

УДК 612.88+57.045

ИНТЕРФЕРОН $\alpha 2b$ КАК МОДУЛЯТОР АФФЕРЕНТНОГО ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОГО СИНАПСА ВЕСТИБУЛЯРНОГО АППАРАТА ЛЯГУШКИ

© 2023 г. И. В. Рыжова^{a, *}, Е. А. Корнева^b, Т. В. Тобиас^a,
Е. А. Протасов^b, Е. А. Вершинина^a

^aИнститут физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^bИнститут экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: ireneryzhova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 13.05.2023 г.

Известно, что молекулы, вовлеченные в формирование врожденного и адаптивного иммунного ответа, могут модулировать синаптическую активность центральной нервной системы. Интерфероны широко используются в лечении онкологических и вирусных заболеваний. Несмотря на то что интерфероны относят к ототоксическим веществам, механизм их воздействия на синаптическую активность внутреннего уха остается неизученным. Целью работы явилось изучение модулирующего влияния интерферона $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) на функцию афферентного глутаматергического синапса в условиях аппликации препарата в синаптическую зону. Эксперименты были проведены на изолированном вестибулярном аппарате лягушки при помощи электрофизиологического метода. IFN- $\alpha 2b$ (0.2–40 нг/мл) вызывал повышение фоновой импульсной активности афферентных волокон с последующим снижением частоты разрядов, как правило, в ответ на аппликацию высоких концентраций. IFN- $\alpha 2b$ уменьшал ответ на аппликацию глутамата (L-Glu) и модулировал частоту активности афферентных волокон, восстановленную L-Glu на фоне блока выделения медиатора из волосковых клеток в гипер- Mg^{2+} –гипо- Ca^{2+} -растворе, что предполагает постсинаптическое влияние интерферона. Представленные данные свидетельствуют о нейромодулирующем действии IFN- $\alpha 2b$ на синаптическую активность афферентного синапса вестибулярного аппарата.

Ключевые слова: провоспалительные цитокины, интерферон, вестибулярный аппарат, волосковая клетка, глутаматергический синапс, нейроиммунотуляция

DOI: 10.31857/S0233475523060087, EDN: GLDJXD

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система обеспечивает защиту организма от вторжения микроорганизмов и их патологического воздействия. Считают, что индукция интерферонов является первой линией защиты организма от разнообразных патогенов [1]. Развитие вирусной инфекции может сопровождаться изменением экспрессии генов различных классов интерферонов. Интерфероны- α/β , - γ и - λ подавляют репликацию ДНК и РНК вирусов и активируют клетки иммунной системы. Интерфероны обладают иммуномодулирующим действием, играют важную роль в процессах взаимодействия нервной и иммунной систем, запуская экспрессию цитокинов в клетках центральной нервной системы (ЦНС) при развитии патологических процессов различной этиологии [2].

Препараты провоспалительных цитокинов, к которым относятся и интерфероны, используют-

ся при лечении псориаза [3], онкологических заболеваний [4, 5], рассеянного склероза и таких вирусных инфекций, как грипп [6], гепатит С [7, 8], COVID-19 [9].

Применение интерферонов в лечебной практике широко освещено в научной литературе. Анализ клинических данных позволяет заключить, что при разных видах патологии применяется терапия интерферонами с существенным варьированием длительности лечения (дни–месяцы) и доз (от 1000 до 5000000 МЕ). Однако широкое применение интерферонов, особенно в высоких дозах, ограничивается такими тяжелыми побочными эффектами, как усталость, головная боль, гипертермия, озноб, миалгия, бессонница, депрессия, психоз и бессонница. Интерфероны оказывают выраженное побочное действие и на сенсорные функции, вызывая ретинопатию [10], острую потерю слуха, тиннитус и вертиго [11, 12].

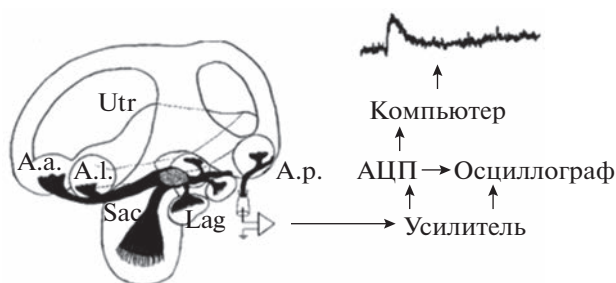


Рис. 1. Схема регистрации импульсной активности нерва, контактирующего с *ampulla posterior*, в изолированном вестибулярном аппарате лягушки. Utr — утрикулус, Sac — саккулус, Lag — лагена, A.a., A.l., A.p. — передняя, латеральная и задняя ампулы соответственно.

Несмотря на то что интерферон по клиническим данным признан ототоксическим препаратом, систематическое изучение его влияния на функцию внутреннего уха не проводилось. Задача настоящей работы состояла в исследовании влияния IFN- α 2b на активность афферентного глутаматергического синапса вестибулярного аппарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 49 изолированных вестибулярных аппаратах лягушек *Rana temporaria* ($n = 49$) в осенне-зимний период. Хрящевая капсула с вестибулярным аппаратом вскрывалась с сохранением всех структур внутреннего уха и отделялась от черепа в физиологическом растворе в чашке Петри. Препарат при комнатной температуре помещался в ванночку, непрерывно перфузируемую физиологическим раствором, максимально приближенным к составу перилимфы, в мМ: 117 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaHCO₃, 0.17 NaH₂PO₃·2H₂O, 1.8 CaCl₂, 2.5 глюкоза (pH 7.4). Ампулярный нерв заднего полукружного канала засасывался стеклянным электродом с диаметром кончика 100–300 мкм, заполненным физиологическим раствором. Импульсная активность регистрировалась с использованием усилителя переменного тока AM-Systems, Model 3000, преобразовывалась посредством аналого-цифрового преобразователя (АЦП) в прямоугольные импульсы длительностью 1.5 мс, которые контролировались на экранах двухлучевого осциллографа и компьютера онлайн и сохранялись при помощи оригинальной программы (рис. 1).

АЦП и компьютерная программа “Импульс”, с помощью которых проводилась регистрация множественной импульсной активности сенсорных волокон, контактирующих с рецепторными клетками заднего полукружного канала, разработаны и выполнены в лаборатории информационных технологий и математического моделирования Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Каждая точка записи представляла усредненное значение частоты афферентной импульсной активности, регистрируемой за 10 с. Для зрительного контроля импульсная активность подавалась параллельно на осциллограф С1-93. В каждом опыте проводилось предварительное тестирование препарата растворами L-Glu (50 мкМ, Sigma) или раствором с повышенным содержанием Mg²⁺ (рис. 2a). Аппликацию исследуемых растворов в синаптическую зону осуществляли методом внешней перфузии при помощи 6-канальной системы Warner Instrument Corporation WC-6. В экспериментах использовались растворы L-Glu в концентрации 50–100 мкМ и IFN- α 2b в концентрациях 0.2–40 нг/мл, разведенные в указанном выше физиологическом растворе (pH 7.4).

IFN- α 2b получали из аптечного препарата “Интерферон альфа-2b” (“Альтевир”, ООО Фармапарк), раствор в ампулах по 5 000 000 МЕ, путем очистки с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве стандарта для определения подлинности и концентрации IFN- α 2b использовали коммерческий препарат IFN-alpha 2b human (Sigma-Aldrich, SRP4595). Очистку и последующий анализ чистоты препарата IFN- α 2b выполняли на хроматографе высокого давления Agilent 1200 с использованием колонки Vydac C-18 218TP1010 250 мм длиной и 10 мм шириной. Препарат из ампул загружали на колонку с помощью петли 10 мкл, промывали раствором 30% ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой и проводили элюцию градиентом концентрации ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой от 30 до 60% за 10 мин со скоростью 4 мл/мин. Фракцию, содержащую пик IFN- α 2b, разбавляли в 3 раза дистиллированной водой и лиофилизировали. Лиофилизат растворяли в стерильном физиологическом растворе с 20 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.4, анализировали для определения концентрации вещества и подтверждения его подлинности на колонке Vydac C-18 218TP54 250 мм длиной и 4.6 мм шириной в градиенте концентрации ацетонитрила с 0.1% трифторуксусной кислотой от 30 до 60% за 30 мин со скоростью 1 мл/мин. Конечная концентрация IFN- α 2b в натрий-фосфатном буфере составила 0.2 мг/мл.

Для исследования взаимодействия IFN- α 2b с постсинаптическими глутаматными рецепторами использовали гипермagneвий-гипокальциевый раствор, содержащий 4 мМ Mg²⁺ и 0.1 мМ Ca²⁺ в мМ: 83.4 NaCl, 1.7 KCl, 3.4 NaHCO₃, 2.5 NaH₂PO₃·7H₂O, 0.1 CaCl₂, 4 MgCl₂·6H₂O, 2.5 глюкоза (pH 7.4), аппликация которого в синаптическую область вызывала прекращение фонового выделения глутамата волосковыми клетками. Растворы L-Glu (1 мМ) и L-Glu (1 мМ) с IFN- α 2b (40 нг/мл), применяемые в данных эксперимен-

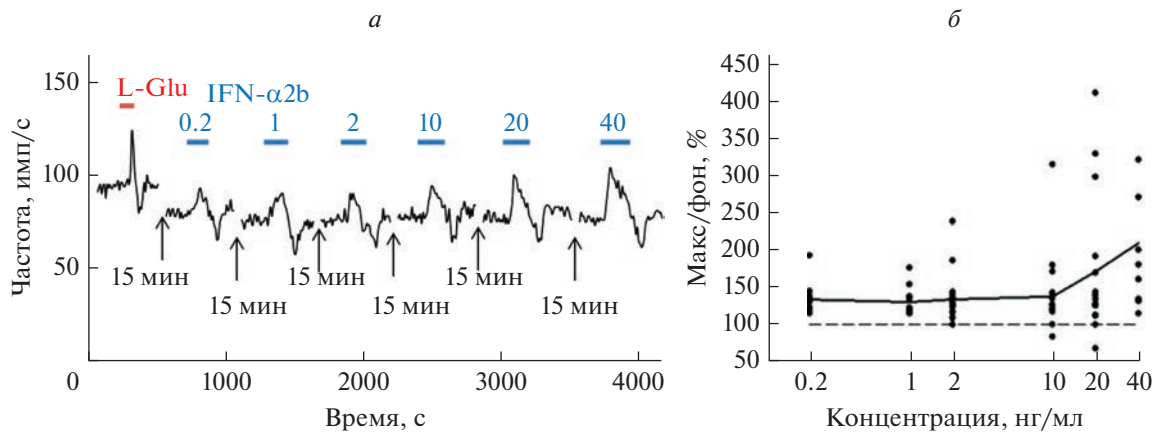


Рис. 2. Частота фоновой активности афферентных волокон, иннервирующих задний полукружный канал, при воздействии интерферона в различных концентрациях.

a — Оригинальная запись эксперимента. Горизонтальные линии — отметки аппликации IFN- $\alpha 2b$ в указанных концентрациях (нг/мл). Промежуток между аппликацией препарата составлял не менее 15 мин. *б* — Диаграмма рассеяния данных по всем опытам, отражающая средние значения изменения импульсной активности (сплошная линия, в % к фону) и разброс значений отдельных опытов относительно среднего при аппликации различных концентраций IFN- $\alpha 2b$. Горизонтальная пунктирная линия — уровень фоновой импульсации. По оси абсцисс — концентрация IFN- $\alpha 2b$ (нг/мл). По оси ординат — отношение максимального значения положительной фазы реакции при аппликации IFN- $\alpha 2b$ к частоте фоновой активности в % ($n = 12-21$).

тах, также готовились на основе гипермагниевого-гипокальциевого раствора (pH 7.4).

Влияние IFN- $\alpha 2b$ на уровень фоновой активности афферентных волокон оценивали как отношение максимального значения импульсной активности при аппликации IFN- $\alpha 2b$ к первоначальному уровню фоновой активности в процентах.

Воздействие L-Glu и L-Glu после аппликации IFN- $\alpha 2b$ оценивали в процентах как отношение Δ (разница между максимальной амплитудой ответа на аппликацию L-Glu и частотой импульсной активности в период, предшествующий его воздействию) к частоте импульсной активности в период, предшествующий подаче L-Glu.

$$\frac{\text{Макс. частота ответа (имп/с)} - \text{частота фон. имп. акт. перед аппликац. (имп/с)}}{\text{частота фон. имп. акт. перед аппликац. (имп/с)}} \cdot 100\%.$$

Последующий статистический анализ результатов проводили с нормированными данными с использованием *t*-теста, U-критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. Исследование влияния препаратов на импульсную активность проводили методами дисперсионного анализа для зависимых переменных (ANOVA RM), а также смешанного дисперсионного анализа (Mixed ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями по Бонферрони при числе градаций фактора больше двух.

В ходе экспериментов оказалось, что величина ответа на аппликацию L-Glu на фоне интерферона зависит от направления изменения импульсной активности при аппликации самого интерферона. Статистическое подтверждение было получено с использованием корреляционного, кластерного (иерархический метод, between-groups linkage) и дискриминантного анализа.

Статистические решения принимали на 5% уровне значимости. Анализ данных проводился на основе программного комплекса “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS Inc).

Построение графиков изменения частоты импульсной активности во времени при действии IFN- $\alpha 2b$ осуществляли после окончания эксперимента на основании полученного цифрового материала с помощью программы MS-Excel и программы SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние IFN- $\alpha 2b$ на фоновую активность афферентных волокон, контактирующих с задним полукружным каналом, исследовали при концентрациях 0.2, 1, 2, 10, 20 и 40 нг/мл (рис. 2).

Характер ответов на аппликацию IFN- $\alpha 2b$: скорость нарастания и динамика импульсной активности значительно варьировали от опыта к

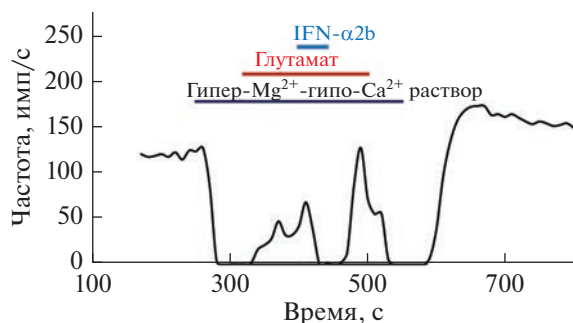


Рис. 3. Модулирующий эффект IFN- α 2b (40 нг/мл) постсинаптических глутаматных рецепторов после блока пресинаптической мембраны в гипер-Mg²⁺–гипо-Ca²⁺-растворе. Оригинальная запись эксперимента.

опыту. При этом средние значения изменения частоты фоновой активности при аппликации всех исследуемых концентраций IFN- α 2b значимо увеличивались по сравнению с уровнем фоновой активности. Различия (в %) между уровнем фоновой активности и максимальной частотой активности при аппликации различных концентраций интерферона, выявленные критерием Вилкоксона, были значимы и составляли для концентраций 0.2 нг/мл – $133.55 \pm 6.0\%$, $p = 0.018$; для 1 нг/мл – $130.2 \pm 5.85\%$, $p = 0.028$; для 2 нг/мл – $133.8 \pm 6.45\%$, $p = 0.001$; для 10 нг/мл – $137.69 \pm 11.68\%$, $p = 0.004$; для 20 нг/мл – $171.2 \pm 24.95\%$, $p = 0.021$; для 40 нг/мл – $184.9 \pm 16.1\%$, $p = 0.028$ (рис. 2б). В большинстве случаев при малых концентрациях (0.2–10 нг/мл) ответ характеризовался небольшим колебанием частоты фоновой активности в ходе перфузии синаптической области цитонином.

При аппликации IFN- α 2b в концентрациях 20–40 нг/мл после повышения частоты фоновой активности могла развиваться небольшая по амплитуде, но длительная негативная фаза ответа. При концентрациях IFN- α 2b 10–40 нг/мл уровень фоновой активности не всегда восстанавливался при длительной перфузии в физиологическом растворе.

Для исследования возможного влияния интерферона на постсинаптические структуры изучали влияние цитокина на активность постсинаптических глутаматных рецепторов. Синаптическую область перфузировали гипер-Mg²⁺–гипо-Ca²⁺-раствором, что приводило к прекращению выделения глутамата волосковыми клетками и, как следствие, к падению фоновой активности до нуля. Последующее добавление L-Glu (1 мМ) к гипер-Mg²⁺–гипо-Ca²⁺-раствору вызывало появление импульсной активности, обусловленной селективной активацией постсинаптических глутаматных рецепторов. Последующая добавка

IFN- α 2b (40 нг/мл) приводила к позитивно-негативному изменению восстановленного L-Glu уровня фоновой активности. Наблюдаемые реакции были обратимы и наблюдались в 7 опытах из 7 (рис. 3).

Высокая пластичность афферентного синапса вестибулярного эпителия обеспечивается совместным функционированием глутаматергической [13], опиатной [14], допаминергической [15] и холинергической [16, 17] систем.

Для того чтобы показать, что функция глутаматных рецепторов может быть подвержена модуляции при воздействии интерферона, сравнивали изменение частоты импульсной активности в ответ на аппликацию L-Glu в нормальном физиологическом растворе (тестовое предъявление) и на фоне действия IFN- α 2b (10 нг/мл). Для этого вначале синаптическую область в течение 1–1.5 мин перфузировали раствором, содержащим L-Glu (0.1 мМ), что сопровождалось увеличением частоты импульсной активности. После возвращения импульсной активности к исходному уровню в нормальном физиологическом растворе последовательно апплицировали IFN- α 2b (10 нг/мл, 2 мин), затем IFN- α 2b (10 нг/мл) совместно с L-Glu (0.1 мМ). Через 15 мин после окончания перфузии синаптической области раствором IFN- α 2b и L-Glu и отмывания препарата нормальным физиологическим раствором проводили контрольную аппликацию L-Glu (0.1 мМ) (рис. 4).

Результаты 12 опытов по исследованию влияния IFN- α 2b на амплитуду ответов, вызванных L-Glu, показали, что перфузия синаптической области IFN- α 2b приводила к модификации ответа L-Glu (ANOVA RM, $F(2,10) = 4.85$, $p = 0.034$, $\eta^2 = 0.492$) (рис. 4), а величины ответов на L-Glu, IFN- α 2b и L-Glu на фоне IFN- α 2b были высоко коррелированы ($r = 0.966$, $r = 0.976$ и $r = 0.97$ соответственно, $p < 0.001$). Апостериорные сравнения по Бонферрони давали значимые различия между эффектом влияния L-Glu и IFN- α 2b, $p = 0.037$. Аналогичные результаты получили при использовании критерия Фридмана и парного критерия Вилкоксона, $p = 0.009$ и $p = 0.012$ соответственно.

Как представлено на рис. 2б, увеличение средних значений при аппликации IFN- α 2b в концентрациях 20 и 40 нг/мл сопровождается значительным разбросом данных вокруг средних значений. А именно, в небольшой части опытов IFN- α 2b либо не увеличивал частоту фоновой активности афферентных волокон, либо вызывал небольшое (менее 10%) понижение частоты фоновой импульсной активности. Визуальный анализ изменения импульсной активности в ответ на воздействие L-Glu на фоне IFN- α 2b позволил предположить, что вектор модулирующего влияния цитокина на аппликацию L-Glu связан с направ-

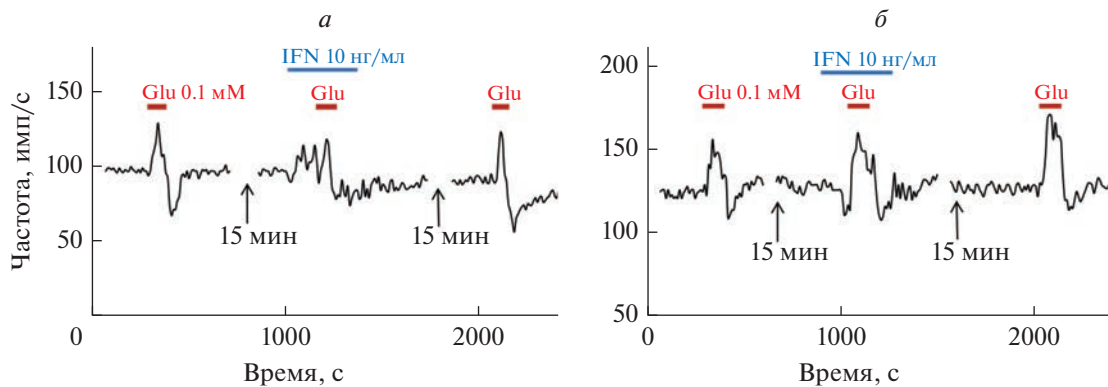


Рис. 4. Оригинальная запись двух опытов, иллюстрирующих: *a* – уменьшение ответа на аппликацию L-Glu на фоне увеличения уровня фоновой активности афферентных волокон при воздействии IFN- $\alpha 2b$; *б* – увеличение ответа на аппликацию L-Glu на фоне понижения частоты фоновой активности при аппликации IFN- $\alpha 2b$ в афферентных волокнах вестибулярного аппарата лягушки. Горизонтальные отметки над записью – время аппликации веществ, Glu – L-Glu, IFN – IFN- $\alpha 2b$.

ленностью влияния IFN- $\alpha 2b$ на уровень фоновой активности (рис. 4*a*, 4*б*). Если L-Glu апплицировали на фоне увеличения уровня фоновой активности, вызванной IFN- $\alpha 2b$, наблюдалось уменьшение величины ответа на воздействие L-Glu (рис. 4*a*). Если IFN- $\alpha 2b$ понижал уровень фоновой активности или не изменял его, то наблюдалось увеличение импульсной активности при аппликации L-Glu (рис. 4*б*).

Кластерный анализ выявил два кластера данных, значимо различающихся по характеру воздействия IFN- $\alpha 2b$ на частоту фоновой активности и по связанному с ним эффекту L-Glu (рис. 5). В дискриминантном анализе с выявленными кластерами в качестве групп при 100%-ной правильной классификации были получены значимые различия групповых средних по влиянию IFN- $\alpha 2b$ ($p = 0.009$) и L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$, $p < 0.001$.

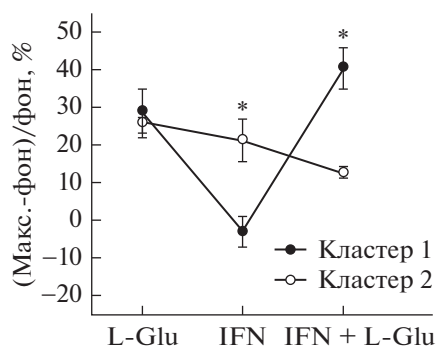


Рис. 5. Визуализация двух кластеров импульсной активности при воздействии IFN- $\alpha 2b$ (IFN) и L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ (IFN + L-Glu). По оси ординат представлены средние значения переменных с ошибками, $M \pm SE$ в кластерах, звездочками обозначены значимые различия.

Применение двухфакторного смешанного дисперсионного анализа Mixed ANOVA подтвердило суммарную значимость изменения импульсной активности между кластерами 1 и 2 при воздействии L-Glu, IFN- $\alpha 2b$ и IFN- $\alpha 2b$ совместно с L-Glu ($F(2,20) = 19.2$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.657$). В кластерах также значимо различались изменения импульсной активности в ответ на аппликацию IFN- $\alpha 2b$ и зависящие от характера этих изменений ответы на воздействие L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ ($F(2,20) = 12.1$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.548$).

Апостериорные сравнения выявили значимые различия в кластерах влияния на импульсную активность IFN- $\alpha 2b$ ($p = 0.009$) и влияния L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ ($p < 0.001$). При этом в первом кластере, характеризующемся незначительным уменьшением частоты фоновой активности в ответ на аппликацию IFN- $\alpha 2b$, небольшое увеличение ответа L-Glu на фоне IFN- $\alpha 2b$ по сравнению с величиной тестовой реакции на L-Glu было статистически незначимо. Напротив, во втором кластере, характеризующемся увеличением частоты фоновой активности при воздействии IFN- $\alpha 2b$, наблюдалось значимое уменьшение амплитуды ответа на L-Glu ($p = 0.048$) (рис. 5).

Совокупность представленных данных позволяет говорить о существовании нейроиммунотулирующего влияния цитокина в вестибулярном эпителии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерфероны представляют собой группу гормоноподобных молекул, которые в ЦНС могут синтезироваться и секретироваться макрофагами, моноцитами, Т-лимфоцитами, глияльными клетками и нейронами [18]. Показано, что у здоровых людей уровень цитокинов и хемокинов в

структурах внутреннего уха находится на крайне низком уровне. Однако при повышении уровня липополисахаридов и при патологии (болезни Меньера) наблюдается повышение уровня таких цитокинов и хемокинов, как IL-10, IL-1 β , IL-6, CCL5, CXCL1, IFN α 2 и CXCL5 [19]. Известно, что цитокины и хемокины оказывают модулирующее влияние на функции нервной системы. Сведения о нейроиммунотропном влиянии интерферонов на синаптические процессы внутреннего уха крайне ограничены.

В нашей работе впервые показано, что провоспалительный цитокин IFN- α 2b, относящийся к интерферонам I типа, может оказывать модулирующее влияние на активность афферентного глутаматергического синапса вестибулярного аппарата.

Действительно, значимое повышение уровня фоновой импульсной активности афферентного синапса под влиянием IFN- α 2b наблюдается уже при концентрации 0.2 нг/мл, что соответствует 268 пмоль/л и предполагает высокоаффинное связывание IFN- α 2b с мембранами вестибулярного эпителия, приводящее к изменению функционального состояния мембраны. Полученные нами доказательства высокой чувствительности глутаматергического синапса вестибулярного аппарата к IFN- α 2b находятся в соответствии с данными о специфическом высокоаффинном связывании интерферона с его рецепторами (IFN- α /bR) в культуре ткани мыши [20]. В наших опытах IFN- α 2b в диапазоне концентраций 0.2–10 нг/мл в одинаковой степени стимулировал фоновую импульсную активность, уровень которой восстанавливался в нормальном физиологическом растворе. Последующее увеличение концентраций IFN- α 2b (20 и 40 нг/мл) вызывало дальнейший рост частоты фоновой активности, который сопровождался увеличением разброса данных относительно среднего значения (рис. 2б). Действующие концентрации IFN- α 2b в наших опытах сопоставимы с концентрациями интерферона, оказывающими подавляющее действие на возбуждающую синаптическую передачу в нейронах задних рогов спинного мозга, где интерферон в концентрации 25 нг/мл оказывал депрессивное действие путем активации специфических рецепторов интерферона [21].

Согласно данным литературы, интерферон может оказывать как позитивное, так и негативное влияние на уровень фоновой активности не только в разных структурах ЦНС, но и в пределах одной и той же структуры. А именно, интерферон в 92% случаев повышал, но в 8% случаев понижал частоту импульсной активности в нейронах соматосенсорной коры. Интерферон стимулировал активность нейронов в гиппокампе и в амигдале в 78% случаях, но понижал в 22%. Интерферон

в 75% случаев подавлял активность нейронов вентромедиальных ядер таламуса. Авторы отмечают, что интерферон не изменял латентный период, скорость возрастания возбуждающих и тормозных процессов [22]. Интерферон- α в концентрации 300 U/мл ингибировал вызванные L-Glu возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) и предотвращал долговременную потенциацию, индуцированную высокочастотной тетанической стимуляцией. Интерферон- α значительно понижал вызванную L-Glu амплитуду ВПСП, уменьшал деполяризацию, вызванную локальным применением L-Glu, но не модифицировал деполяризацию, вызванную NMDA [23].

Известно, что фоновая активность афферентных волокон обусловлена высвобождением L-Glu из волосковых клеток [13] и активацией AMPA-рецепторов постсинаптической мембраны [24]. Учитывая тот факт, что IFN- α 2b в наших опытах увеличивал частоту фоновой активности афферентных волокон, можно предположить, что цитокин оказывает модулирующее действие посредством активации AMPA-рецепторов.

Согласно данным литературы [13–15, 17], функция глутаматергического синапса может модулироваться на пре- и постсинаптическом уровне. На пресинаптическом уровне это выражается в увеличении или уменьшении выделения медиатора базальной мембраной волосковой клетки. На постсинаптическом уровне — в изменении чувствительности постсинаптических глутаматных рецепторов. Принимая во внимание тот факт, что квантовое высвобождение глутамата из пресинаптической мембраны афферентного синапса является Ca²⁺-зависимым процессом [25, 26], а Mg²⁺ является антагонистом Ca²⁺, изучали возможность модулирующего влияния интерферона на постсинаптические рецепторы L-Glu в условиях блока выделения медиатора из пресинаптической мембраны при высокой концентрации катионов Mg²⁺. В этих экспериментальных условиях импульсная активность, вызванная действием L-Glu при блоке выделения медиатора катионами Mg²⁺, отражает устойчивую изолированную активацию рецепторов глутамата постсинаптической мембраны. Оказалось, что постсинаптическая импульсная активность афферентных волокон, вызванная аппликацией L-Glu, претерпевала позитивно-негативные изменения при воздействии IFN- α 2b. Вследствие того, что в данной серии экспериментов участие пресинаптических механизмов выделения медиатора блокируется катионами Mg²⁺, можно утверждать, что именно постсинаптические глутаматные рецепторы подвержены модулирующему влиянию интерферона. В то же время нельзя отрицать и возможность пресинаптического влияния цитокина, модули-

рующего выделение глутамата из базальной мембраны волосковой клетки.

Для того чтобы показать, что именно рецепторы глутамата (но, например, не мускариновые рецепторы ацетилхолина, активация которых также увеличивает уровень фоновой активности афферентных волокон) были подвержены нейромодулирующему влиянию цитокина, было изучено влияние интерферона на изменение частоты импульсной активности при аппликации L-Glu. Как видно из рис. 2б, аппликация высоких доз IFN- $\alpha 2b$ в синаптическую область вызывает не только увеличение среднего значения частоты фоновой активности афферентных волокон, но и сопровождается увеличением разброса данных относительно среднего значения. В четверти опытов аппликация IFN- $\alpha 2b$ либо не меняла уровень фоновой активности афферентных волокон, либо незначительно его понижала. Статистический анализ подтвердил гипотезу о том, что вектор модулирующего влияния интерферона на амплитуду ответов L-Glu зависит от характера воздействия цитокина на фоновую активность. Если L-Glu апплицировали при возбуждающем влиянии интерферона, наблюдалось значимое уменьшение амплитуды ответа на L-Glu относительно нового, цитокином созданного уровня. Напротив, в меньшинстве опытов при неизменном уровне фоновой активности или его незначительном ингибировании наблюдалось усиление возбуждающего ответа L-Glu, но это увеличение оказалось статистически незначимо.

Можно предположить, что изменение частоты импульсной активности в ответ на аппликацию глутамата в присутствии модулирующего агента зависит от характера фоновой импульсной активности, измененной при действии модулирующего вещества (например, интерферона). Эти результаты находятся в соответствии с гипотезой о том, что фоновая и вызванная импульсная активность глутаматергического синапса вестибулярного аппарата опосредуются за счет различных механизмов [13]. Представленные данные указывают на то, что провоспалительный цитокин интерферон I типа может рассматриваться в качестве модулятора импульсной активности в афферентном глутаматергическом синапсе вестибулярного аппарата.

Согласно данным литературы, в ЦНС возбуждающее [27] и депрессивное влияние [21, 23] интерферона реализуется через различные механизмы. Например, интерферон связывается с опиатными рецепторами и с рецепторами интерферона [28, 29], уменьшает высвобождение глутамата из пресинаптической мембраны [21], ингибирует GluN2A-субъединицу NMDA-рецептора без участия классического STAT1-пути [30] и экспрессию переносчика глутамата GLAST [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые показано, что импульсный поток от вестибулярных органов в ЦНС модифицируется интерфероном в зависимости от концентрации цитокина. Такие свойства интерферона делают его одним из возможных кандидатов в нейроиммунномодуляторы афферентной синаптической передачи в периферических структурах вестибулярной системы.

Механизмы влияния интерферона в вестибулярных органах требуют пристального изучения в связи с особенностями морфологического строения и функционирования вестибулярного эпителия. В частности, необходимо ответить на вопросы: какие типы глутаматных рецепторов являются мишенью интерферона, участвует ли опиоидная система в модулирующем влиянии цитокина, воздействует ли интерферон на эфферентную систему внутреннего уха, изменяется ли влияние эфферентной системы на функции глутаматергического синапса в присутствии интерферона. В связи с отсутствием в вестибулярном эпителии глии, играющей ключевую роль в механизмах влияния интерферона в ЦНС, предстоит опровергнуть или подтвердить присутствие рецепторов интерферона в сенсорном эпителии и идентифицировать их локализацию. Эффект воздействия высоких концентраций интерферона на синаптические процессы вестибулярной периферии требует особого изучения в связи с необходимостью уменьшения рисков ототоксических осложнений при разработке схем терапевтического лечения. Данные имеют также фундаментальное значение для понимания механизмов участия интерферонов в процессах взаимодействия нервной и иммунной систем в структурах внутреннего уха.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы ГП-47 “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

Соответствие принципам этики. При проведении исследований мы руководствовались этическими принципами, изложенными в “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang B.X., Fish E.N. 2019. Global virus outbreaks: Interferons as 1st responders. *Semin. Immunol.* **43**, 101300. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101300>
2. Mehta S., Mukherjee S., Balasubramanian D., Chowdhary A. 2014. Evaluation of neuroimmunomodulatory activity of recombinant human interferon α . *Neuroim-*

- munomodulation*. 2014. **21** (5), 250–256.
<https://doi.org/10.1159/000357309>
3. Zhang L.J. 2019. Type1 interferons potential initiating factors linking skin wounds with psoriasis pathogenesis. *Front. Immunol.* **10**, 1440.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01440>
 4. Lasfar A., Abushahba W., Balan M., Cohen-Solal K.A. 2011. Interferon Lambda: A new sword in cancer immunotherapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, **349575**.
<https://doi.org/10.1155/2011/349575>
 5. Stiff A., Carson W. 2015. Investigations of interferon-lambda for the treatment of cancer. *J. Innate Immun.* **7** (3), 243–250.
<https://doi.org/10.1159/000370113>
 6. Klinkhammer J., Schnepf D., Ye L., Schwaderlapp M., Gad H.H., Hartmann R., Garcin D., Mahlaköiv T., Staeheli P. 2018. IFN- λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *eLife*. **7**. e33354.
<https://doi.org/10.7554/eLife.33354>
 7. Smith K.J., Norris S., O'Farrelly C., O'Mara S.M. 2011. Risk factors for the development of depression in patients with hepatitis C taking interferon- α . *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **7**, 275–292.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S13917>
 8. Udina M., Castellví P., Moreno-España J., Navinés R., Valdés M., Fornis X., Langohr K., Solà R., Vieta E., Martín-Santos R. 2012. Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Psychiatry*. **73** (8), 1128–1138.
<https://doi.org/10.4088/JCP.12r07694>
 9. Haji Abdolvahaba M., Moradi-Kalbolandi S., Zarei M., Bose D., Majidzadeh-A K., Farahmand L. 2021. Potential role of interferons in treating COVID-19 patients. *Int. Immunopharmacol.* **90**, 107171.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107171>
 10. Medhat E., Esmat G., Hamza E., Aziz A.A., Fathalah W.F., Darweesh S.K., Zakaria Z., Mostafa S. 2016. Ophthalmological side effects of interferon therapy of chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **5** (3), 209–216.
 11. Mendes-Corrêa M.C.J., Bittar R.S., Salmito N., Oiticica J. 2011. Pegylated interferon/ribavirin-associated sudden hearing loss in a patient with chronic hepatitis C in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **15** (1), 87–89.
 12. Sharifian M.R., Kamandi S., Sima H.R., Zaringhalam M.A., Bakhshae M. 2013. INF- α and ototoxicity. *Biomed. Res. Int.* 2013, **295327**.
<https://doi.org/10.1155/2013/295327>
 13. Guth P.S., Perin P., Norris C.H., Valli P. 1998. The vestibular hair cells: Post-transductional signal processing. *Prog. Neurobiol.* **54** (2), 193–247.
 14. Vega R., Soto E. 2003. Opioid receptors mediate a post-synaptic facilitation and a presynaptic inhibition at the afferent synapse of axolotl vestibular hair cells. *Neuroscience*. **118** (1), 75–85.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00971-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00971-5)
 15. Andrianov G.N., Ryzhova I.V., Tobias T.V. 2009. Dopaminergic modulation of afferent synaptic transmission in the semicircular canals of frog. *Neurosignals*. **17** (3), 222–228.
 16. Holt J.C., Jordan P.M., Lysakowski A., Shah A., Barsz K., Contini D. 2017. Muscarinic acetylcholine receptors and M-currents underlie efferent-mediated slow excitation in calyx-bearing vestibular afferents. *J. Neurosci.* **37** (7), 1873–1887.
 17. Poppi L.A., Holt J.C., Lim R., Brichta A.M. 2020. A review of efferent cholinergic synaptic transmission in the vestibular periphery and its functional implications. *J. Neurophysiol.* **123** (2), 608–629.
<https://doi.org/10.1152/jn.00053.2019>
 18. Farrar W.L., Hill J.M., Harel-Bellan A., Vinocour M. 1987. The immune logical brain. *Immunol. Rev.* **100**, 361–378.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1987.tb00539.x>
 19. Flook M., Frejo L., Gallego-Martinez A., Martin-Sanz E., Rossi-Izquierdo M., Amor-Dorado J.C., Soto-Varela A., Santos-Perez S., Batuecas-Caletrio A., Espinosa-Sanchez J.M., Pérez-Carpena P., Martínez-Martínez M., Aran I., Lopez-Escamez J.A. 2019. Differential proinflammatory signature in vestibular migraine and meniere disease. *Front. Immunol.* **10**, 1229.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01229>
 20. Cohen B., Novick D., Barak S, Rubinstein M. 1995. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol. Cell. Biol.* **15** (8), 4208–4214.
<https://doi.org/10.1128/MCB.15.8.4208>
 21. Liu C.C., Gao Y.J., Luo H., Berta T., Xu Z.Z., Ji R.R., Tan P.H. 2016. Interferon alpha inhibits spinal cord synaptic and nociceptive transmission via neuronal-gli-al interactions. *Sci. Rep.* **6**. 34356.
<https://doi.org/10.1038/srep34356>
 22. Dafny N., Prieto-Gomez B., Dong W.Q., Reyes-Vazquez C. 1996. Interferon modulates neuronal activity recorded from the hypothalamus, thalamus, hippocampus, amygdala and the somatosensory cortex. *Brain Res.* **734** (1–2), 269–274.
 23. Mendoza-Fernández V., Andrew R.D., Barajas-López C. 2000. Interferon-alpha inhibits long-term potentiation and unmasks a long-term depression in the rat hippocampus. *Brain Res.* **885** (1), 14–24.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02877-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02877-8)
 24. Bonsacquet J., Brugeaud A., Compan V., Desmadryl G., Chabbert C. 2006. AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *J. Physiol.* **576** (Pt. 1), 63–71.
 25. Sterling P., Matthews G. 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci.* **28**. 20–29.
 26. Safieddine S., El-Amraoui A., Petit C. 2012. The auditory hair cell ribbon synapse: From assembly to function. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 509–528.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113705>
 27. Qin Z.F., Hou D.Y., Fang Y.Q., Xiao H.J., Wang J., Li K.C. 2012. Interferon-alpha enhances excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of rat spinal cord. *Neuroimmunomodulation*. **19** (4), 235–240.
<https://doi.org/10.1159/000335167>
 28. Панченко Л.Ф., Алябьева Т.Н., Малиновская В.В., Балашов А.М. 1987. Взаимодействие альфа-интерферона с опиатными рецепторами в мозге крыс. *Бюлл. экпер. биол. мед.* **104** (7), 87–89.
 29. Wang J.Y., Zeng X.Y., Fan G.X., Yuan Y.K., Tang J.S. 2006. mu- but not delta- and kappa-opioid receptor

- mediates the nucleus submedius interferon- α -evoked antinociception in the rat. *Neurosci. Lett.* **397** (3), 254–258.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.046>
30. Di Filippo M., Tozzi A., Sara Arcangeli S., de Iure A., Durante V., Di Gregorio M., Gardoni F., Calabresi P. 2016. Interferon- $\beta 1a$ modulates glutamate neurotransmission in the CNS through CaMKII and GluN2A-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology*. **100**, 98–105.
31. Hosseini S., Michaelsen-Preusse K., Grigoryan G., Chhatbar C., Kalinke U., Korte M. 2020. Type I interferon receptor signaling in astrocytes regulates hippocampal synaptic plasticity and cognitive function of the healthy CNS. *Cell Rep.* **31** (7), 107666.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107666>

Interferon $\alpha 2b$ As a Modulator of the Afferent Glutamatergic Synapse of the Frog Vestibular Apparatus

I. V. Ryzhova^{1, *}, E. A. Korneva², T. V. Tobias¹, E. A. Protasov², E. A. Vershinina¹

¹*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

*e-mail: ireneryzhova@mail.ru

Reportedly, the innate and adaptive immunity molecules can modulate the synaptic activity of the central nervous system. Interferons are widely used in the treatment of oncological and viral diseases. Even though interferons are classified as ototoxic substances, the mechanism of their effect on the synaptic activity of the inner ear remains unexplored. Here, we analyzed modulating influences of interferon $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) on the function of afferent glutamatergic synapse in the conditions of drug application to the synaptic zone. The experiments were performed on the isolated vestibular apparatus of a frog (*Rana temporaria*) using an electrophysiological method. IFN- $\alpha 2b$ (0.2–40 ng/mL) caused an increase in the background pulse activity of afferent fibers, followed by a decrease in the frequency of discharges, usually at high concentrations of the interferon. Besides, IFN- $\alpha 2b$ decreased the glutamate (L-Glu) evoked response and modulated the level of afferent fiber activity restored by L-Glu under the conditions of blockade of the glutamate release from hair cells in hyper-Mg²⁺ and hypo-Ca²⁺ solution. This suggests the postsynaptic effect of IFN- $\alpha 2b$. The presented data indicate the neuromodulating effect of interferon on the synaptic activity of the afferent synapse of the vestibular apparatus.

Keywords: pro-inflammatory cytokines, interferon, vestibular apparatus, hair cell, glutamatergic synapse, neuroimmunomodulation