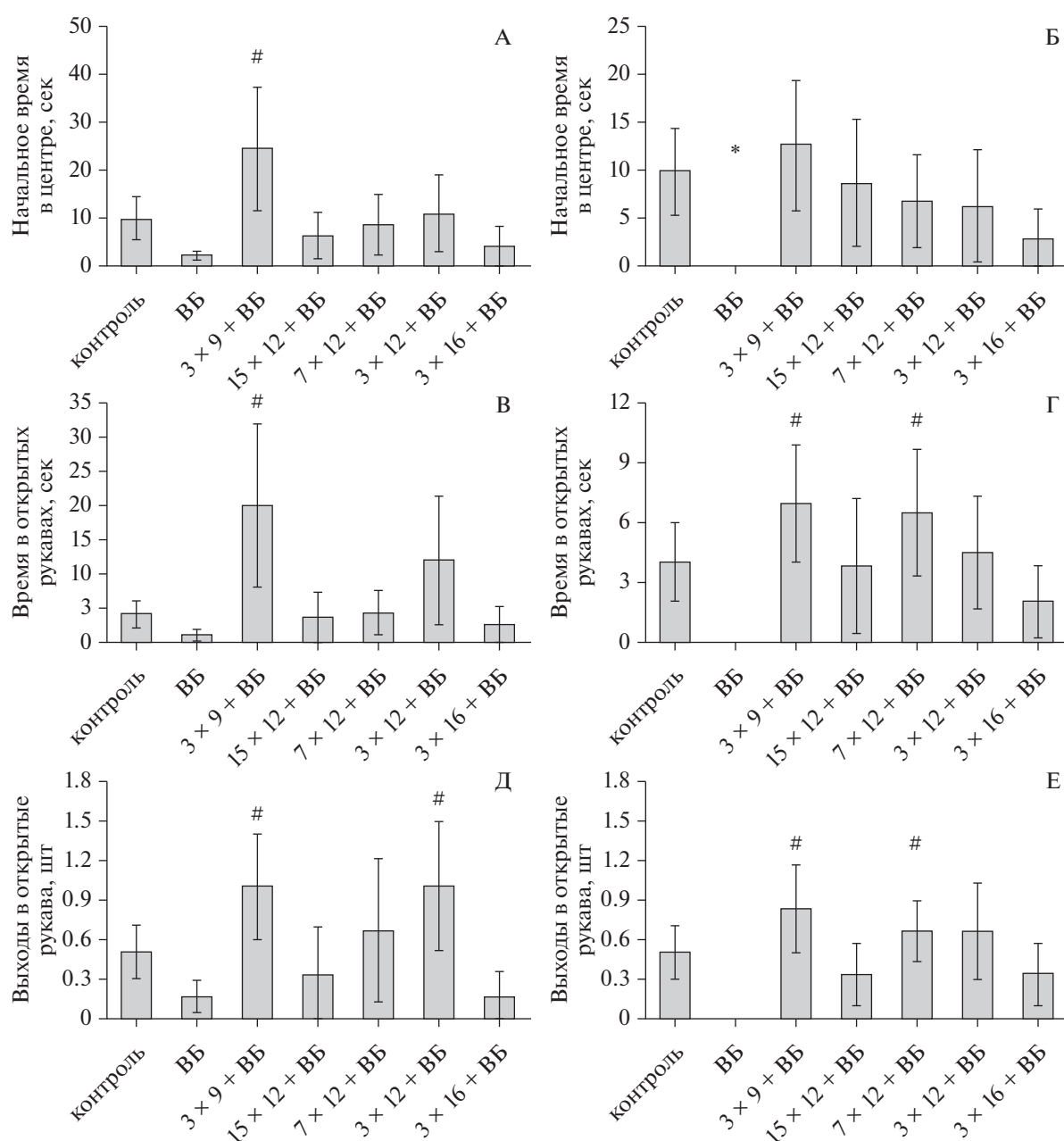


Рис. 1. Результаты поведенческого тестирования в тесте “открытое поле”. (а) – горизонтальная двигательная активность крыс модели ВБ, ВБ+ИГТ и контроля, количество пройденных крайних квадратов открытого поля. (б) – горизонтальная двигательная активность крыс модели ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, количество пройденных крайних квадратов. (в) – время иммобилизации крыс модели ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, секунды. (г) – время иммобилизации крыс модели ПТСР, ПТСР+ИГТ и контроля, секунды. Контроль ($n = 12$), ВБ – группа ВБ ($n = 12$), $3 \times 9 + \text{ВБ}$, $15 \times 12 + \text{ВБ}$, $7 \times 12 + \text{ВБ}$, $3 \times 16 + \text{ВБ}$ – группы ВБ в сочетании с указанным режимом ИГТ, соответственно ($n = 6$), ПТСР – группа модели ПТСР ($n = 6$), $3 \times 9 + \text{ПТСР}$, $15 \times 12 + \text{ПТСР}$, $7 \times 12 + \text{ПТСР}$, $3 \times 16 + \text{ПТСР}$ – группы модели ПТСР в сочетании с заданным режимом ИГТ, соответственно ($n = 6$ в каждой). * – достоверное отличие от контрольной группы, # – достоверное отличие от группы соответствующей патологии, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

Fig. 1. The results of behavioral testing in the “open field” test. (a) – horizontal locomotor activity of rats of the LH model, LH + IHT and control, the number of lateral squares of the open field passed. (б) – horizontal locomotor activity of rats of the PTSD model, PTSD + IHT and control, the number of lateral squares passed. (в) – the time of freezing of rats of the LH model, LH + IHT and control, seconds. (г) – the time of freezing of rats of the PTSD model, PTSD+IHT and control, seconds. Control – control animals ($n = 12$), LH – group of LH ($n = 12$), $3 \times 9 + \text{LH}$, $15 \times 12 + \text{LH}$, $7 \times 12 + \text{LH}$, $3 \times 16 + \text{LH}$ – groups of LH combined with the specified IHT regime, respectively ($n = 6$), PTSD – group of model PTSD ($n = 6$), $3 \times 9 + \text{PTSD}$, $15 \times 12 + \text{PTSD}$, $7 \times 12 + \text{PTSD}$, $3 \times 16 + \text{PTSD}$ are groups of the PTSD model combined with the specified IGT mode, respectively ($n = 6$ in each). * – significant difference from the control group, # – significant difference from the group of the corresponding pathology, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

$7 \times 12\% \text{O}_2 + \text{ПТСР}$, $3 \times 16\% \text{O}_2 + \text{ПТСР}$ иммобилизации наблюдались у отдельных животных (рис. 1 (г)), а в контроле и группах $3 \times 9\% \text{O}_2 + \text{ПТСР}$, $3 \times 12\% \text{O}_2 + \text{ПТСР}$ иммобилизация отсутствовала (рис. 1 (г)).

Тестирование в ПКЛ показало, что по проявлениям исследовательской активности и тревожности крысы модели депрессии не отличаются от контрольных (рис. 2 (а, в)), как и поведенческие показатели животных боль-



шинства режимов ИГТ + ВБ, однако для групп $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ (в большей степени) и $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ (по меньшему количеству показателей) выявлен достоверный анксиолитический эффект даже относительно группы контроля. Животные группы $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ проводили больше времени в центре установки от начала посадки в ПКЛ ($p = 0.016$, рис. 2 (а), *), чаще выходили в открытые рукава ($p = 0.028$,

рис. 2 (д), *) и проводили там больше времени, чем контрольные ($p = 0.022$, рис. 2 (в), *).

Крысы группы $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ достоверно чаще контроля выходили в открытые рукава ПКЛ ($p = 0.036$, рис. 2 (д), #) и проводили там по абсолютным показателям второе время после группы $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ ($p = 0.05$, рис. 2 (в)).

В отличие от модели экспериментальной депрессии, был выявлен значимый анксио-

Рис. 2. Результаты теста “приподнятый крестообразный лабиринт”. (а) — начальное время нахождения в центре в группах ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, секунды. (б) — начальное время нахождения в центре групп ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, секунды. (в) — время нахождения в открытых рукавах групп ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, секунды. (г) — время, проведенное в открытых рукавах в группах ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, секунды. (д) — количество выходов в открытые рукава в группах ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, шт. (е) — количество выходов в открытые рукава в группах ПТСР, ПТСР+ИГТ и контроля, шт. Контроль — контрольные животные ($n = 12$), ВБ — группа ВБ ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ — группы ВБ и указанного режима ИГТ соответственно ($n = 6$), ПТСР — модельная группа ПТСР ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ — модельная группа ПТСР и указанная группа режима ИГТ соответственно ($n = 6$ в каждой). * — достоверное отличие от контрольной группы, # — достоверное отличие от соответствующей группы патологии, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

Fig. 2. Results of “elevated plus-maze” test. (a) — initial time in the center of the LH, LH + IHT and control groups, seconds. (б) — initial time in the center of the PTSD, PTSD + IHT and control groups, seconds. (в) — time spent in the open arms by the LH, LH + IHT and control groups, seconds. (г) — time spent in the open arms by the PTSD, PTSD + IHT and control groups, seconds. (д) — Number of entries to open arms by the LH, LH + IHT and control groups, pcs. (е) — Number of entries to open arms by the PTSD, PTSD + IHT and control groups, pcs. Контроль — control animals ($n = 12$), ВБ — LH group ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ — LH and indicated IHT mode groups, respectively ($n = 6$), ПТСР — PTSD model group ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ — PTSD model and indicated IHT mode groups, respectively ($n = 6$ in each). * — significant difference from the control group, # — significant difference from the corresponding pathology group, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

генный эффект стрессирования в модели ПТСР (рис. 2 (б, г, е)). При первоначальном высаживании в установку ПКЛ крысы с экспериментальным ПТСР стремились максимально быстро уйти со света в закрытые темные рукава, проводя минимальное латентное время в центре от начала опыта ($p = 0.028$, рис. 2 (б)). Позже в ходе теста у этих животных полностью отсутствовали выходы в открытые освещенные рукава ПКЛ (рис. 2 (г, е)), которые являются для крыс выраженным стрессогенным фактором, в то время как контрольные животные выходили в них и проводили время, исследуя окружающую обстановку, что говорит о низком уровне их тревожности (рис. 2 (г, е)).

Тестирование в ПКЛ позволило выявить значимый анксиолитический эффект гипоксических режимов в модели экспериментального ПТСР: по латентному времени, проведенному после высаживания в центр, животные режимов ИГТ не отличались от контрольных, крысы групп $3 \times 9\%O_2 + ПТСР$ и $7 \times 12\%O_2 + ПТСР$ проводили достоверно больше времени в открытых рукавах, чем крысы группы ПТСР ($p = 0.028$, $p = 0.028$, рис. 2 (г), #), и чаще в них выходили ($p = 0.026$, $p = 0.024$, рис. 2 (е), #).

Результаты определения содержания кортикостерона в плазме крови показали, что развитие экспериментальной депрессии сопровождалось стойким повышением базального уровня данного глюкокортикоидного гормона выше контрольных значений, что подтверждает формирование у эксперимен-

тальных животных депрессивно-подобного состояния ($p < 0.01$, рис. 3 (а), *). В группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ и $3 \times 16\%O_2 + ВБ$ (то есть все, кроме $15 \times 12\%O_2 + ВБ$) применение ИГТ достоверно относительно группы ВБ снижало этот показатель до контрольных значений ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, рис. 3 (а), #).

В модели экспериментального ПТСР группа $3 \times 9\%O_2 + ПТСР$ была единственной, в которой уровень кортикостерона плазмы крови был достоверно выше, чем у контроля и животных модели ПТСР ($p < 0.05$, $p < 0.05$, рис. 3 (б), *, #)).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось выше, локомоторная заторможенность, выявляемая в тесте ОП, является характерным проявлением экспериментальной депрессии у крыс (Hall, 1936; Henkel et al., 2002; Willner, 1986). В соответствии с этим в ходе наших экспериментов животные с ВБ пересекали достоверно меньше квадратов, что подтверждало формирование у них депрессивно-подобного состояния. При этом применение ИГТ перед стрессированием в модели ВБ в большинстве групп позволило частично или полностью предотвратить развитие экспериментальной депрессии, отслеживаемое на поведенческом уровне, однако при этом эффективность коррекции депрессивно-подобной поведенческой симптоматики для разных тестовых режимов ИГТ оказалась неодинаковой. Исключением

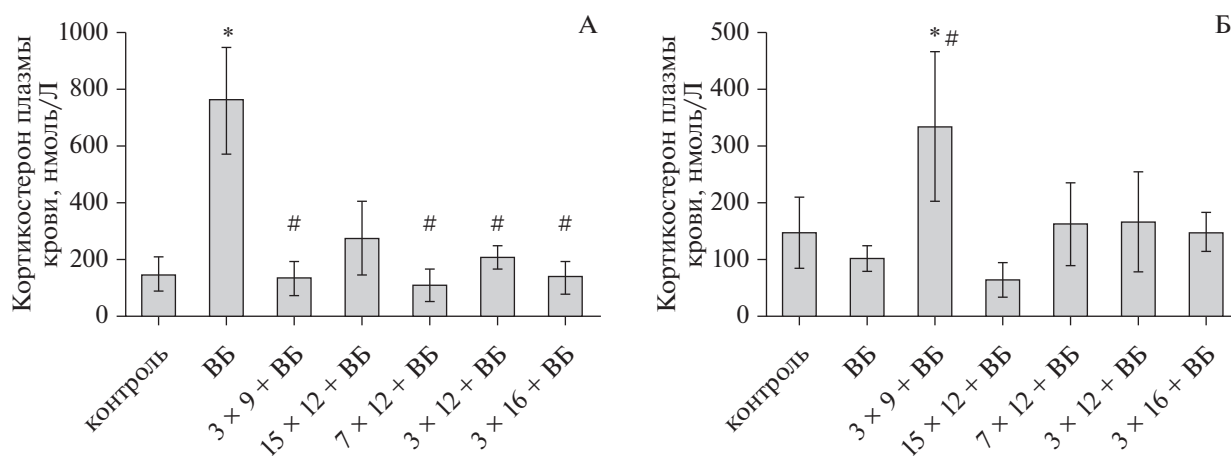


Рис. 3. Базальная концентрация кортикостерона в плазме крови. (а) — уровень кортикостерона в плазме крови в группах ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, нмоль/л. (б) — уровень кортикостерона в плазме крови у крыс в группах ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, нмоль/л. Контроль — контрольные животные ($n = 12$), ВБ — группа ВБ ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ — ВБ в сочетании с указанными группами режима ИГТ, соответственно ($n = 6$), ПТСР — модельная группа ПТСР ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ — модель ПТСР в сочетании с указанными группами режима ИГТ, соответственно ($n = 6$ в каждой). * — достоверное отличие от контрольной группы, # — достоверное отличие от соответствующей группы патологии, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

Fig. 3. Basal corticosterone concentration in blood plasma. (a) — plasma corticosterone levels in the LH, LH + IHT and control groups, nmol/L. (б) — plasma corticosterone levels in the PTSD, PTSD + IHT and control rats, nmol/L. Control — control animals ($n = 12$), ВБ — LH group ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ — LH combined with indicated IHT regime groups, respectively ($n = 6$), ПТСР — PTSD model group ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ — PTSD model combined with indicated IHT mode groups, respectively ($n = 6$ in each). * — significant difference from the control group, # — significant difference from the corresponding pathology group, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

являлась группа $3 \times 16\%O_2 + ВБ$, сохранившая полноценную депрессивно-подобную симптоматику, поскольку у крыс этой группы наблюдалась низкая двигательная активность и высокий уровень иммобилизаций, соответственно, данный тренировочный режим проявил себя в парадигме ВБ как неэффективный. В группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ патологическая моторная ретардация отсутствовала, причем первые две группы лидировали по абсолютным значениям горизонтальной двигательной активности. Однако в группах режимов $3 \times 16\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ были отмечены эпизоды неподвижности, что может свидетельствовать о недостаточной их эффективности в данной модели (Henkel et al., 2002).

В качестве патогенетической основы развитие экспериментальной депрессии в группе ВБ сопровождалось стойким достоверным повышением уровня базального кортикостерона плазмы крови. При всех режимах, кроме

$15 \times 12\%O_2$, ИГТ нормализовала этот показатель.

В режимах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$ иммобилизация полностью отсутствовала, а двигательная активность находилась на уровне контроля. На этом основании можно назвать данные режимы (кондиционирующий высокой интенсивности и тренировочный средней интенсивности, но максимальной продолжительности) наиболее эффективными в модели ВБ по выраженности антидепрессивного действия из рассмотренных в данном эксперименте. Таким образом, разработанный прекодиционирующий режим не уступил по выраженности эффекта тренировочному, однако его процедура укорочена в 5 раз, поскольку для его реализации требуется 3 дня (а не 15), что в трансляционном отношении является существенным преимуществом.

Хорошо известно, что тревожное поведение животного характеризуется предпочтением закрытых рукавов приподнятого лабиринта от-

крытым и центру, тогда как анксиолитический эффект, напротив, может приводить к большему времени, проведенному в открытых рукавах и центре установки (Pellow et al., 1985; Walf, Frye, 2007). Тестирование в ПКЛ в наших экспериментах показало выраженную анксиолитическую активность отдельных режимов ИГТ в обеих моделях постстрессорных расстройств. Так, по показателям в ПКЛ животные группы экспериментальной депрессии и большинства режимов ИГТ + ВБ не отличались от контроля, однако в режимах $3 \times 9\%O_2$ и $3 \times 12\%O_2$ был показан достоверный анксиолитический эффект. Крысы группы $3 \times 9\%O_2$ + ВБ чаще и более длительно выходили в открытые рукава установки ПКЛ, больше исследовали центр установки в начале тестирования, чем животные с пост-стрессорной патологией. Наряду с этим в модели ПТСР в группе $3 \times 9\%O_2$ базальный уровень кортикостерона в плазме крови был выше, чем в контроле и у группы ПТСР. Учитывая известный факт, что при ПТСР нередко развивается гипофункция периферического звена ГГАС (De Kloet et al., 2006; Lehrner et al., 2016; Yehuda, 2005), можно предполагать, что данный стимулирующий эффект кондиционирующего режима ИГТ, нацеленный на предотвращение гормональной дисфункции ГГАС, может рассматриваться как один из механизмов стресс-протективного действия данного режима ИГТ в модели ПТСР (Bower, Yehuda, 2017; Daskalakis et al., 2016). Кроме того, как нами было показано ранее, умеренное повышение уровня кортикостерона в крови наблюдается при применении наиболее эффективных режимов гипоксического гипобарического прекодиционирования и сопровождается повышением устойчивости мозга к гипоксии и стрессам (Зенько, Рыбникова, 2020; Рыбникова и др., 2008). В группах с ИГТ $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$ стимулирующего эффекта на ГГАС не выявлено, однако отмечается низкий уровень тревожности в ПКЛ. Таким образом, эти три кондиционирующих режима высокой и средней интенсивности обладали наиболее выраженным анксиолитическим эффектом. В режимах ИГТ другой интенсивности и длительности показатели тревожности в основном находились на уровне контрольных животных, что может свидетельствовать об их эффективности в коррекции экспериментального ПТСР, однако меньшей, чем у режимов $3 \times 9\%O_2$, $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$.

Для модели ПТСР “стресс—рестресс” не характерны нарушения двигательной активности, что было показано в тесте ОП — по этому показателю группы модельной патологии и всех режимов ИГТ не отличались от контроля, однако в группе ПТСР-подобной патологии наблюдались эпизоды иммобилизации, которые можно связать с повышенной тревожностью животных в этой модели. В режимах $15 \times 12\%O_2$ + ПТСР, $7 \times 12\%O_2$ + ПТСР, $3 \times 16\%O_2$ + ПТСР у отдельных животных также была отмечена иммобилизация, а в режимах $3 \times 9\%O_2$ + ПТСР, $3 \times 12\%O_2$ + ПТСР и контроле иммобилизация полностью отсутствовала. Эти данные, также как и результаты по показателю уровня тревожности, обсужденные выше, могут свидетельствовать об ограниченной эффективности тренировочных режимов и режима низкой интенсивности ($15 \times 12\%O_2$, $7 \times 12\%$, $3 \times 16\%O_2$) в модели ПТСР, и наибольшей эффективности кондиционирующих режимов высокой и средней интенсивности $3 \times 9\%O_2$ и $3 \times 12\%O_2$.

Режим ИГТ низкой интенсивности $3 \times 16\%O_2$ показал отсутствие стресс-протективного эффекта в изученных моделях депрессии и ПТСР, поскольку патологическая симптоматика у этих животных проявлялась на уровне групп с экспериментальными патологиями.

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что кондиционирующий режим высокой интенсивности $3 \times 9\%O_2$ имел наиболее выраженный антидепрессивный, противотревожный и стресс-протективный эффект в обеих моделях. Близкими к нему по эффективности, но не по всем показателям, были режимы $15 \times 12\%O_2$, $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$.

$15 \times 12\%O_2$ — тренировочный режим наибольшей длительности, оказывал превентивное действие в модели ВБ. $7 \times 12\%O_2$, тренировочный режим средней интенсивности, обладал анксиолитическим эффектом, а $3 \times 12\%O_2$, кондиционирующий режим средней интенсивности, — и антидепрессивным, и анксиолитическим эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных работ установлено, что ИГТ значительно повышает стрессоустойчивость в моделях тревожно-депрессивных патологий. Наиболее заметное влияние на выраженность эффекта оказывает

интенсивность гипоксического воздействия. Показано, что принципы кондиционирования успешно могут применяться и при разработке подходов ИГТ, поскольку кондиционирующий режим $3 \times 9\%O_2$ оказался наиболее эффективным режимом из всех протестированных. При снижении уровня гипоксии до $12\% O_2$ эффективность антидепрессивного или анксиолитического эффекта частично или полностью сохраняют режимы с увеличением количества сеансов (3, 7 и 15). При этом увеличение количества сеансов с 3 до 7 (в режимах $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$) не приводит к усилению анксиолитического эффекта, поэтому такое увеличение нецелесообразно. Снижение интенсивности до $16\% O_2$ приводит к выраженному снижению основных стресс-протективных свойств ИГТ в данных моделях патологий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кондиционирующие режимы ИГТ имеют значительный трансляционный потенциал для здравоохранения, поэтому с целью формирования доказательной базы необходимо дальнейшее изучение протективных эффектов и механизмов данных режимов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00781).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранова К.А., Зенько М.Ю. Анксиолитический эффект дистантного ишемического пре- и посткондиционирования в модели посттравматического стрессового расстройства. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 2018. 68 (5): 663–672.
- Зенько М.Ю., Рыбникова Е.А. Роль глюкокортикоидных гормонов в стресс-протективных эффектах гипоксического посткондиционирования в моделях депрессии и посттравматического стрессового расстройства у крыс. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2020. 70 (6): 825–836.
- Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Пивина С.Г., Ордян Н.Э., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Гормональные механизмы гипоксического пре-кондиционирования у крыс. Докл. РАН. 2008. 421 (5): 713–715.
- Balestra C., Lambrechts K., Mrakic-Spota S., Vezzoli A., Levenez M., Germonpré P., Virgili F., Bosco G., Lafère P. Hypoxic and hyperoxic breathing as a complement to low-intensity physical exercise programs: a proof-of-principle study. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22: 9600.
- Bowers M.E., Yehuda R. Neuroendocrinology of post-traumatic stress disorder: Focus on the HPA Axis. *Stress: Neuroendocrinology and neurobiology, handbook of stress.* 2017. 2: 165–172.
- Cai M.C., Huang Q.Y., Liao W.G., Wu Z., Liu F.Y., Gao Y.Q. Hypoxic training increases metabolic enzyme activity and composition of α -myosin heavy chain isoform in rat ventricular myocardium. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2010. 108: 105–111.
- Cao K.Y., Zwillich C.W., Berthon-Jones M., Sullivan C.E. Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 1992. 73: 2083–2088.
- Carpiniello B. The mental health costs of armed conflicts — a review of systematic reviews conducted on refugees, asylum-seekers and people living in war zones. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023. 20: 2840.
- Conkin J., Wessel J.H. Critique of the equivalent air altitude model. *Aviation, space, and environmental medicine.* 2008. 79 (10): 975–982.
- Cooke J.E., Eirich R., Racine N., Madigan S. Prevalence of posttraumatic and general psychological stress during COVID-19: A rapid review and meta-analysis. *Psychiatry Research.* 2020. 292: 113347.
- Daskalakis N.P., McGill M.A., Lehrner A., Yehuda R. Endocrine aspects of PTSD: Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and beyond. *Comprehensive Guide to Post-Traumatic Stress Disorders.* 2016. 245–260.
- De Kloet C., Vermetten E., Geuze E., Kavelaars A., Heijnen C., Westenberg H. Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *J. Psychiatr. Res.* 2006. 40 (6): 550–567.
- Hall C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Psychol.* 1936. 22 (3): 345.
- Henkel V., Bussfeld P., Möller H.J., Hegerl U. Cognitive-behavioural theories of helplessness/hopelessness: valid models of depression? *European archives of psychiatry and clinical neuroscience.* 2002. 252: 240–249.
- Iversen A.C., Fear N.T., Ehlers A., Hughes J.H., Hull L., Earnshaw M., Greenberg N., Rona R., Wessely S., Hotopf M. Risk factors for post-traumatic stress disorder among UK Armed Forces personnel. *Psychol. Med.* 2008. 38: 511–522.

- Jakupcak M., Luterek J., Hunt S., Conybeare D., McFall M.* Posttraumatic stress and its relationship to physical health functioning in a sample of Iraq and Afghanistan war veterans seeking postdeployment VA Health Care. *J. Nerv. Ment. Dis.* 2008. 196: 425–428.
- Knaupp W., Khilnani S., Sherwood J., Scharf S., Steinberg H.* Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* 1992. 73: 837–840.
- Lehrner A., Daskalakis N., Yehuda R.* Cortisol and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD. *Posttraumatic Stress Disorder.* 2016. 265–290.
- Liberzon I., Krstov M., Young E.A.* Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology.* 1997. 22 (6): 443–453.
- Loeppky J.A., Roach R.C., Maes D., Hinghofer-Szalkay H., Roessler A., Gates L., Fletcher E.R., Icenogle M.V.* Role of hypobaric in fluid balance response to hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 2005. 6: 60–71.
- Mahmud S., Mohsin M., Dewan M.N., Muyeed A.* The global prevalence of depression, anxiety, stress, and insomnia among general population during COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Trends in Psychol.* 2023. 31: 143–170.
- Mazza M.G., De Lorenzo R., Conte C., Poletti S., Vai B., Bollettini I., Melloni E.M.T., Furlan R., Ciceri F., Rovere-Querini P., Benedetti F.* Anxiety and depression in COVID-19 survivors: role of inflammatory and clinical predictors. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2020. 89: 594–600.
- Millet G.P., Faiss R., Pialoux V.* Point: Counterpoint: Hypobaric hypoxia induces/does not induce different responses from normobaric hypoxia. *Journal of applied physiology.* 2012. 112 (10): 1783–1784.
- Navarrete-Opazo A., Mitchell G.S.* Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. 307: R1181–R1197.
- Obuobi-Donkor G., Oluwasina F., Nkire N., Ag-yapong V.I.O.* A scoping review on the prevalence and determinants of post-traumatic stress disorder among military personnel and firefighters: Implications for public policy and practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022. 19 (3): 1565.
- Park H.Y., Jung W.S., Kim S.W., Lim K.* Effects of interval training under hypoxia on the autonomic nervous system and arterial and hemorheological function in healthy women. *Int. J. Womens Health.* 2022. 14: 79–90.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985. 14 (3): 149–167.
- Rodriguez F.A., Casas H., Casas M., Pagés T., Rama R., Ricart A., Ventura J.L., Ibáñez J., Viscor G.* Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1999. 31: 264–268.
- Rybnikova E.A., Baranova K.A., Zenko M.Yu., Churilova A.V., Stupin K.N.* Comparative analysis of various modes of preconditioning to increase high altitude tolerance. *Integrative Physiology.* 2022. 3 (3): 348–358.
- Rybnikova E.A., Nalivaeva N.N., Zenko M.Y., Baranova K.A.* Intermittent hypoxic training as an effective tool for increasing the adaptive potential, endurance and working capacity of the brain. *Front. Neurosci.* 2022. 16: 941740.
- Seligman M.E., Beagley G.* Learned helplessness in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1975. 88 (2): 534.
- Seligman M.E., Maier S.F.* Failure to escape traumatic shock. *Journal of experimental psychology.* 1967. 74 (1): 1.
- Walf A.A., Frye C.A.* The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2007. 2 (2): 322–328.
- Wang S., Zhang Y., Ding W., Meng Y., Hu H., Liu Z., Zeng X., Wang M.* Psychological distress and sleep problems when people are under interpersonal isolation during an epidemic: A nationwide multicenter cross-sectional study. *European Psychiatry.* 2020. 63 (1): e77.
- Willner P.* Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1986. 10 (6): 677–690.
- Yehuda R.* Neuroendocrine aspects of PTSD. *Anxiety Anxiolytic Drugs.* 2005. 371–403.
- Zembron-Lacny A., Tylutka A., Wacka E., Wawrzyniak-Gramacka E., Hiczekiewicz D., Kasperska A., Czuba M.* Intermittent hypoxic exposure reduces endothelial dysfunction. *Biomed Res. Int.* 2020. 2020: 6479630.
- Zenko M.Y., Rybnikova E.A.* Cross-Adaptation: from F.Z. Meerson to the Present. Part 2. Mechanisms of Cross-Adaptation. *Neurosci Behav Physi.* 2023. 53: 409–415.

THE EFFECTS OF VARIOUS MODES OF INTERVAL HYPOXIC TRAINING IN EXPERIMENTAL MODELS OF ANXIETY AND DEPRESSION IN RATS

M. Y. Zenko^a, K. A. Baranova^a, M. V. Kukina^a, and E. A. Rybnikova^{a, #}

^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

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

The development of non-drug methods for correcting stress-induced disorders and improving adaptation to stressful factors remains an urgent task of physiology, which has a great translational potential. Previously, we proposed effective methods of hypoxic hypobaric preconditioning and distant ischemic conditioning in this regard. The purpose of this work was to transfer the principles of preconditioning to the approaches of normobaric intermittent hypoxic training (IHT). The effects of five new IHT regimens (3 five-minute sessions of hypoxia of 16% O₂ per day, 3 sessions of 12% O₂, 7 sessions of 12% O₂, 15 sessions of 12% O₂, 3 sessions of 9% O₂) were studied in experimental models of depression and post-traumatic stress disorder in rats. The preconditioning regime of high intensity 3×9%O₂ had the most pronounced antidepressant and anxiolytic effect in models of both pathologies. With a decrease in the level of hypoxia to 12% O₂, IHT regimens partially retained their effectiveness with an increase in the number of sessions. The training regime of the longest duration – 15 × 12%O₂, was effective in correcting the formation of experimental depression. The intermediate regime – 7 × 12%O₂, had an anxiolytic effect, while the preconditioning regime of medium intensity – 3 × 12%O₂, demonstrated both an antidepressant and anxiolytic effect. The results indicate that the intensity of hypoxic exposure had the greatest impact on the effectiveness. At the same time, a decrease in the intensity to 16% O₂ led to a weakening or loss of stress-protective properties. With regard to the 3 × 9%O₂ regime as the most promising, it is advisable to conduct further studies to identify the molecular mechanisms that implement its stress-protective and anxiolytic effects.

Keywords: hypoxia, adaptation, intermittent hypoxic training, posttraumatic stress disorder, depression