

На правах рукописи

Трегуб Павел Павлович

**МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА
СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПЕРКАПНИИ И
ГИПОКСИИ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Куликов Владимир Павлович

Официальные оппоненты:

Профессор РАН, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (г. Санкт-Петербург)

Рыбникова
Елена
Александровна

доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией экспериментальной кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск)

Маслов Леонид
Николаевич

доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово)

Григорьев
Евгений
Валерьевич

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в __:__ часов на заседании диссертационного совета Д 21.2.068.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Хорошо известно, что гипоксия является не только повреждающим фактором, но и средством, способным увеличивать толерантность головного мозга к гипоксии/ишемии. В современной литературе представлено значительное число работ, посвященных механизмам увеличения толерантности миокарда и головного мозга к действию повреждающих факторов после гипоксического прекондиционирования или курса гипоксических тренировок [Sazontova, T.G. et al., 2016; Dzhalilova D.S. et al., 2018; Jung M.E., Mallet R.T., 2018; Лукьянова Л.Д., 2019; Lukyanova L. et al., 2021; Rybnikova E.A. et al., 2022]. В настоящее время значительно возрос интерес к изучению терапевтической эффективности пермиссивной гиперкапнии и, стало понятно, что углекислый газ в нетоксичных дозах оказывает протекторное действие на головной мозг при гипоксическом/ишемическом повреждении [Zhou Q. et al., 2010; Тао Т. et al., 2013, 2014; Pruiomboom L., Muskiet F.A.J., 2018].

Ранее было установлено, что после сочетанного гиперкапнически-гипоксического воздействия формируется более выраженная толерантность головного мозга к ишемии и гипоксии, по сравнению с их изолированным применением [Tregub P. et al., 2013, 2015].

Однако, нейропротекторные механизмы сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии, по-прежнему, мало изучены. В то же время, эти данные могут стать основой для разработки клинически эффективных методик их сочетанного использования, в т.ч. в комбинации с фармакологическими средствами, для профилактики и лечения инсульта, сосудистой деменции и перинатальных гипоксических повреждений.

Перспективными для исследования механизмами повышения толерантности головного мозга к ишемическому повреждению являются [Obrenovitch T.P., 2008; Majid A., 2014; Ghozy S., 2022]: эффекты шаперонов, усиление синтетической активности нервных клеток, адаптивный ответ эндоплазматического ретикулума, ингибирование апоптоза в околоинсультной области, протекторные эффекты гипоксией-индуцируемого фактора 1-альфа (HIF-1 α), адаптивные эффекты митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов (миток⁺_{АТФ}-каналы) и аденозиновых рецепторов, сохранение избирательной проницаемости и целостности гемато-энцефалического барьера (ГЭБ).

Степень разработанности темы. Известно, что в постнатальном периоде в головном мозге сохраняются стволовые плюрипотентные и прогениторные клетки, имеющие высокий пролиферативный и репаративный потенциал при ишемических повреждениях [Obrenovitch T.P., 2008; Ghozy S., 2022], изучение их в физиологических и гипоксических условиях *in vitro* позволит оценить особенности нейрон-астроглиального взаимодействия и потенциальную роль в механизме нейропротекции после сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии. Кроме того, повышение синтетической и пролиферативной активности является важным компонентом толерантности нервной ткани к ишемии, так как позволяет снизить последствия трофических нарушений в

глиальных клетках и увеличить экспрессию нейромедиаторов, что имеет высокое репаративное значение для нейронов, находящихся в фазе паранекроза и некробиоза [Obrenovitch T.P., 2008; Majid A., 2014;].

Также, интерес представляет изучение соотношения «адаптивной» (запускающей каскад мобилизационных реакций) и «дезадаптивной» (активирующей апоптоз) ветвей ответа эндоплазматического ретикулаума (ЭПР) на возникновение внутриклеточного стресса в толерантном к ишемии органе [Kitamura M., 2008; Зверев Я.Ф. и Брюханов В.М., 2012]. Ключевым звеном «адаптивной» ветви ответа ЭПР является шаперон GRP-78 [Dickhout J.G., Krepinsky J.C., 2009], экспрессия которого повышается при воздействии гипоксического стимула [Ostergaard L. et al., 2009]. Он запускает каскад внутриклеточных реакций, одной из которых является активация транскрипционного ядерного фактора κB (NF- κB), происходящая в ответ на накопление в просвете ЭПР дефектных белков и инициацию стресса [Kaneko M., et al., 2003; Zhang K., Kaufman R.J., 2008], что в конечном итоге приводит к увеличению адаптивного потенциала клеток.

Одним из важнейших механизмов увеличения толерантности головного мозга к ишемии является торможение апоптоза через зависимый и независимый от каспаз пути [Obrenovitch T.P., 2008; Zhang, Y. et al., 2019; Uzdensky A.V., 2019]. Этот защитный механизм в период реперфузии предотвращает гибель частично поврежденных нейронов. Показано, что в головном мозге, прекондиционированном гипоксическим воздействием, происходит снижение апоптотических клеток [Cantagrel S. et al., 2003], изменяется нейрональное соотношение Bax / Bcl-2-Bcl-xL в пользу антиапоптотических белков [Rybnikova E. et al., 2006], а шаперон HSP70 ингибирует апоптоз через транскрипционный фактор NF- κB [Frémont M. et al., 2006]. Кроме того, имеются данные о механизме ингибирования апоптоза при воздействии пермиссивной гиперкапнии на стадии реперфузии, следующей за транзиторной ишемией головного мозга [Zao Q. et al. 2010; Tao T. et al. 2013], что проявляется в виде снижения активности каспазы-3, содержания в цитозоле цитохрома C, проапоптотического медиатора bcl-2-ассоциированного X-белка (Bax) и увеличения концентрации в митохондриях антиапоптотического фактора В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2).

Известно, что механизм увеличения толерантности органов и тканей к гипоксии в значительной степени базируется на эффектах HIF-1 α [Murphy B.J., 2004]. Концентрация и стабильность HIF-1 α , его локализация в клетке, а также активность транскрипции прямо зависят от клеточного уровня кислорода [Semenza G.L., 1999]. При недостатке кислорода в клетках происходит накопление этого транскрипционного фактора с последующим увеличением экспрессии генов, усиливающих синтез эритропоэтина [Marti H.H. et al., 2000; Sugawa M. et al., 2002], фактора роста эндотелия сосудов VEGF [Siafakas N.M. et al., 2001] и нейропротекторных белков [Kleindienst A. et al., 2004; Lin H.J. et al., 2011]. Поэтому, оценка роли HIF-1 α в реализации проекторного действия гипоксии при ее сочетании с гиперкапнией представляет особый интерес.

Аденозиновые рецепторы (главным образом, A1-субтипа) долгое время являются мишенью для разработки нейропротекторных средств [Corpi E. et al. 2020; Martí Navia A. et al., 2020]. При воздействии интермиттирующей гипоксии аденозин и A1 рецепторы участвуют в формировании толерантности головного мозга к ишемии [Kulinski V.I. et al. 2006; Минакина Л.Н. и соавт., 2018], а под действием аденозина происходит активация митоK⁺_{АТФ}-каналов [Deryagin O.G. et al., 2017; Szeto V. et al., 2018] и снижение передачи синаптического возбуждения [Pillie et al. 2006]. При этом углекислота может вызывать индукцию Ca²⁺-активируемых и АТФ-зависимых мембранных калиевых каналов [Smith C.O. et al., 2017].

Нарушение целостности ГЭБ с последующим вазогенным отеком является ранним и важным признаком ишемического повреждения мозга, и выступает в роли предвестника неблагоприятного исхода [Latour L.L., et al., 2004; Кувачева Н.В., и соавт., 2016]. Вместе с этим сохранение целостности ГЭБ является важным нейропротекторным звеном в механизме формирования толерантности головного мозга к ишемии [Masada T., et al., 2001; Zhang F.Y., et al., 2006; Obrenovitch T.P., 2008]. Известно, что гипоксическое прекондиционирование способствует защите ГЭБ при церебральной ишемии посредством регуляции функционального белка сфингозинкиназы-2 и модуляции белков плотных контактов в условиях гипоксии *in vitro* [Wacker B.K., et al., 2012]. Также, имеются данные о положительном влиянии пермиссивной гиперкапнии на целостность ГЭБ при травматическом повреждении головного мозга [Yang W., et al., 2019].

Поэтому, при изучении механизма формирования толерантности к ишемии после сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии, высокий интерес представляет оценка роли сигнальных путей, которые вызывают повышение синтетической активности нервной ткани, стимулируют молекулы GRP-78 и NF-κB, ингибируют апоптоз, активируют HIF-1, A1 рецепторы, митоK⁺_{АТФ}-каналы и сохраняют избирательную проницаемость ГЭБ.

Для создания в организме человека дозируемой гиперкапнической гипоксии был разработан медицинский прибор «Карбоник» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05033), но его применение в клинических условиях затруднено из-за ряда проблем: необходимость проведения длительного терапевтического курса для достижения клинически стойкого эффекта (2-3 недели). В связи с этим, актуален поиск патогенетически обоснованного способа потенцирования эффектов гиперкапнически-гипоксических тренировок. К таким способам можно отнести комбинирование респираторных тренировок с фармакологическими средствами, модулирующими нейропротекторные сигнальные пути, и оптимизацию курсового интермиттирующего воздействия за счет сочетания оптимальных тренировочных параметров с оценкой реактивности на гиперкапнически-гипоксические воздействия.

В качестве фармакологических средств для потенцирования нейропротекторных эффектов при комбинировании с гиперкапнически-гипоксическими воздействиями перспективными представляются следующие варианты: блокатор карбоангидразы (ацетазоламида), который может повысить

уровень гиперкапнии в организме и имеет самостоятельные нейропротекторные свойства [Bejaoui M., et al., 2015; Dettori I et al., 2021]; активатор аденозиновых рецепторов (Аденозин трифосфата динатриевая соль), оказывающий терапевтический эффект при экспериментальной ишемии гиппокампа и запускающий сходные с гипоксическим прекодиционированием механизмы [Seydyousefi M. et al., 2019]; органопротекторный антагонист опиоидных рецепторов (даларгин), который предотвращает эндотелиальную дисфункцию [Govindaswami, M. et al., 2008; Гребенчиков О.А. и соавт. 2018]; блокатор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) (эналаприл), обладающий антиоксидантными свойствами [Гацура С.В. и Зинчук В.В., 2004].

Одним из вариантов клинического применения гипоксических тренировок является использование в комплексной реабилитации пациентов с детским церебральным параличом (ДЦП). Так, Yatsenko K.V. et al. (2012) показали, что у детей с ДЦП курсовое воздействие нормобарической гипоксии улучшает двигательную активность, нормализует церебральную гемодинамику и оказывает положительное влияние на нейрофизиологическую картину. Первые варианты применения сочетанных воздействий гиперкапнии и гипоксии при помощи специальных масок (или пакета) относятся к Глену Доману [Doman G. et al., 1960]. Однако, такой метод подвергается серьезной критике из-за выраженного психотравмирующего эффекта на ребенка и не позволяет контролировать и дозировать воздействие [Ziring P.R. et al. 1999]. При этом многие ограничения метода Домани могут быть устранены при использовании современных технических средств для создания дозированной гиперкапнической гипоксии с контролем концентрации альвеолярных газов и оценки индивидуальной реактивности на тренировочное воздействие [Kuznetsova D.V., Kulikov V.P., 2014].

Цель исследования. Изучить влияние тренировочного сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и гипоксии на молекулярно-клеточные сигнальные пути механизма формирования толерантности головного мозга к ишемии; установить перспективные для применения в клинической практике методы гиперкапнически-гипоксических тренировок.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние тренировочного сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии на содержание шаперона GRP-78, транскрипционного фактора NF-κB и синтетическую активность в нервных клетках околоинсультной области головного мозга крыс;
2. Оценить выраженность апоптоза и содержание клеток с медиаторами апоптоза (каспаза-3, АИФ, Вах, Bcl-2) в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов и нейронов после тренировочного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии; Определить влияние тренировочного сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии на показатели клеточного индекса в сокультурах астроцитов и нейронов *in vitro*.
3. Определить влияние гиперкапнического компонента на содержание фактора HIF-1α в ткани гиппокампа, относительное содержание клеток с HIF-1α

в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов после тренировочного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии;

4. Оценить относительное содержание клеток с A1 рецепторами и митоK⁺_{АТФ}-каналами в околоинсультной области головного мозга крыс и астроцитарных культурах после тренировочного сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии;

5. Сравнить изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера после сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии;

6. Установить оптимальные тренировочные параметры для сеансов гиперкапнически-гипоксических воздействий, повышающих резистентность к острой гипоксии, и определить нейропротекторный потенциал активаторов аденозиновых рецепторов, опиодных рецепторов, АТФ-зависимых калиевых каналов, ингибитора карбоангидразы и ингибитора АПФ при комбинации с гиперкапнической гипоксией;

7. Оценить влияние гиперкапнически-гипоксических тренировок на интегративные показатели биологического и репродуктивного возраста мышей в эксперименте;

8. Оценить влияние гиперкапнически-гипоксических тренировок на функциональные показатели состояния нервной системы у пациентов с детским церебральным параличом;

Научная новизна. Впервые показан факт увеличения содержания шаперона GRP-78, транскрипционного фактора NF-κB и синтетической активности в нервных клетках околоинсультной области головного мозга крыс и темпа прироста клеточного индекса у клеток астроцитов и нейронов *in vitro* после тренировочного воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

Доказано, что гиперкапнический компонент при сочетании с гипоксией является доминирующим фактором в нейропротекторном механизме ограничительного торможения апоптоза при постгипоксических условиях *in vitro* и в околоинсультной области головного мозга крыс, но не оказывает прямого влияния на содержание HIF-1α в тканях гиппокампа, относительное содержание клеток с HIF-1α в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии.

Установлено, что гиперкапния, в отличие от гипоксии, не увеличивает относительное содержание клеток с A1 рецепторами в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов *in vitro*. Вместе с тем, гиперкапния, независимо от гипоксии, вызывает увеличение процента клеток, содержащих митоK⁺_{АТФ}-каналы, в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов *in vitro*, что является важной составляющей механизма нейропротекторной эффективности гиперкапнической гипоксии.

Доказано, что сочетанное воздействие нормобарической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии вызывает наименьшее изменение уровня проницаемости ГЭБ у крыс, по сравнению с изолированными воздействиями этих факторов, что можно рассматривать в качестве нейропротекторного механизма гиперкапнически-гипоксических тренировок.

Получены новые данные о сравнительной эффективности различных тренировочных режимов гиперкапнически-гипоксических воздействий при разной продолжительности и кратности сеансов воздействия в эксперименте на крысах. Также впервые экспериментально доказано, что сочетание гиперкапнически-гипоксических тренировок с ингибитором АПФ (эналаприлом) приводит к повышению их суммарного нейропротекторного эффекта, что открывает перспективы создания новых эффективных фармакотерапевтических технологий нейропротекции и нейрореабилитации.

Установлено, что регулярное применение периодических гиперкапнически-гипоксических тренировок улучшает интегративные показатели длительности и качества жизни у мышей, что является важным теоретическим обоснованием для использования этих воздействий в качестве важной составляющей здорового образа жизни и физической культуры.

Теоретическая значимость. Получены новые сведения о влиянии гиперкапнии и/или гипоксии на саногенез ишемического/гипоксического повреждения нервной ткани расширяют теоретические представления о природе нейропротекторного эффекта феномена прекондиционирования.

Данные о молекулярно-клеточных механизмах формирования толерантности к ишемии после тренировочного воздействия гиперкапнической гипоксии открывают возможности для направленного изучения нейропротекторного потенциала различных комбинаций лекарственных средств и респираторных тренировок с целью разработки терапевтических методик с повышенным нейропротекторным потенциалом.

Результаты, показавшие роль гиперкапнического компонента в нейропротекторных сигнальных путях при ее сочетании с гипоксией, вносят существенный вклад в теоретическую основу для расшифровки механизмов адаптации органов и тканей к ишемии и другим стрессогенным факторам.

Практическая значимость. Установленные параметры воздействия гиперкапнической гипоксии при курсовом применении (30 минут однократно в день, от 3 до 14 сеансов) рекомендованы в качестве оптимального режима для достижения нейропротекторного эффекта у крыс. Комплексное применение гиперкапнически-гипоксических воздействий с ингибитором АПФ может быть рекомендовано для разработки профилактических и терапевтических протоколов дыхательных тренировок для лечения и профилактики неврологических заболеваний.

Результаты о влиянии гиперкапнически-гипоксических тренировок на продолжительность жизни и физиологическое старение предложены к использованию в разработке стратегий достижения активного долголетия.

Данные о клинической эффективности гиперкапнически-гипоксических воздействий на медицинском приборе «Карбоник» стали основой для подготовки методических рекомендаций по использованию в терапевтических протоколах у пациентов с детским церебральным параличом.

Методика тестирования индивидуальной реактивности организма пациентов с детским церебральным параличом и их распределение в группы с различной стратегией адаптации к гиперкапнической гипоксии рекомендована

для подбора протокола дыхательных тренировок на основании объективных данных газообмена и поведенческих реакций с целью достижения максимальной терапевтической эффективности. Также, результаты оценки реактивности пациентов на гиперкапническую гипоксию при ее курсовом воздействии послужили основанием для разработки винтообразной дыхательной трубки (Патент на полезную модель №118558).

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования послужили современные информативные методы качественного и количественного измерения клеточных, биохимических и нейрофизиологических показателей *in vivo* и *in vitro*. Были использованы теоретико-эмпирические общенаучные методы: анализа и синтеза, индукции и дедукции, моделирования, научной абстракции, клинического наблюдения, а также метод статистической обработки. Из методов естественнонаучных исследований применялись наблюдение, измерение, эксперимент и сравнение. Применялись клеточные культуральные модели *in vitro*, модели на животных *in vivo*, а также проводилось рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование на пациентах в условиях стационарного наблюдения. Были использованы специальные методы цитологической и гистологической обработки нервной ткани и клеток, их окраски и морфометрии, а также специфические лабораторные протеометрические методы (Вестерн блот анализ). В клинической части были использованы нейрофизиологические (ЭЭГ с магнитной стимуляцией пирамидного тракта, вызванные потенциалы P300) и оценка статуса по неврологическим шкалам.

Положения, выносимые на защиту:

1. Механизм нейропротекции при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии опосредован повышением клеточной синтетической активности, увеличением содержания GRP-78 и NF-κB, ингибированием апоптоза, повышением содержания клеток с HIF-1α, A1 рецепторами и митоK⁺_{АТФ}-каналами в области ишемического/гипоксического повреждения и снижением проницаемости ГЭБ.
2. При сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии избыток CO₂ оказывает преимущественное влияние на сигнальные пути механизма повышения толерантности к ишемии/гипоксии, основанные на эффектах увеличения содержания фактора NF-κB, повышении клеточной синтетической активности и снижении проницаемости ГЭБ, а дефицит кислорода – через протекторные эффекты увеличения содержания клеток с фактором HIF-1α и A1 рецепторами. При этом и гиперкапнический и гипоксический компонент в равной мере влияют на увеличение содержания шаперона GRP-78, клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами, процесс ингибирования апоптоза и прирост клеточного индекса.
3. Ежедневные гиперкапнически-гипоксические воздействия увеличивают у крыс резистентность к острой гипоксии пропорционально количеству и длительности сеансов. Увеличение кратности тренировочных сеансов в течение суток не влияет на их эффективность, комбинация с ингибитором АПФ

(эналаприлом) повышает ее, а наличие периодов реоксигенации снижает этот показатель.

4. Применение гиперкапнически-гипоксических тренировок увеличивает среднюю продолжительность жизни у мышей, повышает их физическую выносливость, стрессоустойчивость, исследовательскую активность, улучшает репродуктивный потенциал и когнитивные функции в старости.

5. Применение дыхательных тренировок с гиперкапнической гипоксией в комплексе со стандартной терапией у детей с ДЦП оказывает позитивное влияние на функциональные показатели состояния нервной системы.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования», учебный процесс кафедры биохимии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО КрасГМУ, научный процесс НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ, научный процесс лаборатории нейробиологии и тканевой инженерии ФГБНУ «Научного центра неврологии», в лечебный процесс КГБУЗ «Краевого психоневрологического детского санатория», в диагностический процесс нейрофизиологической лаборатории КГБУЗ «Алтайский краевой клинический центр охраны материнства и детства», изданы методические рекомендации: «Лечебно-диагностический комплекс «Карбоник» в комплексном лечении детского церебрального паралича».

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном и клиническом материале (626 экспериментальных животных, моделирование ишемического повреждения головного мозга *in vivo* и гипоксического воздействия *in vitro*, 42 обследованных пациента) с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения работы были представлены на IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (г. Барнаул, 2014 г.); на XVI научно-практической конференции «Молодежь - Барнаулу» (г. Барнаул, 2014); на XXI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2015); на VII всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (г. Новосибирск, 2015); на V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (г. Барнаул, 2015); на II Всероссийском форуме молодых ученых «U-NOVUS» (г. Томск, 2015); на I Всероссийской конференции с международным участием «Новые направления в нейробиологии и нейровизуализации» (г. Новосибирск, 2015); на IV итоговой научной конференции НОМУС АГМУ (г. Барнаул, 2016); на XI научно-практической

конференции «Актуальные вопросы медицинской реабилитации: инновационные технологии, клиническое питание, традиционные аспекты» (г. Новосибирск, 2016); на конференции молодых ученых «Неделя науки в АГМУ» (г. Барнаул, 2017); на международной научной конференции – школа молодых ученых «Заболевания мозга: Вызов XXI века» (г. Казань, 2018); на международном российско-немецком семинаре в КрасГМУ (г. Красноярск, 2018); на VI Европейском Конгрессе по превентивной, регенеративной и антивозрастной медицине ESCOPRAM-2019 (г. Геленджик, 2019); на V Сибирском международном форуме по медицинскому и оздоровительному туризму «За здоровьем на Алтай» (г. Белокуриха, 2019); на международном форуме «Биотехнологии: наука, образование, индустрия» (г. Барнаул, 2021); на онлайн-вебинаре «Гиперкапническая гипоксия в лечении детского церебрального паралича» (г. Барнаул, 2021).

Отдельные фрагменты работы выполнены при поддержке грантов Российского Научного Фонда (проект №18-75-00016), Российского фонда фундаментальных исследований (проект №15-44-04169_Региональный_Сибирь), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект № 2079ГУ1/2014), Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов (Приказ Минобрнауки России №184 от 10.03.2015.) и для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (проект № НШ-9663.2016.7).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 36 научных работ: в том числе 13 статей – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и 4 статьи – в зарубежных научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 274 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 9 разделов с результатами собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 59 рисунками и содержит 13 таблиц. Библиографический указатель включает 457 источников (48 – на русском и 409 – на английском языках).

Личный вклад автора. Исследования были выполнены с использованием ресурсной базы ЦКП МКТ КрасГМУ. Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены самостоятельно. Диссертантом выполнено лично: определение цели, разработка конкретных задач работы и плана их выполнения; составление протоколов лабораторного и клинического исследований; анализ клинического материала – динамическое клиническое обследование пациентов (в том числе, совместно с Д.В. Паршиным, врачом-неврологом Алтайского краевого психоневрологического детского санатория и д.м.н. Ю.В. Смирновой, зав. нейрофизиологической лаборатории Алтайского краевого клинического центра охраны материнства и детства); тестирование животных; проведение иммуногистохимических/иммуноцитохимических

исследований (в том числе, совместно с д.м.н. Н.А. Малиновской); выполнение вестерн-блоттинга; выполнение работ на моделях астроцитов и нейронов *in vitro* (в том числе, совместно с д.м.н. А.В. Моргуном, к.м.н. Е.Д. Хилажевой); статистическая обработка материала исследований и интерпретация результатов; написание публикаций, автореферата и текста диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность и проработанность темы диссертационного исследования, определены цель и задачи исследования, описана научная новизна и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационной работы, который сосредоточен на сигнальных механизмах и связанных с ними функциональных изменениях, влияющих на толерантность головного мозга к ишемии. Также обзор литературы содержит разделы с описанием возможных методов для разработки нейропротекторных стратегий.

Во второй главе диссертации описаны материал и методы исследования. Глава иллюстрирована схемами и рисунками. В исследовании использовались 590 крыс-самцов линии Wistar и 36 мышей линии BALB/c, полученных из Института Цитологии и Генетики СО РАМН (Новосибирск, Россия). Клиническая часть проведена на 42 пациентах со спастической формой ДЦП.

Дизайн исследования и группы. Диссертационное исследование состоит из семи экспериментальных (Таблица 1) и одного клинического блока:

Блок I-A: Оценка синтетической активности в околоинсультной области головного мозга крыс и клеточного индекса астроцитов и нейронов *in vitro* после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии.

Блок I-B: Оценка содержания GRP-78 и NF-κB в околоинсультной области головного мозга крыс после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии.

Блок II: Оценка влияния гиперкапнии и гипоксии на апоптоз в околоинсультной области головного мозга крыс и у культур астроцитов и нейронов.

Блок III-A: Оценка содержания транскрипционного фактора NIF-1α после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии в тканях гиппокампа и клеток с NIF-1α в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов;

Блок III-B: Оценка содержания клеток с A1 рецепторами и митоK⁺_{ATP}-каналами после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов;

Блок IV: Оценка влияния гиперкапнии и гипоксии на проницаемость ГЭБ;

Блок V: Определение оптимальных параметров гиперкапнически-гипоксического воздействия у крыс;

Блок VI: Определение возможности потенцирования эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими средствами;

Блок VII: Оценка влияния гиперкапнической гипоксии на продолжительность жизни и физиологическое старение мышей;

Таблица 1 – Обзорная схема формирования экспериментальных блоков и хронологии экспериментальных процедур

		Блок I-A		Блок II			Блок III-A				Блок IV	Блок V			Блок VI	Блок VII	
			Блок I-B				Блок III-B										
Серии эксперимента		№2	№1	№1	№	№2	№4	№5	№1	№2	№3	№1	№1	№2	№3	№1	№1
Кратность сеансов		15	15	15	1-3	1-3	7	7	15	1	15	15	3	1, 2, 3	3	5	21
Использованные модели		<i>in vivo</i> → <i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i> → <i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>
Группы (<i>n</i> случаев)	Кон	5	15	10	-	-	10	10	5	-	10	10		15	15	40	18
	НБГ	5	15	10	-	-	10	10	5	-	10	10					
	ПермГ	5	15	10	-	-	10	10	5		10	10					
	ГиперГ	5	15	10	-	-	10	10	5	-	10	10	60	30	30	100	18
Выполненные процедуры	Фокальная ишемия		+	+							+						
	Хим. гипоксия	+			+	+			+	+							
	ИГХ/ИЦХ		GRP-78, NF-κB, AgNORs	Каспаза-3, АИФ, Вах, Bcl-2					HIF-1α, Adora1, Kir6.2								
	Оценка апоптоза			+		+											
	Вестерн-блоттинг						HIF-1α										
	Мониторинг КИ	+															
	pH и газы крови							+									
	Проницаемость ГЭБ												+				
	ОГбГ													+	+	+	
	Транзиторная ишемия																+
Поведенческое тестирование																	+

Примечание: Кон – контроль; НБГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; ФИТ – фотоиндуцированный тромбоз; КИ – клеточный индекс; ОГбГ – острая гипобарическая гипоксия;

В клиническом блоке пациенты с ДЦП в возрасте от 3 до 7 лет рандомно распределялись в группу плацебо ($n=20$), где происходила имитация респираторных тренировок атмосферным воздухом или в группу вмешательства ($n=22$), в которой проводились респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией курсом из 14 – 16 сеансов. До и после курса воздействий выполнялась неврологическая оценка, нейрофизиологическое исследование и тестирование реактивности на гиперкапническую гипоксию.

В ходе эксперимента были предприняты все необходимые усилия для сведения к минимуму страданий животных и сокращения их числа согласно принципу 3 «R». Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов, изложенных в Директиве Европейского Парламента и Совета Европейского союза (20ф10/63/ЕС) и с разрешения биоэтической комиссии Локального этического комитета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, а клиническая часть исследования была одобрена локальным этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета.

Модель респираторных воздействий *in vivo*. Для проведения респираторных воздействий использовалась проточная камера, куда компрессором подавалась газовая смесь. Контроль газового состава в камере производился газоанализатором «Microlux O₂+CO₂» (ООО «Микролюкс», Россия). Во всех экспериментальных сериях нормобарическая гипоксия поддерживалась при параметрах P_{O₂} ≈ 90 мм рт.ст. и P_{CO₂} ≈ 1 мм рт.ст., пермиссивная гиперкапния при P_{O₂} ≈ 150 мм рт.ст.; P_{CO₂} ≈ 50 мм рт.ст., гиперкапническая гипоксия при P_{O₂} ≈ 90 мм рт.ст. и P_{CO₂} ≈ 50 мм рт.ст., остальное – N₂.

Моделирование гипоксии, гиперкапнии и их сочетания *in vitro* у культур астроцитов и нейронов, выделенных из прогениторных клеток, проводилось в специальной камере НурохуLab (Oxford Optronix Ltd, Великобритания), которая автоматически поддерживала условия гипоксии (P_{O₂} ≈ 35 мм рт.ст.) и/или гиперкапнии (P_{CO₂} ≈ 50 мм рт.ст.), температуру 37°C и влажность на уровне 80% в течение заданного времени, либо интервалами с нормоксией.

Модель фокальной ишемии головного мозга. Под наркозом (в/б введение 3% р-ра хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг), в левую бедренную вену производилась инъекция 4% р-ра бенгальского розового (Sigma Aldrich, Германия) в 0,9% р-ре NaCl, в дозировке 40 мг/кг. Далее выполнялось 10-минутное освещение 2 мм участка правой теменной кости лазером (532 нм, 20 мВт) [Barth A.M., Mody I., 2011].

Получение культур нейронов и астроцитов. Гиппокамп отделялся от головного мозга, полученного от интактных крыс (самцы линии Wistar, возрастом 5-6 месяцев). Выделенные из головного мозга нейрогенные стволовые клетки, плотностью 6-12 млн жизнеспособных клеток/мл, засеивали в культуральные флаконы T-25 в 10 мл культуральной среды NeuroCult Proliferation Kit (Mouse & Rat) (StemCell, Канада). В дальнейшем клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37°C, а после 24

часов инкубации наблюдали образование свободно плавающих нейросфер, которые использовались для дифференцирования. С этой целью в среду для культивирования добавлялись факторы из набора NeuroCult® NS-A Differentiation Kit (StemCell, Канада), а в качестве питательной среды использовалась NeuroCult® NS-A Differentiation Medium (StemCell, Канада). Через 7 суток проводили оценку чистоты полученных культур с использованием флюоресцентных маркеров для астроцитов (GFAP) и нейронов (NSE).

Модель химической гипоксии *in vitro* создавали путем инкубации сокультур клеток с йодацетатом натрия (50 мкМ конечная концентрация) в течении 30 минут при 37°C в стандартных условиях CO₂-инкубатора с последующей полной заменой культуральной среды.

Иммуногистохимические исследования в околоинсультной области головного мозга крыс. Перед декапитацией крысы подвергались транскардиальной перфузионной фиксации (струйное введение 500 мл PBS, а затем 250 мл 4% PBS-забуференного параформальдегида) с последующим извлечением головного мозга. Срезы толщиной 50 мкм, изготовленные с помощью вибротома (Thermo Scientific) окрашивали по методике для свободно плавающих срезов по стандартному протоколу двойного/тройного мечения методом иммуногистохимии. В качестве первичных антител использовали: Anti-Caspase-3 (Thermo Fisher, 43-7800), Anti-AIF (Thermo Fisher, MA5-32032), Anti-Bax (Thermo Fisher, MA5-14003), Anti-Bcl-2 (Thermo Fisher, PA5-36742), Anti-NIF-1 α (Thermo Fisher, SA5-10211), Anti-ADORA1 (Thermo Fisher, PA1-041A), Anti-Kir6.2 (Thermo Fisher, PA5-75331). Для контрастирования ядер добавлялся р-р DAPI. Подсчет количества иммунопозитивных клеток, экспрессирующих целевые антигены в околоинсультной области, производился не менее, чем в 5 полях зрения на конфокальном микроскопе FV10i-W (Olympus, Япония).

Иммуноцитохимические исследования *in vitro* выполнялись методом двойной непрямой иммунофлюоресценции. В качестве первичных и вторичных антител использовали аналогичные тем, что применялись для иммуногистохимического анализа. Микроскопия проводилась на системе ZOE (Bio-Rad, США) с подсчетом числа иммунопозитивных клеток, содержащих целевые антигены, не менее, чем в 5 полях зрения.

Оценка интенсивности апоптоза в околоинсультной области выполнялась при помощи набора ApopTag® ISOL Dual fluorescence apoptosis kit (Sigma-Aldrich, Кат. №APT1000, Германия), предназначенного для детектирования олигонуклеотидов в апоптотических двухцепочечных разрывах ДНК.

Оценка интенсивности апоптоза и некроза *in vitro* проводилась с использованием набора Apoptosis/Necrosis Detection Kit (blue, green, red) (Abcam, Кат. №ab176749, Великобритания), согласно инструкциям производителя.

Вестерн блот анализ. Экстракт нуклеарных белков из тканей гиппокампа готовился при помощи набора Mammalian Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit (SERVA, Германия). Электрофорез белков проводился в готовом 8% акриламидном геле TG PRiME (SERVA, Германия) в камере miniVE

Amersham Biosciences (GE Healthcare, США) в течение 90 минут при 20 мА и 230 В, а полусухой блоттинг на системе TE77 Amersham (GE Healthcare, США) при 65 мА в течение 60 мин. В качестве первичных антител использовались Anti-HIF-1 α (Thermo Fisher, SA5-10211) и Anti- β -actine (Thermo Fisher, Кат. № MA5-15739, Германия). Хемиллюминисцентная детекция проводилась при помощи набора SERVALight Eos (SERVA, Германия) и гель-документирующей системы Amersham Imager 600 UV (GE Healthcare, США).

Оценка синтетической активности в околоинсульной области головного мозга крыс. Парафинированный головной мозг секционировался (срезы по 10 мкм) и проводилось окрашивание методом импрегнации серебром для выявления белков, афинных к Ag в области ядрышковой активности с использованием набора AgNORs (BioOptica, Италия).

Мониторинг клеточного индекса *in vitro* Регистрацию и изучение особенностей клеточной активности у сокультур астроцитов и нейронов проводили с использованием системы «xCelligence», предназначенной для анализа активности клеток в режиме реального времени (Roche, Швейцария). Показатели КИ при анализе рассчитывались как средние значения динамики в виде базисного темпа прироста относительно начала выбранного временного периода по формуле: $Y(i)/Y(0) \times 100$, где $Y(i)$ — значение КИ в момент измерения, а $Y(0)$ — в начале периода.

Иммуногистохимическая оценка содержания GRP-78 и NF- κ B в околоинсульной области головного мозга крыс проводилась на парафинированных срезах толщиной 10 мкм непрямым двухшаговым стрептавидин-биотиновым методом с контролем специфичности реакции. В качестве первичных антител использовали Anti-NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, sc-101744, США) и Anti-GRP-78 (Santa Cruz Biotechnology, sc-1050, США). Анализ содержания иммунопозитивных клеток проводили на микроскопе SX51 (Olimpus, Япония) с помощью программы ImageJ 1,41 (Scion Inc., США).

Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера проводилась путем фотометрического измерения содержания красителя Эванса голубого в плазме крови и флуоресцентной микроскопии ткани головного мозга через 24 часа после внутрибрюшинного введения его 2-% р-ра [Manaenko A. et al., 2011] на конфокальном микроскопе FV10i-W (Olympus, Япония) при 650 нм. Определялась флуоресцентная интегративная оптическая плотность красителя с последующим расчетом индекса проницаемости по концентрации красителя в крови [Xu Y., et al., 2019]. Определение содержания красителя в крови выполняли при 610 нм на планшетном фотометре Multiscan FS (Thermo Scientific, США).

Резистентность крыс к острой гипобарической гипоксии определяли в барокамере с объемом 7 л [Лукьянова Л.Д. и соавт., 2011]. Воздух из барокамеры откачивался вакуумным насосом в течение 1 минуты. Уровень атмосферного давления соответствовал высоте 11500 м над уровнем моря (180 мм рт. ст.). Регистрировались параметры: время потери позы и время жизни.

Моделирование транзиторной ишемии головного мозга выполнялась методом билатеральной окклюзии общих сонных артерий на 20 минут [Sharifi Z.N. et al., 2012]. Спустя 72 часа после ишемии, животные декапитировались с последующей морфологической оценкой выживаемости нейронов в CA1 регионе гиппокампа на световом микроскопе Микмед 6, вар.7 (ЛОМО, Россия) [Zhan L. et al., 2010].

Поведенческое тестирование и оценка мышечной силы у мышей выполнялись на установках «Открытое поле» [Hall C.S., 1936], «Темно-светлая камера» [Bourin M. et al., 2003], «Натянутая струна» [Jackson H.F. et al., 1982].

Методика гиперкапнически-гипоксических тренировок у пациентов с ДЦП выполнялась на лечебно-диагностическом комплексе «Карбоник» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05033) согласно методике производителя. Конструкция плацебо-приборов отличалась наличием в дыхательной трубке специального клапана, который исключал дыхание через ячеистую кассету, сепарирующую выдыхаемый воздух.

Оценка неврологического статуса в ходе исследования включала оценку мышечного тонуса и оценку двигательных навыков по шкалам GMFM-66 [Russell D.J. et al., 2010], GMFCS [Palisano R.J. et al., 2008], CFCS [Hidecker M.J. et al., 2011] и MACS [Eliasson A. et al., 2007].

Нейрофизиологическое обследование включало регистрацию ЭЭГ, магнитную стимуляцию пирамидного тракта с определением порога возбудимости корковых мотонейронов [Куликов и соавт., 2004], когнитивные (эндогенные) вызванные потенциалы P300. Все исследования были проведены на аппаратах фирмы Nicolet Biomedical Inc. (США). Для регистрации когнитивных вызванных потенциалов (методика P300) применялась слуховая стимуляция. Для магнитной стимуляции использовали электромиограф, синхронизированный с магнитным стимулятором.

Математико-статистическая обработка результатов. Статистический анализ выполнялся на программе SPSS 11.5 (SPSS Inc, США). Гипотеза о нормальности распределения проверялась по критерию Шапиро-Уилка. При наличии нормального распределения в выборках сравнения проводили с использованием t-критерия Стьюдента, а при отсутствии – с использованием критерия Манна-Уитни, Вилкоксона или Краскела-Уоллиса. Анализ выживаемости проводился методом Каплан-Майера с применением F-теста Кокса. Количественные данные при соблюдении закона нормального распределения представлены в виде среднего (M) \pm среднеквадратичное отклонение (σ); при отсутствии нормального распределения - в виде медианы (Me), 25 и 75 перцентилей (P25 и P75). Достоверными считались различия, для которых вероятность ошибки (p) была меньше 0,05.

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию результатов экспериментальной части исследования. Результаты представлены по блокам. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов трансляционной части исследования. Результаты представлены по блокам. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

Пятая глава диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе. Глава иллюстрирована схемами и рисунками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Блок I. Влияние гиперкапнии и/или гипоксии на синтетическую активность, содержание GRP-78 и NF-κB в околоинсультной области головного мозга крыс и клеточный индекс у сокультур астроцитов и нейронов. В околоинсультной области коры головного мозга на парафиновых срезах наблюдалось различное количество областей ядрышкового организатора в нервных клетках. Количество ядрышковых организаторов в нервных клетках околоинсультной области головного мозга крыс после воздействия нормобарической гипоксии не различалось с контролем. При этом у групп воздействия пермиссивной гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии отмечалось увеличение этого параметра по отношению к контролю ($p < 0,001$), что свидетельствует о повышении синтетической активности у крыс под воздействием повышенного уровня CO_2 .

Респираторное воздействие гипоксии и/или гиперкапнии, моделируемое у крыс *in vivo*, проявлялось различными тенденциями в динамике клеточного индекса *in vitro*. Для объективного сравнения показателей КИ все динамические ряды были разделены на несколько хронологических периодов в зависимости от наличия в них стабильных тенденций: первые 4 часа измерения; 4-10 ч; 10-22 ч; 24-36 ч; 36-48 ч и 48-72 ч. В интервале между 22 и 24 часами наблюдения моделировалась химическая гипоксия, а измерения КИ не проводились.

В период с 4-го по 10-й час эксперимента клетки всех групп, подвергавшихся респираторным воздействиям, показали более высокие показатели темпа прироста клеточного индекса по сравнению с контролем. При этом клетки, подвергнутые *in vivo* сочетанному воздействию гипоксии и гиперкапнии, имели наибольший показатель прироста КИ, а клетки группы НБГ имели более высокие показатели, чем клетки группы ПермГ. С 10-го по 22-й час эксперимента во всех группах респираторных воздействий сохранялись высокие показатели динамики КИ, но его прирост существенно увеличился в группах НБГ и ПермГ. В интервале 24-36 ч после частичной смены среды в планшете наибольший прирост КИ наблюдался в группах контроля и НБГ (Рис. 1А), а в течение следующих 36 часов прирост КИ в группе НБГ превышал таковой в других группах ($p < 0,001$). При этом клетки из групп ПермГ и ГиперГ на протяжении 2-х суток эксперимента демонстрировали отрицательную динамику КИ. Однако 3-и сутки наблюдения показали стагнацию прироста КИ в контрольной группе и выраженное повышение темпа прироста индекса у клеток из группы ПермГ.

Кроме того, для отдельных групп образцов через 24 часа после начала эксперимента моделировалась химическая гипоксия и проводился параллельный мониторинг показателя КИ (Рис. 1В). В течение периода 24 -36 часов клетки группы НБГ сохраняли положительный темп прироста КИ ($p < 0,01$), в отличие от контрольной группы, показывающей резкое снижение темпа прироста КИ. При этом клетки из групп ПермГ и ГиперГ на протяжении

периода 24 – 48 ч наблюдения демонстрировали отрицательную динамику показателя КИ. Только с 48 до 72 часов эксперимента клетки из группы ПермГ показали активный прирост индекса КИ до значений, сходных с НБГ.

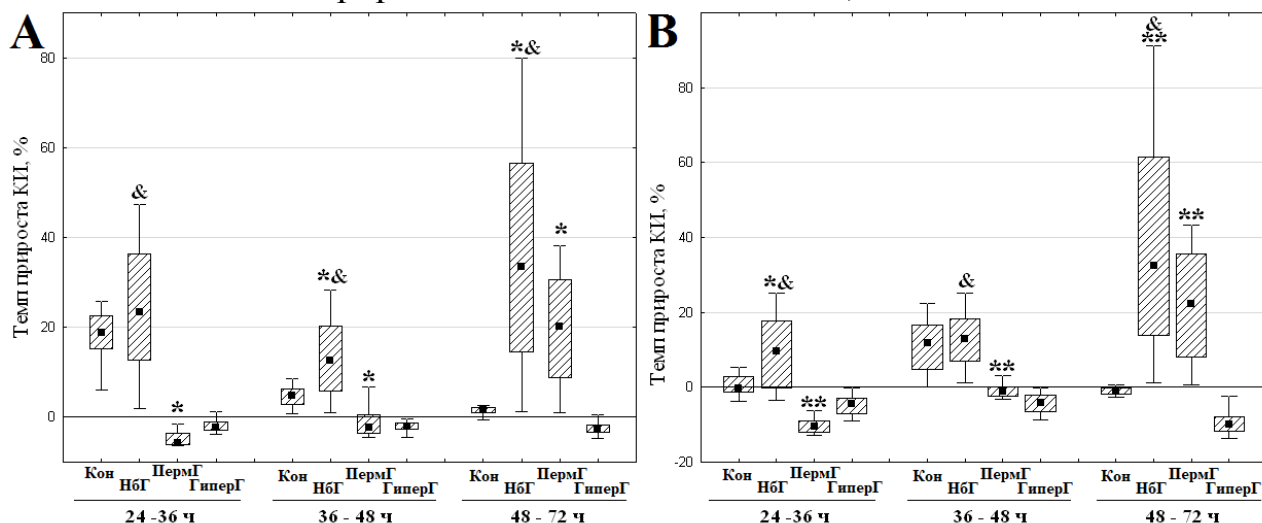


Рисунок 1 – Динамика клеточного индекса за 2-е и 3-и сутки эксперимента в образцах клеток без моделирования химической гипоксии (А) и после моделирования химической гипоксии (В).

Примечание: КИ – клеточный индекс; Кон – контрольная группа; НБГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; * - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$); ** - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$); & - различия статистически значимы по сравнению с группой ПермГ ($p < 0,001$).

Оценка содержания шаперона GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB в околоинсультной области головного мозга крыс показала, что в телах нейронов крыс из контрольной группы и группы ГиперГ отчетливо наблюдались выраженные различия по содержанию этих антигенов. Уровень содержания белка GRP-78 в цитоплазме нейронов околоинсультной области был максимальным в группе ГиперГ, а в группе НБГ – наименьшим ($p < 0,001$). При этом содержание шаперона в нейронах крыс из группы ПермГ не отличалось от такового в контроле, но было выше, чем в группе НБГ ($p < 0,001$).

Содержание фактора NF-κB в цитоплазме нейронов околоинсультной области головного мозга было максимальным в группе ГиперГ ($p < 0,001$) (Рис. 2А). В группах НБГ и ПермГ содержание оказалась ниже, чем в контроле ($p < 0,001$), причем эти группы не различались между собой. Уровень содержания NF-κB в ядрах был также выше при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии ($p < 0,001$) (Рис. 2В). В группе ПермГ нуклеарное содержание было выше ($p < 0,001$), чем в контроле и группе НБГ, причем между собой группы НБГ и контроля не различались.

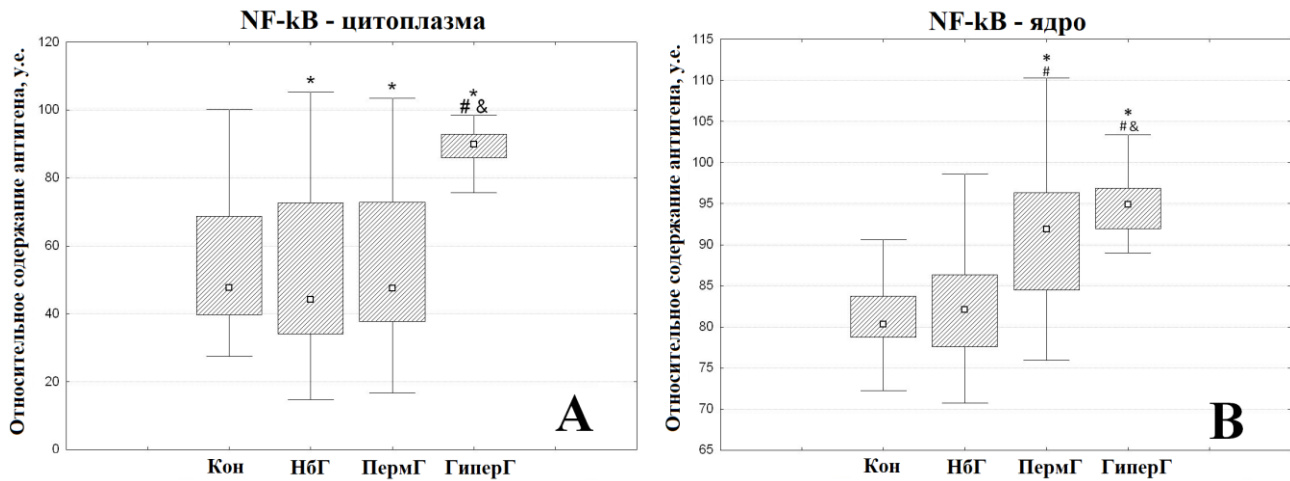


Рисунок 2 – Содержание транскрипционного фактора NF-κB в цитоплазме (А) и ядре (В) нейронов в околоинсультной области после изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии.

*Примечание: Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – перmissive гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; * - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,001$); # - различия статистически значимы по сравнению с группой НбГ ($p < 0,001$), & - различия статистически значимы по сравнению с группой ПермГ ($p < 0,001$).*

Блок II. Ингибирование апоптоза в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов и нейронов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии. После респираторных воздействий интермиттирующей гиперкапнии и/или гипоксии у крыс в околоинсультной области головного мозга возникает снижение уровня апоптоза, преимущественно связанное с влиянием гиперкапнического компонента. Об этом свидетельствует сниженный уровень апоптотических нервных клеток в группе ПермГ по сравнению с контрольной группой (в 5 раз, при $p < 0,05$), на фоне отсутствия существенных различий этого показателя с контрольными значениями у группы нормобарической гипоксии. При этом сочетанное воздействие гиперкапнии и гипоксии показывает более выраженный эффект ингибирования апоптоза: по сравнению с группой контроля в 20,8 раз, а с группами нормобарической гипоксии и перmissive гиперкапнии в 5,8 раз и в 4,3 раза, соответственно ($p < 0,05$).

Результаты иммуногистохимического исследования клеток, содержащих маркеры апоптоза, в околоинсультной области головного мозга крыс после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии показали, что все респираторные воздействия в разной степени уменьшают процент клеток, содержащих главный эффектор апоптоза – каспазу-3 (Рис. 3). При этом процент клеток, содержащих АИФ (ключевой эффектор каспазо-независимого (митохондриального) сигнального пути апоптоза) снижается после воздействия перmissive гиперкапнии и при ее сочетании с гипоксией (Рис. 4). Аналогичную тенденцию демонстрируют гиперкапнические воздействия и в отношении воздействия на клетки, содержащие Вах - индуктор каспазо-независимого пути апоптоза (Рис. 5). Вместе с тем, процент клеток в околоинсультной области, содержащих

противоапоптотический фактор Bcl-2, в равной мере, повышается после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии (Рис. 6).

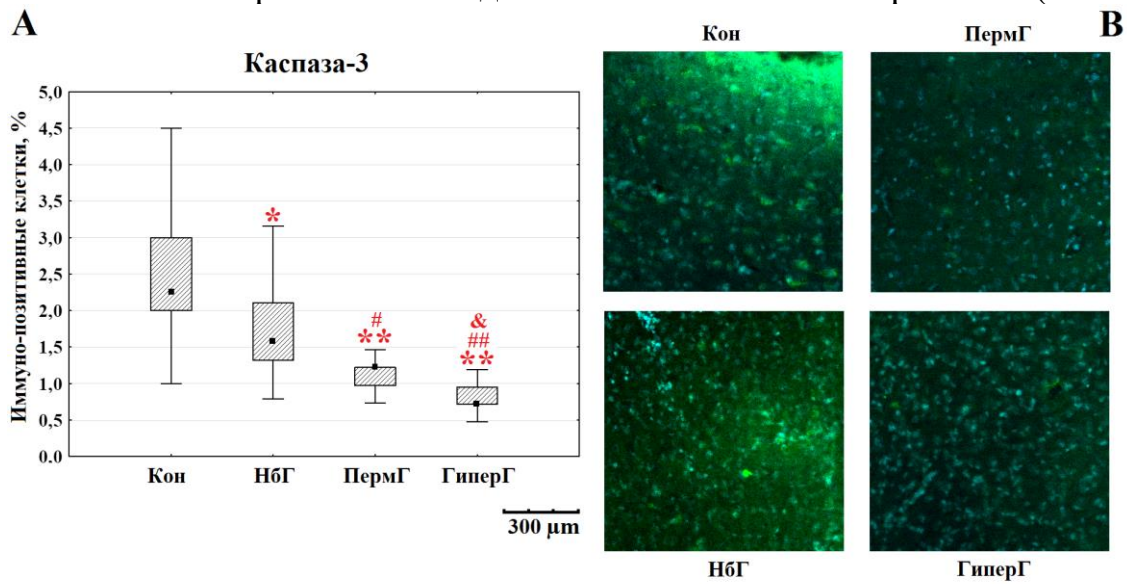


Рисунок 3 – Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих Каспазу-3 (А) и Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В).
Примечание: Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – перmissive гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; * – отличия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – отличия по сравнению с контролем ($p < 0,001$); # – отличия по сравнению с НбГ ($p < 0,01$); ## – отличия по сравнению с НбГ ($p < 0,001$); & – отличия по сравнению с ПермГ ($p < 0,05$);

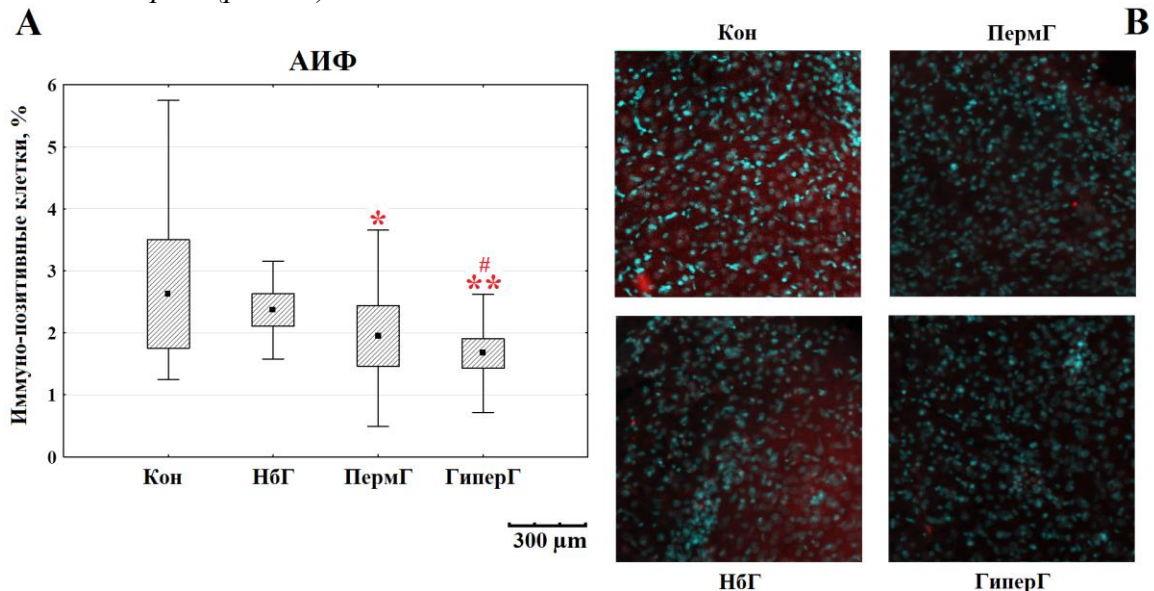


Рисунок 4 – Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих апоптоз-индуцирующий фактор (А) и микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В).

Примечание: Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – перmissive гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; * – отличия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – отличия по сравнению с контролем ($p < 0,001$); # – отличия по сравнению с НбГ ($p < 0,01$).

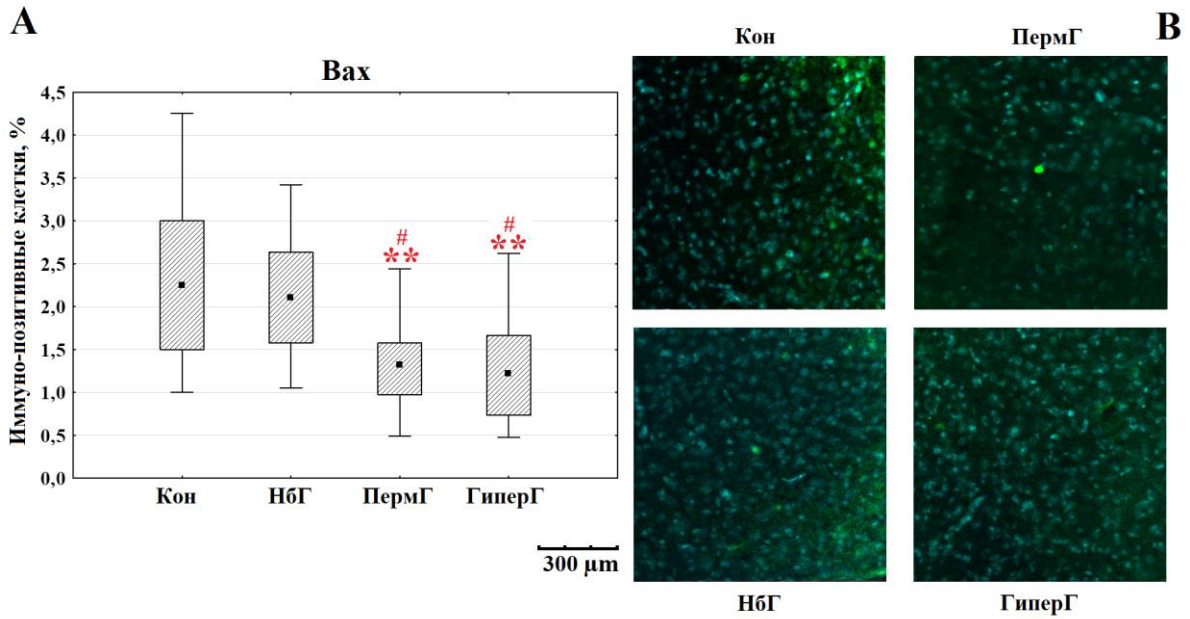


Рисунок 5 – Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих Vax (А) и микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В).
Примечание: Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – перmissive гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; ** – отличия по сравнению с контролем ($p < 0,001$); ## – отличия по сравнению с НбГ ($p < 0,05$).

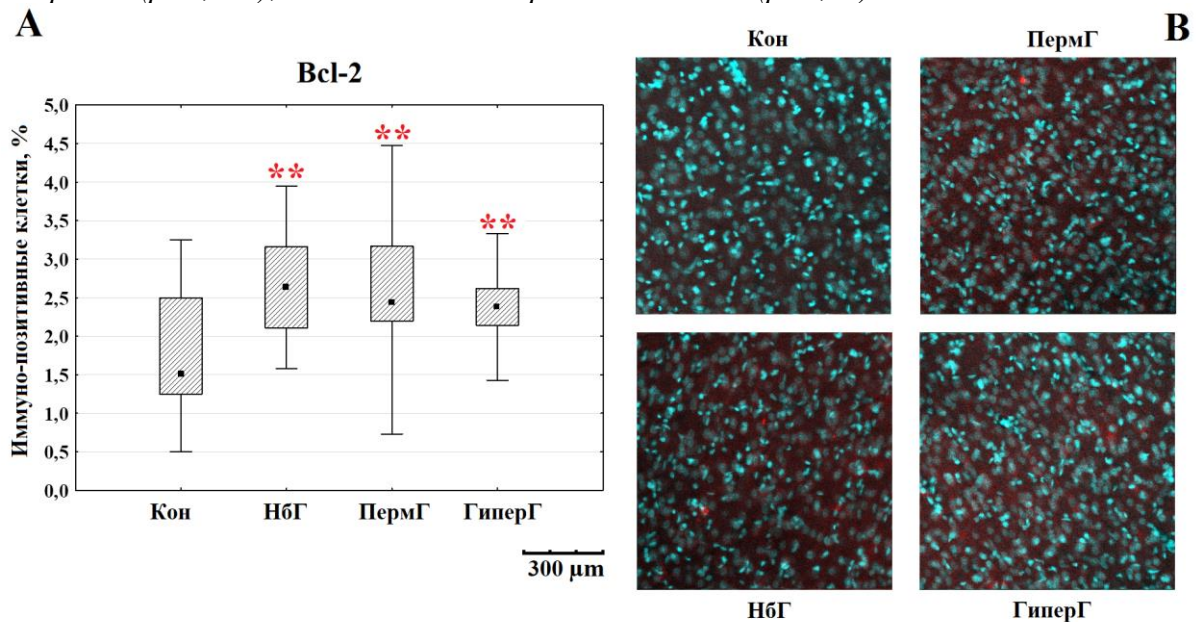


Рисунок 6 – Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих Vcl-2 (А) Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В).
Примечание: Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – перmissive гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; ** – отличия по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Оценка содержания клеток, вступающих в апоптоз или некроз, в культурах астроцитов и нейронов после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии показала отчетливую зависимость от длительности и

режима гипоксии/гиперкапнии. Так, у астроцитов без химической гипоксии усиление апоптоза произошло в группах гипоксического воздействия ($p < 0,05$), группе 24-часовой пермиссивной гиперкапнии ($p < 0,001$) и в группах интервальной гиперкапнической гипоксии ($p < 0,001$). При этом 12-часовое воздействие гиперкапнической гипоксии оказало на астроциты апоптоз-ингибирующее влияние ($p < 0,001$), а группы ПермГ12 и ГиперГ24 не показали различий с контрольными значениями. В то же время, количество некротизированных клеток было повышено по сравнению с контролем во всех группах гиперкапнических/гипоксических воздействий ($p < 0,001$), кроме групп сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии.

В культуре нейронов наблюдалась сходная динамика в отношении индукции апоптоза у групп гипоксического воздействия ($p < 0,05$) и группы 24-часовой пермиссивной гиперкапнии ($p < 0,001$). Однако, наряду с группой 12-часового воздействия гиперкапнической гипоксии ингибирование апоптоза вызывали также респираторные воздействия в группах ПермГ12 и ГиперГ24 ($p < 0,001$), а у группы ИГГх2 не обнаружилось различий с контролем. Важно отметить, что ни в одной из групп воздействия гиперкапнии и/или гипоксии не наблюдалось повышения уровня некротизированных нейронов по сравнению с контролем, а его снижение показано в группах сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии, как непрерывного, так и интервального ($p < 0,05$).

Результаты оценки интенсивности апоптоза/некроза в культурах нервных клеток после моделирования химической гипоксии для части групп воздействий гиперкапнии и/или гипоксии отражали картину, аналогичную условиям без химической гипоксии. Например, индукция апоптоза у астроцитов выявлялась после 24-часового воздействия пермиссивной гиперкапнии ($p < 0,001$) и нормобарической гипоксии ($p < 0,05$), при отсутствии различий с контрольными значениями у групп ПермГ12 и ГиперГ24. При этом ингибирование апоптоза в астроцитах в условиях химической гипоксии произошло после воздействия 12-часовой и интервальной гиперкапнической гипоксии ($p < 0,001$). Некроз среди астроцитов после химической гипоксии, как и без нее, был повышенным после 12- и 24-часового воздействия пермиссивной гиперкапнии ($p < 0,001$). Однако, в отличие от условий без химической гипоксии, снижение количества некротизированных клеток наблюдалось после 12-часового воздействия нормобарической гипоксии и гиперкапнической гипоксии, а также 2-циклового интервальной гиперкапнической гипоксии ($p < 0,001$).

Химическая гипоксия в культуре нейронов, в отличие от условий без химической гипоксии, не показала повышения интенсивности апоптоза в группах воздействия гиперкапнии и/или гипоксии, но этот показатель не различался с контрольным уровнем у групп 24-часовой нормобарической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии. Остальные режимы воздействий гиперкапнии и/или гипоксии проявили апоптоз-ингибирующую эффективность ($p < 0,001$). Повышение количества некротизированных нейронов, как и при условиях без химической гипоксии, не обнаруживалось в группах воздействия, а снижение этого показателя также наблюдалось в группах сочетанного

воздействия гиперкапнии и гипоксии, как непрерывного, так и интервального ($p < 0,001$).

Для комплексной интерпретации данных о воздействии различных режимов гиперкапнического и гипоксического воздействия на механизмы запуска апоптоза и некроза они были адаптированы под интегративную шкалу оценки (Таблица 2).

Таблица 2 – Интегративная оценка влияния гипоксии и гиперкапнии на интенсивность апоптоза/некроза.

		НбГ 24	НбГ 12	ПермГ 24	ПермГ 12	ГиперГ 24	ГиперГ 12	ИГГх3	ИГГх2
Без химической гипоксии	Астроциты - апоптоз	↓	↓	↓			↑	↓	↓
	Астроциты - некроз	↓	↓	↓	↓			↓	↓
	Нейроны - апоптоз	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	
	Нейроны - некроз					↑	↑	↑	↑
Итого (без химической гипоксии)		-3	-3	-3	0	2	3	-2	-1
После химической гипоксии	Астроциты - апоптоз	↓		↓			↑	↑	↑
	Астроциты - некроз		↑	↓	↓		↑		↑
	Нейроны - апоптоз		↑		↑	↑	↑	↑	↑
	Нейроны - некроз		↑			↑	↑	↑	↑
Итого (после химической гипоксии)		-1	3	-2	0	2	4	3	4
ИТОГО:		-4	0	-5	0	4	7	1	3

Примечание: НбГ24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; НбГ12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая пермиссивная гиперкапния; ГиперГ24 - 24-часовая гиперкапническая гипоксия; ГиперГ12 - 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх3 - 3-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх2 - 2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа; ↓ - индукция апоптоза/некроза; ↑ - ингибирование апоптоза/некроза.

Результаты иммуноцитохимического исследования количества клеток в культурах астроцитов/нейронов, содержащих про- и антиапоптотические факторы апоптоза, показали, что воздействие нормобарической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии с экспозицией 24 часа, а также 12-часовое воздействие гиперкапнической гипоксии увеличивает процент астроцитов с каспазой-3 (Рис. 7А).

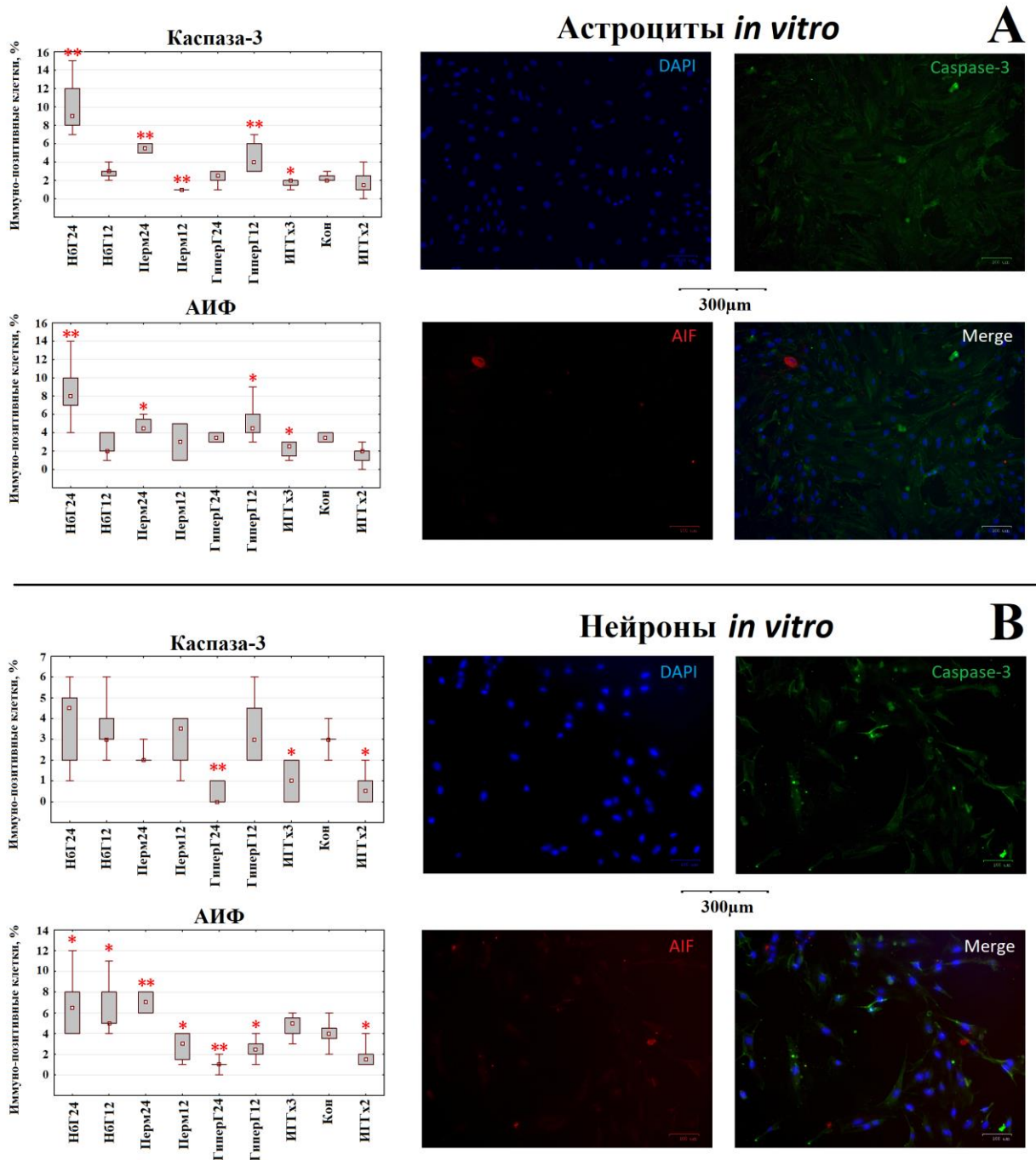


Рисунок 7 – Относительное содержание иммунопозитивных астроцитов (А) и нейронов (В) с флуоресцентными метками к каспазе-3 и апоптоз-индуцирующему фактору после химической гипоксии.

Примечание: Н6Г24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; Н6Г12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая перmissive гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая перmissive гиперкапния; ГиперГ24 - 24-часовая гиперкапническая гипоксия; ГиперГ12 - 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх3 - 3-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх2 - 2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа; * - отличия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - отличия по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

При этом воздействие перmissive гиперкапнии продолжительностью 12 часов и 3-кратной интермиттирующей гиперкапнической гипоксии, напротив,

вызывает снижение относительного содержания клеток с этим медиатором апоптоза. В культуре нейронов (Рис. 7В) наблюдалось увеличение относительного содержания клеток с каспазой-3 после 24-часового воздействия гиперкапнической гипоксии двух режимов интермиттирующей гиперкапнической гипоксии.

У астроцитарных культур 24-часовое воздействие нормобарической гипоксии, пермиссивной гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии вызвало увеличение относительного содержания клеток с апоптоз-индуцирующим фактором (Рис. 7А), а 3-кратное воздействие интермиттирующей гиперкапнической гипоксии снижало его. В то же время, в культуре нейронов воздействия нормобарической гипоксии с экспозицией 24 и 12 часов, а также 24-часовое воздействие пермиссивной гиперкапнии также стимулировали увеличение процента клеток, содержащих апоптоз-индуцирующий фактор (Рис. 7В). При этом 12-часовая пермиссивная гиперкапния, 24-часовая, 12-часовая и 2-кратная интермиттирующая гиперкапническая гипоксия, напротив, уменьшали этот процент.

Увеличение относительного содержания клеток с медиатором апоптоза Вах в культуре астроцитов (Рис. 8А) вызвала только 24-часовая пермиссивная гиперкапния, а 1-, 2- и 3-кратное 12-часовое воздействие гиперкапнической гипоксии его уменьшило. Воздействия нормобарической гипоксии с экспозицией 24 и 12 часов, а также 24-часовое воздействие пермиссивной гиперкапнии в культуре нейронов стимулировали увеличение клеток, содержащих Вах (Рис. 8В), а 12-часовое воздействие пермиссивной гиперкапнии, 1-, 2- и 3-кратное 12-часовое воздействие гиперкапнической гипоксии вызывали снижение их количества.

Процент клеток с антиапоптотическим медиатором Bcl-2 в культуре астроцитов (Рис. 8А) снижался после 12-часового воздействия нормобарической гипоксии и гиперкапнической гипоксии, а также 24-часовой пермиссивной гиперкапнии. При этом его повышение вызывала только 12-часовая пермиссивная гиперкапния. Примечательно, что в культуре нейронов все изолированные и сочетанные воздействия гипоксии и гиперкапнии, кроме интермиттирующих, вызывали увеличение относительного содержания клеток с Bcl-2 (Рис. 8В).

По аналогии с анализом данных об эффектах влияния гиперкапнического и гипоксического воздействия на интенсивность апоптоза и некроза, мы адаптировали данные о влиянии этих воздействий на медиаторы апоптоза под интегративную шкалу оценки (Таблица 3).

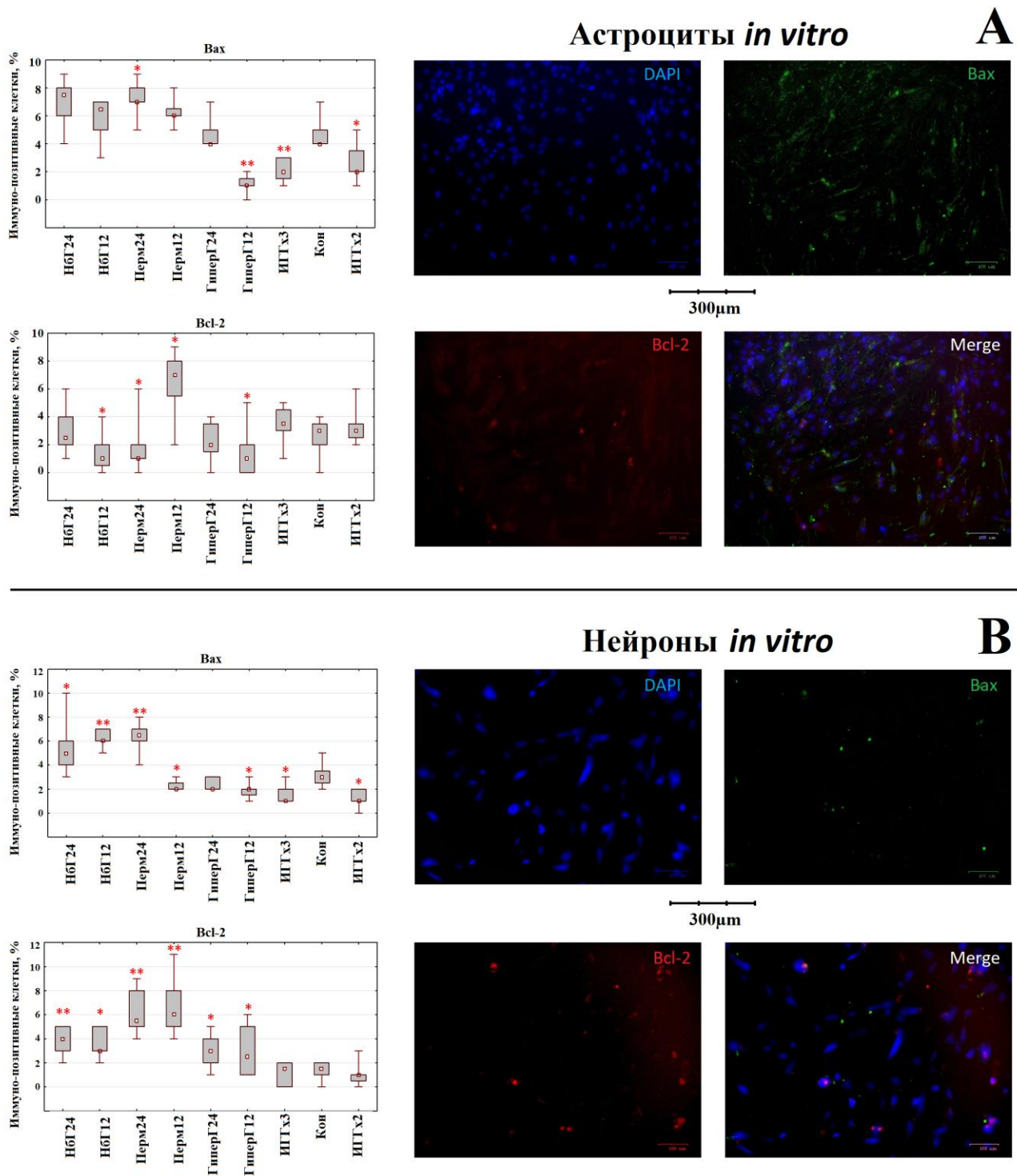


Рисунок 8 – Относительное содержание иммунопозитивных астроцитов (А) и нейронов (В) с флуоресцентными метками к Вах и Всl-2 после химической гипоксии.

Примечание: Н6Г24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; Н6Г12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая пермиссивная гиперкапния; ГиперГ24 - 24-часовая гиперкапническая гипоксия; ГиперГ12 - 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх3 - 3-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх2 - 2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа; * - отличия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** - отличия по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

Таблица 3 – Интегративная оценка влияния воздействий гипоксии и/или гиперкапнии на астроциты и нейроны *in vitro*.

	НБГ 24	НБГ 12	ПермГ 24	ПермГ 12	ГиперГ 24	ГиперГ 12	ИГГ x3	ИГГ x2
Каспаза-3								
Астроциты	↑		↑	↓		↑	↓	
Нейроны					↓		↓	↓
АИФ								
Астроциты	↑		↑		↑		↓	
Нейроны	↑	↑	↑	↓	↓	↓		↓
Bax								
Астроциты			↑			↓	↓	↓
Нейроны	↑	↑	↑	↓		↓	↓	↓
Bcl-2								
Астроциты		↓	↓	↑		↓		
Нейроны	↑	↑	↑	↑	↑	↑		
Интегративная оценка								
Астроциты	-2	-1	-3	+2	-1	-1	+3	+1
Нейроны	-1	-1	-1	+3	+3	+3	+2	+3
ИТОГО:	-3	-2	-4	+5	+2	+2	+5	+4

Примечание: НБГ24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; НБГ12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая пермиссивная гиперкапния; ГиперГ24 - 24-часовая гиперкапническая гипоксия; ГиперГ12 - 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГx3 - 3-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГx2 - 2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа; ↓ - увеличение относительного содержания клеток с проапоптотическими медиаторами (Каспаза-3, АИФ, Bax)/уменьшение относительного содержания клеток с антиапоптотическим медиатором (Bcl-2); ↑ - уменьшение относительного содержания клеток с проапоптотическими медиаторами (Каспаза-3, АИФ, Bax)/увеличение относительного содержания клеток с антиапоптотическим медиатором (Bcl-2).

Блок III-A. Содержание HIF-1 α в ткани гиппокампа, клеток с HIF-1 α в околоинсульной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии. Оценка газового состава артериальной крови у крыс во время респираторных воздействий показала, что уровень рН в группах, где присутствовал гиперкапнический компонент (ПермГ и ГиперГ) был ниже (≈ 7.1), по сравнению с группами НБГ и контроля (≈ 7.35) ($p < 0,001$). Аналогичные значения рН для интактных крыс и крыс, подвергнутых воздействию «умеренной» пермиссивной гиперкапнии, были продемонстрированы в работе Тао Т. et al. (2013, 2014). При этом значения рН в группе НБГ не показали значимых различий с контрольной группой, что свидетельствует об отсутствии сдвига кислотно-основного состояния при изолированном гипоксическом воздействии.

Напряжение CO₂ в артериальной крови крыс в группах ПермГ и ГиперГ (91 и 81 мм рт. ст., соответственно) было, как и ожидалось, существенно выше, чем в группе контроля (38 мм рт. ст.) ($p < 0,001$). Эти значения соответствовали

уровню «умеренной» пермиссивной гиперкапнии (60 – 100 мм рт. ст.), показавшей максимальный нейропротекторный эффект в работе Тао Т. [2013]. При этом различий в значении напряжения CO_2 между группами ПермГ и ГиперГ не наблюдалось. Уровень CO_2 в артериальной крови крыс контрольной группы находился в пределах справочных нормативов и данных других исследователей [Тао Т., 2013]. В группе НБГ значения PaCO_2 были ниже (30 мм рт. ст.), чем в группе контроля, но оставались в пределах нормокапнии [Fraser D., 2008], что, вероятно, обусловлено гипервентиляцией гипоксического генеза.

Напряжение кислорода в артериальной крови крыс в группах НБГ и ГиперГ (33 и 48 мм рт. ст., соответственно) было существенно ниже, чем в группах контроля и ПермГ (102 и 107 мм рт. ст., соответственно) ($p < 0,001$). При этом PaO_2 в крови крыс из группы ГиперГ было значимо больше по сравнению с группой НБГ ($p < 0,01$).

Содержание HIF-1 α в гиппокампе крыс после 7-кратных респираторных воздействий гипоксии и/или гиперкапнии было выше относительно контроля на 31% в группе НБГ ($p < 0,01$) и на 35% в группе ГиперГ ($p < 0,01$). При этом воздействие пермиссивной гиперкапнии не оказало значимого влияния на содержание HIF-1 α в ткани гиппокампа.

Относительное содержание клеток с HIF-1 α в культурах астроцитов *in vitro*, выделенных из гиппокампа крыс, подвергнутых при жизни 15-кратным респираторным воздействиям гипоксии и/или гиперкапнии, отличалось между контролем и группами воздействий гиперкапнии и/или гипоксии, как при росте клеток в условиях без химической гипоксии, так и при моделировании химической гипоксии. Увеличение процентного содержания клеток с HIF-1 α по сравнению с контрольной группой произошло при условиях без химической гипоксии в 4 раза в группе НБГ ($p < 0,001$) и в 4,9 раза в группе ГиперГ ($p < 0,001$). При этом после моделирования химической гипоксии повышение относительного содержания клеток с HIF-1 α , по отношению к контрольной и другим группам, наблюдалось только в группе ГиперГ ($p < 0,001$).

Процент клеток в культурах астроцитов, содержащих HIF-1 α и подвергнутых в условиях *in vitro* 24-часовому воздействию нормобарической гипоксии и гиперкапнической гипоксии, отличался между контрольной группой и группами воздействия гиперкапнии или гиперкапнической гипоксии как при росте клеток в условиях без химической гипоксии, так и при моделировании химической гипоксии. При условиях без химической гипоксии, увеличение относительного содержания клеток с HIF-1 α по сравнению с контрольной группой произошло в 4,6 раза в группе НБГ ($p < 0,001$) и в 2,3 раза в группе ГиперГ ($p < 0,001$). Таким образом, эффект гиперкапнии в группе ГиперГ уменьшил вдвое процент клеток с HIF-1 α по сравнению с группой НБГ ($p < 0,001$). При этом после добавления натрия йодоацетата в группе ГиперГ процент клеток с HIF-1 α не изменялся по сравнению с контролем, но в группе НБГ наблюдалось его существенное снижение ($p < 0,001$).

Уровень относительного содержания иммунопозитивных клеток с HIF-1 α в околоинсультной области коры головного мозга у крыс из группы НБГ был выше по сравнению с контролем в 3,3 раза ($p < 0,001$), а в группе ГиперГ выше

на 40% ($p < 0,01$). Значимых отличий между группой ПермГ и контролем не наблюдалось. Однако, уровень содержания клеток с NIF-1 α в группе ГиперГ был выше, чем в группе ПермГ ($p < 0,05$), но ниже по сравнению с группой НБГ ($p < 0,001$).

Блок III-B. Содержание клеток с A1 рецепторами и митоK⁺_{ATФ}-каналами в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии. Процентное содержание клеток с A1 рецепторами в культурах астроцитов, выделенных из гиппокампа крыс, подвергнутых при жизни 15-кратному курсу респираторных воздействий гипоксии и/или гиперкапнии, отличалось между группами как при росте клеток в условиях без химической гипоксии, так и после ее моделирования. При этом при условиях без химической гипоксии обнаружено снижение процента клеток с A1 рецепторами к аденозину в группе ПермГ, по сравнению с контролем на 26% ($p < 0,05$), а в группах НБГ и ГиперГ - увеличение процента клеток в 2 и 2,5 раза, соответственно ($p < 0,001$). После моделирования химической гипоксии у контрольной группы ($p < 0,001$) и группы ПермГ ($p < 0,05$) повышалось относительное содержание клеток с аденозиновыми A1 рецепторами более чем в два раза, по сравнению с условиями без химической гипоксии. В группе НБГ, напротив, произошло двукратное снижение их процентного содержания по отношению к группе контроля ($p < 0,001$). При этом в группе ГиперГ относительное содержание клеток с A1 рецепторами не изменилось в условиях после химической гипоксии, оставаясь сопоставимым с группой контроля.

Процент клеток с A1 рецепторами в культурах астроцитов после 24-часового воздействия гипоксии или гиперкапнической гипоксии *in vitro* отличался между группами как при росте клеток в условиях без химической гипоксии, так и после моделирования химической гипоксии. Увеличение процента клеток с A1 рецепторами при условиях без химической гипоксии обнаружено в группе НБГ, превысив значения группы контроля в 3 раза ($p < 0,001$). После моделирования химической гипоксии у астроцитов контрольной группы ($p < 0,001$) процентное содержание клеток с A1 рецепторами увеличилось в 2,3 раза, в группе ГиперГ на 20% ($p < 0,01$), а в НБГ, напротив, снизилось в 2,7 раза ($p < 0,01$) по отношению к условиям без химической гипоксии. При этом уровни относительного содержания клеток с A1 рецепторами в группах воздействия гипоксии и/или гиперкапнии оставались ниже уровня в группе контроля ($p < 0,01$), без взаимных различий.

У группы НБГ процент клеток с A1 рецепторами в околоинсультной области коры головного мозга был выше в два раза по отношению к контролю ($p < 0,001$). В группе ГиперГ этот показатель был выше на 45%, по отношению к значениям группы контроля ($p < 0,05$). При этом воздействие в группе ПермГ снизило процент клеток с A1 рецепторами почти вдвое ($p < 0,05$).

Процентное содержание клеток с митоK⁺_{ATФ}-каналами в культурах астроцитов, выделенных из гиппокампа крыс, подвергнутых при жизни 15-кратному курсу респираторных воздействий гипоксии и/или гиперкапнии, было

повышенным в условиях без химической гипоксии у всех групп воздействия ($p < 0,001$). При этом в группе ГиперГ процентное содержание клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами повысилось почти в 7 раз, в группе ПермГ в 2,5 раза, а в группе НБГ в 1,8 раза. Воздействие химической гипоксии вызвало снижение процентного содержания клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами, по сравнению с соответствующим контролем. Минимальные показатели наблюдались у группы ПермГ, где произошло снижение относительного содержания клеток в 5,4 раза ($p < 0,001$). При этом группы с наличием гипоксического компонента показали снижение на 24% ($p < 0,05$ для НБГ; $p < 0,001$ для ГиперГ). Примечательно, что в группах контроля и НБГ добавление натрия йодоацетата повышало процент клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами по отношению к условиям без химической гипоксии ($p < 0,001$), а в группах ПермГ ($p < 0,001$) и ГиперГ ($p < 0,05$) происходил противоположный эффект.

Относительное содержание клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами в культурах астроцитов после 24 часов воздействия гипоксии или гиперкапнической гипоксии *in vitro* при условиях без химической гипоксии увеличилось в группе НБГ в 4,2 раза, а в группе ГиперГ в 3,2 раза ($p < 0,001$), проявляя существенные различия ($p < 0,05$). После моделирования химической гипоксии у контрольной группы ($p < 0,001$) относительное содержание клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами было увеличено в 7 раз, а в группе НБГ было снижено в 2,4 раза ($p < 0,001$), по сравнению с условиями без химической гипоксии. При этом после добавления натрия йодоацетата в группе ГиперГ процент клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами не изменился по сравнению с условиями без химической гипоксии, и был на 53% выше, чем у группы НБГ ($p < 0,001$). При этом обе группы воздействия демонстрировали значительно меньшие показатели по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

У крыс из группы НБГ процент клеток, содержащих митоK⁺_{АТФ}-каналы, в околоинсультной области коры головного мозга был выше по сравнению с контролем почти в 2 раза ($p < 0,001$), в группе ПермГ в 2,6 раза ($p < 0,001$), а в группе ГиперГ выше в 3,4 раза ($p < 0,001$). При этом показатели группы ПермГ и ГиперГ были выше по сравнению с группой НБГ ($p < 0,01$), не показывая взаимных различий.

Блок IV. Изменение проницаемости ГЭБ после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии. Измерение концентрации Эванса голубого в плазме крови показало, что у крыс, которые подвергались сочетанному воздействию гиперкапнии и гипоксии, концентрация красителя была выше в 7,4 раза по отношению к группе контроля ($p < 0,001$). При этом содержание красителя в плазме крови у животных из контрольной группы было сопоставимым с данными других исследователей [Yang W. et al., 2019; Xu Y. et al., 2019].

Интегративная оценка флуоресценции Эванса голубого в ткани головного мозга продемонстрировала, что увеличение оптической плотности относительно контрольных значений произошло только в группе HyperH ($p < 0,05$) и составило 26%. После расчета индекса проницаемости, который

более точно характеризует проницаемость/целостность ГЭБ, обнаружилось его существенное снижение в группах, которые подвергались респираторным воздействиям с присутствием гиперкапнического компонента. Так, в группе PermH индекс проницаемости был ниже в 2 раза ($p < 0,05$), а в группе HyperH почти в 6 раз по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).

Блок V. Оптимизация параметров гиперкапнически-гипоксических тренировок для увеличения резистентности к острой гипоксии. В первой серии экспериментов показано, что уже 5-минутное сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии в 3-суточном курсе увеличивает резистентность к острой гипоксии на 65% ($p < 0,01$), по сравнению с исходным уровнем. В группе ГГ10 резистентность к гипоксии возросла практически в 2 раза ($p < 0,01$), однако максимальные значения определяемых параметров (увеличение почти в 3 раза относительно исхода) было зафиксировано в группе животных, подвергнутых 30-минутному воздействию ($p < 0,01$). Животные в группе ГГ60 показали самое низкое значение параметра ВПП среди групп гиперкапнически-гипоксических тренировок, в то время как ВЖ было ниже только по сравнению с группой ГГ30 ($p < 0,01$).

В соответствии с полученными данными, во второй и третьей серии исследования использовались тренировочные сеансы продолжительностью 30 минут, как наиболее эффективные. Показано, что резистентность к гипоксии после гиперкапнически-гипоксического воздействия формируется уже после 1-кратного 30-минутного сеанса ($p < 0,01$). 2-кратные воздействия с интервалом 24 часа были более эффективны, чем однократные ($p < 0,01$), а 3-кратные имели максимальную эффективность ($p < 0,01$). При этом 2-кратное воздействие в течение суток не имело преимуществ перед 1-кратным воздействием. Наименьшие значения показателей резистентности к острой гипоксии среди опытных групп во время проведения третьей серии исследования были зарегистрированы в группе ИГГЗД ($p < 0,01$), подвергнутой интервальным гиперкапнически-гипоксическим воздействиям.

Блок VI. Потенцирование защитного эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими средствами. Сравнительный анализ защитной эффективности при комбинировании гиперкапнически-гипоксических воздействий и фармакологических средств из разных групп показал, что потенцирующим эффектом обладает комбинация с ингибитором АПФ (эналаприлом). Применение эналаприла усиливало нейропротекторный эффект гиперкапнической гипоксии ($p < 0,05$), а применение АТФ и даларгина не показало значимого прироста нейропротекторной эффективности гиперкапнической гипоксии (Рис. 9). При этом сочетание блокатора карбоангидразы ацетазоламида с воздействиями гиперкапнической гипоксии полностью устраняло нейропротекторный эффект респираторных тренировок ($p < 0,01$).

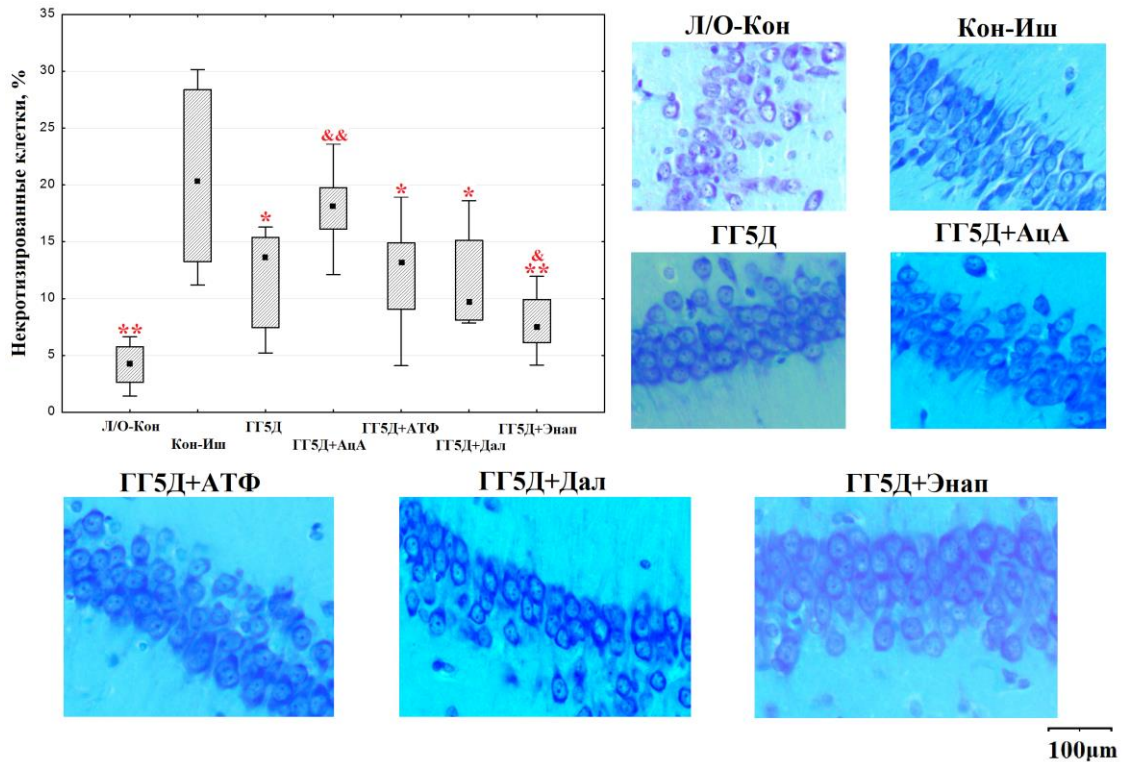


Рисунок 9 – Содержание нейронов с ишемическим повреждением в СА1 регионе гиппокампа после транзиторной ишемии.

Примечание: * – отличия по сравнению с группой *Con+Ischemia* ($p < 0,05$); ** – отличия по сравнению с группой *Con+Ischemia* ($p < 0,001$); & – отличия по сравнению с группой *HyperH* ($p < 0,05$); && – отличия по сравнению с группой *HyperH* ($p < 0,01$).

Блок VII. Влияние воздействий гиперкапнической гипоксии на интегративные показатели биологического и репродуктивного возраста мышей. Статистический анализ выживаемости мышей показал, что респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией увеличивали среднюю продолжительность жизни мышей на 16% ($p < 0,05$). По итогам исследования, средняя продолжительность жизни у мышей в группе ГиперГ составила 457 дней, а у мышей в контрольной группе - 384 дня.

Важными интегративными показателями репродуктивной функции мышей считаются среднее количество рожденного потомства на одну самку и количество мышат, доживших до 4-недельного возраста [Gustin S.E., 2008]. После первого цикла тренировок средняя рождаемость была выше в группе мышей, подвергаемых респираторным тренировкам с гиперкапнической гипоксией ($p < 0,05$). Рождаемость в группе ГиперГ после второго и третьего цикла воздействий не отличалась от показателей контрольной группы, но после четвертого ($p < 0,001$) и пятого циклов ($p < 0,01$) она была значительно больше.

Показатели выживаемости мышат, доживших до возраста 28 дней, показали сходную тенденцию с показателями рождаемости. Количество выживших мышат в группе воздействия гиперкапнической гипоксии также было выше по сравнению с контролем после первого ($p < 0,001$), четвертого ($p < 0,001$) и пятого ($p < 0,01$) курсов тренировок. Кроме того, после третьего курса воздействий в группе ГиперГ также выжило больше мышат, чем в группе

контроля ($p < 0,05$), хотя их рождаемость в этом цикле не отличалась между экспериментальными группами.

Исходные показатели мышечной силы и физической утомляемости не различались между группами. После второго цикла респираторных воздействий физическая утомляемость в группе ГиперГ была меньше по отношению к контролю и продолжала оставаться на низком уровне до пятого тренировочного цикла ($p < 0,01$). Увеличение времени удержания на подвешенной струне в группе ГиперГ, по сравнению с контрольной группой, было зарегистрировано после третьего и четвертого тренировочных циклов ($p < 0,01$).

Результаты тестирования в установках «Открытое поле» и «Темно-светлая камера» показали наличие различий между группами только после 4 цикла тренировок. После пятого и последующих курсов тестирование не выполнялось ввиду недостаточного количества животных для проведения статистического сравнения. Тестирование в установке «Открытое поле» показало, что горизонтальная двигательная активность у мышей из группы ГиперГ была меньше ($p < 0,01$), а вертикальная двигательная активность и время исследования «норок» - больше ($p < 0,01$), по сравнению с контролем.

Исследование мышей в тесте «Темно-светлая камера» после четвертого цикла тренировочных воздействий показало, что время пребывания в темной камере после формирования УРПИ у мышей из группы гиперкапнической гипоксии было меньше ($p < 0,01$), а Δt больше ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля.

Клинический блок. Функциональное состояние нервной системы у пациентов с детским церебральным параличом после курса гиперкапнически-гипоксических тренировок. До начала проведения тренировок у пациентов при сравнении количества баллов по шкале неврологического статуса GMFM-66 не было выявлено значимых различий между группами А и В, что указывает на успешную рандомизацию. В динамике прохождения курса реабилитации, достоверные улучшения неврологического статуса были выявлены как в группе А ($p < 0,001$), так и в группе В ($p < 0,001$), что свидетельствует об эффективной комплексной терапии во время реабилитации. После проведения тренировок не было выявлено достоверных различий в неврологическом статусе у пациентов из групп А и В.

Существенных различий в количественных показателях ритмов ЭЭГ пациентов выявлено не было. Единственное значимое различие заключалось в том, что в контрольной группе после лечения увеличилась частота альфа-ритма ($p < 0,05$). Эти данные могут свидетельствовать о позитивном влиянии стандартного лечения на биоэлектрическую активность мозга.

Так же в контрольной группе наблюдались положительные изменения в динамике регистрации патологических феноменов на ЭЭГ. После проведения курса воздействия значимо снижалось значение показателей «общего замедления корковой ритмики» и «отставания от возрастной нормы» ($p < 0,05$), что свидетельствует о позитивном влиянии стандартного лечения на биоэлектрическую активность головного мозга. В группе воздействия

гиперкапнической гипоксией значимых изменений при регистрации патологических феноменов не наблюдалось.

В обеих группах в динамике лечения произошло увеличение амплитуды пиков N2 и P3 эндогенных вызванных потенциалов (ВП) в сочетании со снижением их латентности, что свидетельствует о позитивном влиянии лечения на когнитивную функцию (Таблица 4). При этом латентность пика P3 в группе воздействия гиперкапнической гипоксией была ниже, по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$), что указывает на более эффективное восстановление когнитивной функции под влиянием курса респираторных тренировок.

Таблица 4 – Показатели когнитивных эндогенных вызванных потенциалов.

	ГРУППА А (N=20)		ГРУППА В (N=22)	
	До тренировок	После тренировок	До тренировок	После тренировок
A N2, мкВ	1,92 [1,34;3,23]	3,375** [3,16;6,71]	2,97 [2,03;3,9]	3,85** [2,85;7,22]
ЛП N2, мс	213 [200;226]	206** [200;217,5]	209,5 [203;223]	206,5* [200;217]
A P3, мкВ	6,38 [4,48;10,23]	10,55** [8,55;13,2]	5,95 [5,3;10,3]	10,38** [6,3;13,5]
ЛП P3, мс	340,5 [303;368]	305**# [300;331,5]	311,5 [300;350]	302**# [283;308]

*Примечание: Данные представлены в виде медианы, P25 и P75. Группа А – плацебо-контроль; Группа В – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; А N2 – амплитуда пика N2; ЛП N2 – латентный период N2; А P3 – амплитуда пика P3; ЛП P3 – латентный период пика P3; * - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ($p < 0,01$); ** - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ($p < 0,001$); # - отличия статистически значимы между группами ($p < 0,05$).*

Магнитная стимуляция пирамидного тракта выявила значимое снижение уровня межосевой асимметрии по времени центрального моторного проведения от моторной коры головного мозга до корешков SI-SII (ВЦМП-S) и порога возбудимости корковых мотонейронов в представительстве верхних конечностей слева между группой плацебо и группой воздействия гиперкапнической гипоксией по отношению к исходным показателям этих значений. В группе воздействия гиперкапнической гипоксией наблюдалось более значительное уменьшение этих показателей.

При этом только группа пациентов, прошедших тренировки гиперкапнической гипоксией, продемонстрировала положительную динамику по показателям магнитной стимуляции (ВЦМП-С, ВЦМП-S) и порогу возбудимости ПВ 1. В этой группе пациентов значимо сократилось ВЦМП-С с обеих сторон и ВЦМП-S слева. Кроме того, в группе воздействия гиперкапнической гипоксией в процессе лечения было зарегистрировано существенное, на 10-13% ($p < 0,001$), снижение порога возбудимости корковых мотонейронов в представительстве верхних конечностей. Указанные различия в показателях магнитной стимуляции свидетельствуют о существенном

положительном влиянии тренировочных воздействий на функциональное состояние пирамидного тракта у пациентов с ДЦП.

Тестирование реакции пациентов на гиперкапническую гипоксию с использованием газоанализа показало существенные индивидуальные различия между детьми. Одни дети реагировали на гиперкапническую гипоксию преимущественно гипервентиляцией и не достигали целевого значения гиперкапнии (5-6%), не смотря на использование максимальных значений ДОМП. Другие дети достигали заданное значение газов без существенных усилий и беспокойства. Кроме того, были дети, которые активно избегали дыхания через ДОМП, в основном, при помощи двигательной гиперактивности и также не достигали заданного значения гиперкапнии. В соответствии с этим, мы разделили детей на 3 основных типа стратегии адаптации к гиперкапнической гипоксии:

- Стратегия гипервентиляции (тип «гипервентиляция», неблагоприятный тип): основная составляющая - гипервентиляционная доминанта, не позволяющая достигнуть целевых значений гиперкапнии;

- Гомеостатическая адаптация (тип «гомеостаз», благоприятный тип): достижение заданного значения гиперкапнии с компенсацией изменения газового гомеостаза за счет физиологических резервов;

- Стратегия избегания (тип «избегание», неблагоприятный тип): не достижение целевых значений гиперкапнии с активным протестом и избеганием процедуры тренировки за счет гиперактивности.

Пациенты контрольной группы и группы воздействия гиперкапнической гипоксией различались по стратегии адаптации к гиперкапнической гипоксии. Во время первого тестирования, проводившегося перед началом курса тренировок, у обеих групп не было различий между благоприятным и неблагоприятными типами реактивности на гиперкапническую гипоксию. Однако, во время повторного тестирования, спустя 6-8 тренировок, стали проявляться различия между группами по преимущественной стратегии адаптации. Так, в контрольной группе динамика в стратегии адаптации у пациентов практически отсутствовала. В то же время, в группе воздействия гиперкапнической гипоксией при повторном тестировании существенно вырос удельный вес детей с благоприятной «гомеостатической» стратегией адаптации к гиперкапнической гипоксии ($p < 0,05$).

В процессе тренировок, к моменту повторного тестирования реакции на гиперкапническую гипоксию, пациенты из группы воздействия гиперкапнической гипоксией, достигали целевых значений $F_{et}CO_2$ почти в 2 раза чаще, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Это свидетельствует о более успешной адаптации детей после респираторных тренировок. При этом успешная адаптация в этой группе достигалась в основном за счет изменения в процессе тренировок стратегии адаптации к гиперкапнической гипоксии с неблагоприятных типов на благоприятный «гомеостатический».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты показали доминирующее влияние гиперкапнии на активацию синтетической активности в нервных клетках при фокальном ишемическом

повреждении головного мозга, а данные, полученные на модели *in vitro*, позволяют утверждать, что гипоксическое воздействие оказывает стимулирующий эффект на динамику прироста клеточного индекса, в т.ч. после моделирования острой химической гипоксии. Эти эффекты могут быть связаны со стимулирующим влиянием интермиттирующей гипоксии сигнального пути транскрипционного фактора HIF-1 α , который запускает антиапоптотические механизмы [Yeom S.J. et al., 2016; Li S.J. et al., 2017]. Кроме того, показано, что перmissive гиперкапния отсрочено повышает прирост клеточного индекса с формированием у клеток длительного латентного периода, что свидетельствует о протективном потенциале CO₂, который может быть обусловлен ингибирующим влиянием углекислоты на апоптоз в нервных клетках [Тао Т. et al., 2013], а также следствием активации систем MAPK и PI3K в микроглии с последующим повышением синтеза HIF-1 α по кислород-независимому пути [Dong H. et al., 2018; Лукьянова Л.Д., 2019; Lin L.T. et al., 2019].

Было установлено, что экспрессия GRP-78, участвующего в постстрессовом рефолдинге белков [Dickhout J.G. et al., 2009], после воздействия гиперкапнической гипоксии и перmissive гиперкапнии была выше, чем после воздействия гипоксии. Это может свидетельствовать о том, что углекислота имеет доминирующее влияние в эффекте активации этого шаперона при сочетании с гипоксией. Кроме того, после воздействия перmissive гиперкапнии наблюдалось повышение цитоплазматической экспрессии NF- κ B в сочетании с увеличением его нуклеарного содержания. Это может быть признаком перехода активированного фактора в ядро, что вызывает транскрипцию генов, ингибирующих апоптоз и формирующих клеточную адаптацию [Kaneko M. et al., 2003]. При этом содержание NF- κ B в цитоплазме и ядрах нервных клеток было максимальным после сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии.

Оценка интенсивности апоптоза в околоинсульной области и на модели *in vitro* у культур астроцитов и нейронов выявила, что перmissive гиперкапния, в т.ч. при сочетании с гипоксией, оказывает ингибирующий эффект на механизм апоптоза. Оценка содержания клеток с проапоптотическими факторами (каспаза-3, АИФ и Вах) показала, что они снижаются после воздействия перmissive гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии (Рисунок 10). Уровень клеток с противоапоптотическим фактором Bcl-2 повышался после всех воздействий. Эти данные сопоставимы с результатами, полученными в отношении перmissive гиперкапнии [Тао Т. et al., 2014]. Такие эффекты гиперкапнии, оказываемые преимущественно на митохондриальный апоптотический путь, могут быть обусловлены ее антиоксидантными эффектами [Barth A. et al., 1998; Zakyntinos S. et al., 2007], а также стабилизацией соотношения НАД⁺/НАДН и буферным эффектом бикарбоната на Ca²⁺ [Obrenovich T. et al., 2008; Brini M. et al., 2014]. Апоптоз-ингибирующее влияние гипоксии в данном случае, вероятно, связано с активацией системы PI3K [Zhao B.Q. et al., 2006; Лукьянова Л.Д., 2019] и антиапоптотическим эффектом транскрипционного фактора HIF-1 α [Li L. et al., 2007; Liu B.N. et al., 2014].

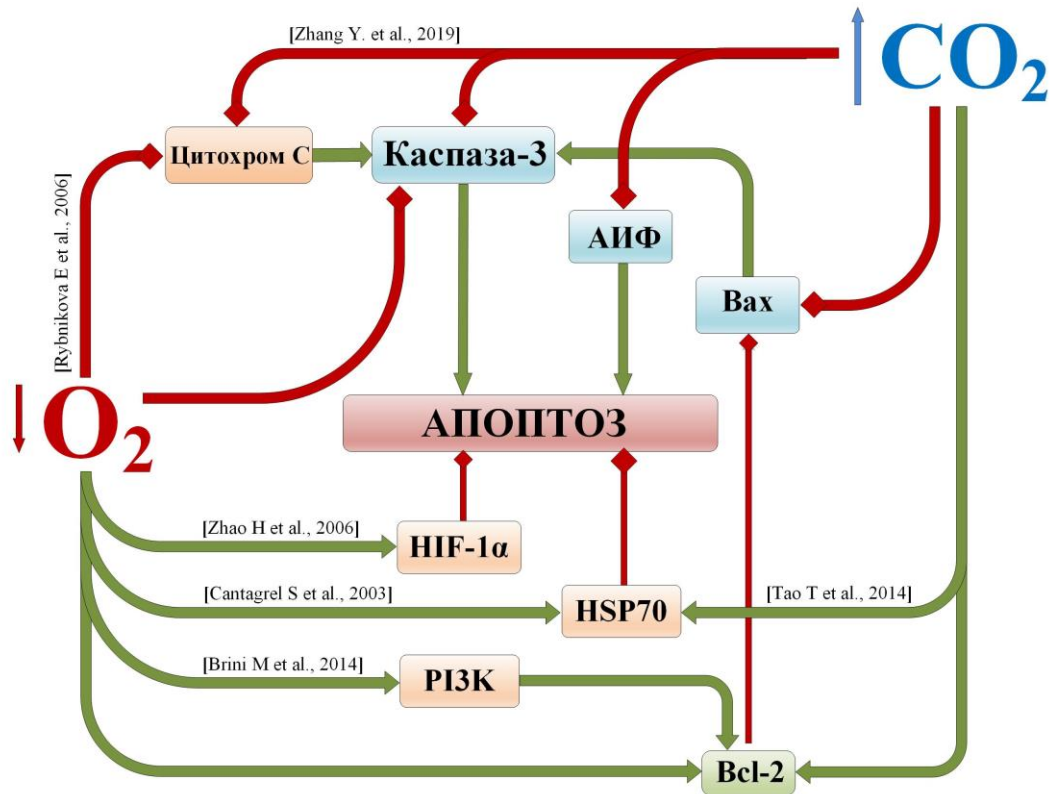


Рисунок 10 – Воздействие перmissive гиперкапнии и нормобарической гипоксии на основные медиаторы сигнальных путей апоптоза.

Примечание: Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация/индукция. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

Основные результаты на моделях *in vivo* и *in vitro* в отношении HIF-1α демонстрируют следующее: гиперкапния не вызывает прямого изменения уровня HIF-1α в тканях гиппокампа; сочетанная гипоксия и гиперкапния приводят к повышению относительного содержания клеток с HIF-1α в околоинсультной области и культурах астроцитов; при моделировании *in vitro* острой химической гипоксии у астроцитов содержание клеток с HIF-1α увеличивается как после воздействия гиперкапнической гипоксии *in vivo*, так и после эквивалентного воздействия *in vitro*; содержание клеток с HIF-1α в околоинсультной зоне головного мозга после сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии оказалось ниже, по сравнению с изолированным воздействием гипоксии. Это дает основание полагать, что гиперкапнический компонент напрямую не влияет на содержание HIF-1α, но может модулировать сигнальный механизм активации HIF-1 в условиях повреждающей гипоксии/ишемии. Подобный механизм, вероятно, направлен на увеличение ишемической/гипоксической толерантности нервной ткани, посредством протекции от излишнего накопления HIF-1α в ответ на умеренную гипоксию [Zhong H. et al., 1999], которая может спровоцировать нарушение апоптотических процессов в клетках [Yeom C.J. et al., 2016; Li S.J. et al., 2017] и их энергетического гомеостаза [Knyazev E.N. et al., 2019; Nagao A. et al., 2019].

Было обнаружено повышение процентного содержания клеток с A1 рецепторами в астроцитах *in vitro* и в клетках околоинсультной области коры головного мозга у крыс, подвергшихся воздействию гипоксии и гиперкапнической гипоксии, но не гиперкапнии (Рисунок 11). При этом гиперкапния и гипоксия повышали процентное содержание клеток с митоK⁺_{АТФ}-каналами в культуре астроцитов и в околоинсультной области коры головного мозга у крыс. В исследовании *in vitro* гиперкапния облегчала для A1 рецепторов и митоK⁺_{АТФ}-каналов последствия острой химической гипоксии, наблюдаемых у астроцитов. Данные факты, в контексте более высокого нейроректорного потенциала гиперкапнической гипоксии, можно рассматривать в качестве элементов защитного механизма от избыточной индукции аденозинового сигнального звена с акцентом на конечном эффекторе preconditionирования - митоK⁺_{АТФ}-каналах [Heurteaux C. et al., 1995; Stockwell J. et al., 2017].

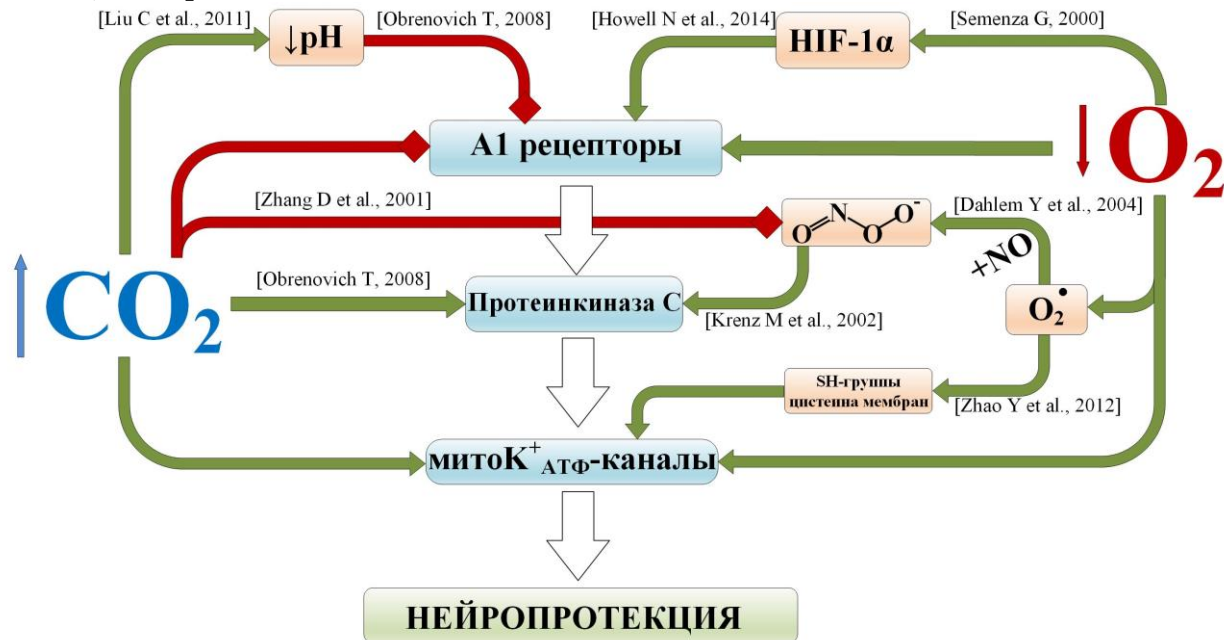


Рисунок 11 – Участие A1 рецепторов и митоK⁺_{АТФ}-каналов в молекулярных механизмах нейропротекторной эффективности гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии.

Примечание: Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация/индукция. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

Оценка проницаемости ГЭБ после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии, показала протекторный эффект гиперкапнического компонента на поддержание целостности и проницаемости барьера при сочетании с гипоксическим воздействием. Данные факты, вероятно, связаны со стимуляцией ангиогенеза при гиперкапнически-гипоксических тренировках [Беспалов А.Г. и соавт., 2014], а также с влиянием CO₂ и ацидоза на сужение резистивных артериол периферических органов и дилатацию артериол миокарда и мозга [Куликов В.П. и соавт., 2017].

По данным о влиянии сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии на показатели резистентности к острой гипобарической гипоксии можно судить о наиболее эффективных адаптационных параметрах при разработке методов респираторных дыхательных тренировок. Так, установлено, что уже 5-минутное ежедневное 3-кратное гиперкапнически-гипоксическое воздействие значимо, а 30-минутное - максимально, увеличивает резистентность организма к острой гипоксии. Низкая эффективность безинтервальных 60-минутных тренировок может свидетельствовать о возникновении «срыва» адаптации в результате длительного энергодефицита [Althausen S. et al., 2001]. При этом двукратные сеансы тренировок в течение суток не имеют преимуществ по сравнению с однократными, а гиперкапнически-гипоксические воздействия с периодами реоксигенации имеют наименьшую эффективность по сравнению с другими режимами воздействий. Это можно объяснить тем, что периоды реоксигенации оказывают угнетающее действие на экспрессию HIF-1 α , тем самым, уменьшая эффективность гипоксического воздействия [Stroka D. et al., 2001].

Сравнительный анализ эффективности комбинирования гиперкапнически-гипоксических воздействий и фармакологических средств, оказывающих протекторное влияние на разные молекулярно-клеточные сигнальные пути, показал, что потенцирующим эффектом обладает комбинация с ингибитором АПФ (эналаприлом), вероятно, вследствие его дополнительных антигипоксических и антиишемических свойств, которые реализуются посредством независимых от воздействия гиперкапнической гипоксии путей [Сафронова Е.С. и соавт., 2013].

Достаточно интересные данные были получены при проверке гипотезы о геропротекторном эффекте регулярных гиперкапнически-гипоксических тренировок: средняя продолжительность жизни у мышей, получавших курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии, увеличилась на 16% (74 дня), что является эквивалентом 11 человеческих лет [Flurkey K. et al., 2007]. Результаты эксперимента также показали, что гиперкапническая гипоксия продлевает репродуктивную молодость у самок мышей, а позитивная динамика отмечалась в отношении стрессоустойчивости, когнитивных функций, мышечной силы и физической утомляемости у мышей в старости после курсов гиперкапнически-гипоксических тренировок. Эти улучшения считаются ключевыми показателями в определении статуса здорового долголетия [Finch C.E. et al., 2009; Jafari M. et al., 2015].

Клиническое исследование на пациентах с ДЦП показало эффективность стандартного лечения в обеих группах, но без значимых различий между группой воздействия гиперкапнической гипоксии и группой плацебо. Вместе с тем, нейрофизиологическое обследование продемонстрировало улучшение отдельных показателей (вызванные потенциалы Р300 и ЭЭГ с магнитной стимуляцией) у пациентов, тренировавшихся с гиперкапнической гипоксией, что указывает на положительную эффективность в отношении функционального состояния нервной системы при ДЦП. Сопоставимые данные в отношении интервальных гипоксических тренировок у детей с ДЦП были показаны ранее, в

виде улучшения нейрофизиологических показателей на ЭЭГ [Yatsenko K.V. et al., 2012]. Кроме того, разработанный способ клинического тестирования и группировки пациентов по признаку адаптационной стратегии к гиперкапнической гипоксии, позволяет подбирать методику дыхательных тренировок на основании объективных данных газообмена и поведенческих реакций для достижения максимальной терапевтической эффективности курса дыхательных воздействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования, полученные в экспериментальной части работы, подтверждают первоначальную гипотезу о механизме взаимного потенцирования протекторных эффектов гиперкапнии и гипоксии при их сочетанном интермиттирующем воздействии. Большинство нейропротекторных механизмов, участвующих в формировании толерантности головного мозга к ишемии, обусловлено вкладом как избытка углекислоты, так и дефицита кислорода (Рис. 12). Однако, ряд нейропротекторных сигнальных систем при воздействии гиперкапнической гипоксии связан с преимущественным влиянием только одного из компонентов. Например, такие молекулы, как HIF-1 α и A1 рецепторы, подвержены преимущественному влиянию гипоксического стимула, а фактор NF- κ B и избирательная проницаемость ГЭБ модулируются, главным образом, гиперкапнией.

Очевидно, что зафиксированный ранее феномен максимальной нейропротекторной эффективности сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии, превосходящий их изолированное применение, базируется на указанном механизме взаимного потенцирования. Немаловажным также является тот факт, что углекислота, в определенной степени, имеет ограничивающий потенциал на гипоксическую активацию таких защитных механизмов как A1 рецепторы и транскрипционный фактор HIF-1 α . Вероятно, эта особенность позволяет тканям достигать большего уровня толерантности к ишемии/гипоксии на организменном уровне и продлевать адаптационные изменения на более длительный срок.



Рисунок 12 – Потенцирование нейропротекторных механизмов при воздействии гиперкапнии и гипоксии.

Примечание: Стрелками обозначены направления обнаруженных эффектов избытка CO₂ и дефицита O₂: красные линии – ингибирование; зеленые линии – активация/индукция двумя факторами; синие линии – активация/индукция только одним фактором.

Данные, полученные в трансляционной части работы, демонстрируют, что ежедневные гиперкапнически-гипоксические воздействия увеличивают резистентность организма к острой гипоксии пропорционально количеству и длительности сеансов воздействия продолжительностью от 30 до 60 минут, а эпизоды реоксигенации не оказывают влияния на резистентность. При этом фармакологическое потенцирование в комбинации с ингибитором АПФ (эналаприлом) может значимо повышать нейропротекторную эффективность респираторных тренировок с интермиттирующей гиперкапнической гипоксией, а регулярные респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией в течение жизни приводят к увеличению ее средней продолжительности и улучшают интегративные показатели физической выносливости, репродуктивной и когнитивной функций в старости.

Клинические результаты, показали, что респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией оказывают позитивное влияние на функциональное состояние нервной системы у детей с ДЦП и могут применяться как средство увеличения эффективности стандартной терапии для этих пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Сочетанное воздействие гиперкапнической гипоксии увеличивает количество ядрышковых организаторов в нервных клетках околоинсультной области головного мозга крыс интенсивнее, чем воздействие перmissive гиперкапнии, которая по этому параметру является более эффективной, чем нормобарическая гипоксия; Гиперкапния, в условиях сочетания с гипоксией, является приоритетным фактором для увеличения в околоинсультной области головного мозга крыс шаперона GRP-78 и активации транскрипционного фактора NF-κB, являющихся сигнальными звеньями ответа эндоплазматического ретикулама, стимулирующих нейропротекторные механизмы.
2. После воздействия гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов и нейронов уменьшается процент клеток с проапоптотическими медиаторами (каспаза-3, АИФ, Вах) и увеличивается процент клеток с антиапоптотическим медиатором (Bcl-2), что вызывает ингибирование апоптоза в механизме нейропротекции; Сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии в течение первых 10 часов наблюдения увеличивает темп прироста клеточного индекса у сокультуры астроцитов/нейронов более интенсивно, чем их изолированное воздействие, а воздействие нормобарической гипоксии у сокультуры астроцитов/нейронов повышает темп прироста клеточного индекса в течение всего периода наблюдения после химической гипоксии.

3. Воздействие перmissiveй гиперкапнии не повышает уровень транскрипционного фактора HIF-1 α в ткани гиппокампа и процентное содержание клеток с HIF-1 α в околоинсульной области головного мозга крыс и в культуре астроцитов *in vitro*. При этом гиперкапнический компонент, увеличивает процент клеток с HIF-1 α в культуре астроцитов после химической гипоксии, что является частью нейропротекторного механизма при их сочетанном воздействии.
4. Воздействие перmissiveй гиперкапнии, в отличие от нормобарической гипоксии, не увеличивает процент клеток, содержащих A1 рецепторы, в околоинсульной области головного мозга крыс и астроцитарной культуре. При этом гиперкапния и ее сочетание с гипоксией повышают процент клеток, содержащих митоK⁺_{ATФ}-каналы, в околоинсульной области головного мозга крыс и культуре астроцитов, стимулируя нейропротекторные механизмы, отождествляемые с сигнальными путями прекодиционирования.
5. Курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии вызывает наименьшее изменение уровня проницаемости ГЭБ у крыс, по сравнению с изолированными воздействиями нормобарической гипоксии и перmissiveй гиперкапнии.
6. Ежедневные гиперкапнически-гипоксические воздействия у крыс увеличивают резистентность организма к острой гипоксии пропорционально количеству и длительности сеансов, достигая максимального эффекта при длительности воздействия от 30 до 60 минут. При этом увеличение кратности сеансов тренировок в течение суток не влияет на их эффективность, наличие периодов реоксигенации во время воздействий снижает их эффективность, а однократное введение крысам ингибитора АПФ (эналаприла) значительно повышает нейропротекторный эффект гиперкапнической гипоксии.
7. Регулярные респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией у мышей приводят к увеличению средней продолжительности жизни на 16%, а также улучшают у мышей интегративные показатели физической выносливости, репродуктивной и когнитивной функции в старости: повышается количество здорового потомства, увеличивается мышечная сила, уменьшается физическая утомляемость, повышается стрессоустойчивость, активизируется исследовательское поведение и ускоряется формирование рефлекса пассивного избегания.
8. Респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией у детей с ДЦП оказывают позитивное влияние на функциональные показатели состояния нервной системы. После 14 дневного курса 30-минутных гиперкапнически-гипоксических тренировок происходит снижение времени центрального моторного проведения, уменьшение порога возбудимости корковых мотонейронов при магнитной стимуляции и снижение латентности пика Р3 при регистрации ЭЭГ методом вызванных потенциалов. Комбинация курса респираторных тренировок и тестирования индивидуальной реактивности на гиперкапническую гипоксию, которое разделяет пациентов по типам адаптационной стратегии организма, может применяться как средство повышения эффективности стандартной терапии у пациентов с ДЦП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пат. 118558 Российская Федерация, МПК А61 М 39/00. Дыхательная трубка. / В.П. Куликов, П.П. Трегуб; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью научно-производственная компания "Карбоник" (RU). – №2011140837/14; заявл. 07.11.2011; опубл. 27.07.2012, Бюл. № 21.
2. Роль аденозиновых А1-рецепторов и митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, Л.А. Степанова, А.С. Забродина, М.Е. Нагибаева, С.А. Аль-Таршан, Е.В. Белова // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (сборник статей) (Барнаул, 15 мая 2014 г.) Под ред. В.М. Брюханова – Барнаул: Изд-ва ООО «Пять плюс». - С. 31- 33.
3. Пролиферативная и синтетическая активность нервных клеток после сочетанного и изолированного воздействия гипоксией и гиперкапнией / П.П. Трегуб, Н.Ю. Ручейкин, Е.В. Белова // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (сборник статей) (Барнаул, 15 мая 2014 г.) Под ред. В.М. Брюханова – Барнаул: Изд-ва ООО «Пять плюс». - С. 33- 34.
4. Роль эритропоэтина и белка HIF-1a в механизме нейропротекции при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, Е.А. Дорохов // Материалы XVI научно-практической конференции «Молодежь - Барнаулу». – 2014. – Барнаул. - С.658.
5. Исследование газового состава крови у крыс во время сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии / Е.А. Дорохов, П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, А.С. Кузнецов // Материалы XVI научно-практической конференции «Молодежь - Барнаулу».– 2014. – Барнаул. - С. 544 – 545.
6. Роль аденозиновых А1-аденозиновых рецепторов и митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии / А.С. Забродина, М.Е. Нагибаева, С.А. Аль-Таршан, Е.В. Белова, П.П. Трегуб // Материалы XVI научно-практической конференции «Молодежь - Барнаулу».– 2014. – Барнаул. - С. 562 - 563.
7. Пролиферативная и синтетическая активность нервных клеток после сочетанного и изолированного воздействия гипоксией и гиперкапнией / Н.Ю. Ручейкин, Е.В. Белова, П.П. Трегуб // Материалы XVI научно-практической конференции «Молодежь - Барнаулу». – 2014. – Барнаул. - С.621.
8. Пролиферативная и синтетическая активность нервных клеток после сочетанного и изолированного воздействия гипоксией и гиперкапнией / П.П. Трегуб, В.П. Куликов, Н.Ю. Ручейкин, Е.В. Белова, Ю.Г. Мотин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 311-313. Импакт-фактор РИНЦ 0,265.
9. Оптимальные параметры воздействия гиперкапнической гипоксии для увеличения резистентности к острой гипоксии / В.П. Куликов, И.С. Осипов, П.П. Трегуб // **Авиакосмическая и экологическая медицина**. – 2015. - № 5. – С. 25-28. Импакт-фактор РИНЦ 0,548.
10. Гиперкапния – альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1a и эритропоэтина в головном мозге / В.П. Куликов, П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, Е.А. Дорохов, А.А. Белоусов // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2015. - № 3. - С. 34-37. Импакт-фактор РИНЦ 0,428.
11. Газовый состав крови у крыс при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии / Е.А. Дорохов, П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, А.С. Кузнецов // Материалы XXI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2015». - 2015. - Санкт-Петербург. - С.50-51.

12. Роль аденозиновых А1-рецепторов и митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, А.С. Забродина, М.Е. Нагибаева, Л.А. Степанова, С.А. Аль-Таршан, Е.В. Белова // *Материалы XXI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2015»*. - 2015. - Санкт-Петербург. - С. 6 - 7.
13. Роль эритропоэтина и белка HIF-1 α в механизме нейропротекции при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, Е.А. Дорохов // *Материалы XXI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2015»*. - 2015. - Санкт-Петербург. - С.51 -52.
14. Роль ингибиторов апоптоза NF- κ B и GRP-78 в механизме нейропротекции при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, А.С. Забродина, М.Е. Нагибаева, Е.В. Белова // *Материалы XXI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2015»*. - 2015. - Санкт-Петербург. - С. 19 - 21.
15. Роль компенсаторно-приспособительных реакций эндоплазматического ретикула в формировании ишемической толерантности при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / В.П. Куликов, П.П. Трегуб // *Материалы седьмой всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов»*. Под ред. В.А. Шкурупия. – Новосибирск: ИП Пермяков С.А. - 2015. – С.368.
16. Газовый состав крови у крыс во время метаболического ацидоза, изолированного и сочетанного воздействия гипоксии, гиперкапнии и водорода / Е.А. Дорохов, П.Д. Ковзелев, П.П. Трегуб, Д.С. Дубровин // *Материалы V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (сборник статей) (Барнаул, 15 мая 2015 г.)*. Под ред. И.П. Салдана. – Барнаул: Изд-во ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. – 2015. – С.12-14.
17. Участие основных сигнальных путей прекондиционирования в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / А.С. Забродина, М.Е. Нагибаева, Е.В. Белова, П.П. Трегуб, Л.А. Степанова // *Материалы V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (сборник статей) (Барнаул, 15 мая 2015 г.)*. Под ред. И.П. Салдана. – Барнаул: Изд-во ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. – 2015. – С.14 -16.
18. Гиперкапния – альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1 α и эритропоэтина в головном мозге / П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, Е.А. Дорохов // *Материалы V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (сборник статей) (Барнаул, 15 мая 2015 г.)*. Под ред. И.П. Салдана. – Барнаул: Изд-во ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. – 2015. – С.18 -19.
19. Активация адаптивной ветви стресса ЭПР в механизме нейропротекции при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, М.Е. Нагибаева, А.С. Забродина, Е.В. Белова // *Материалы V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (сборник статей) (Барнаул, 15 мая 2015 г.)*. Под ред. И.П. Салдана. – Барнаул: Изд-во ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. – 2015. – С. 73 - 75.
20. Стресс эндоплазматического ретикула нейронов при инсульте максимально ограничивается сочетанием гиперкапнии и гипоксии / П.П. Трегуб, В.П. Куликов, Ю.Г. Мотин, М.Е. Нагибаева, А.С. Забродина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2016. - №4. - С.457-461. Импакт-фактор РИНЦ 0,265.
21. Ингибирование апоптоза - потенциальный механизм повышения ишемической толерантности мозга при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии / П.П. Трегуб, Н.А. Малиновская, В.П. Куликов, А.Б. Салмина, М.Е. Нагибаева, А.С. Забродина, Г.Е. Герцог, С.К. Антонова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2016. — № 5. — С. 606-609. Импакт-фактор РИНЦ 0,265.

22. Нейрофизиологические механизмы эффективности гиперкапнической гипоксии в коррекции двигательных нарушений у больных детским церебральным параличом / В.П. Куликов, П.П. Трегуб, Д.В. Паршин, Ю.В. Смирнова, К.В. Смирнов, А.Н. Заря // Актуальные вопросы медицинской реабилитации: инновационные технологии, клиническое питание, традиционные аспекты: XI научно-практическая конференция: тезисы докладов. – Новосибирск. - 2016. – С. 20-23.
23. Нейрофизиологические эффекты гиперкапнически-гипоксических воздействий в коррекции двигательных нарушений, вызванных детским церебральным параличом / П.П. Трегуб, В.П. Куликов, Д.В. Паршин, Ю.В. Смирнова, К.В. Смирнов // Сборник тезисов международной научной конференции – школа молодых ученых «Заболевания мозга: Вызов XXI века», 16 – 17 мая 2018 г. – Казань: Издательство ООО «Конверт».– 2018. - С.55 – 56.
24. Механизмы нейропротекторного эффекта сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, В.П. Куликов, Н.А. Малиновская // **Сибирское медицинское обозрение**. – 2018. - № 3. – С. 5-13. Импакт-фактор РИНЦ 0,421.
25. Сочетание гиперкапнии и гипоксии приводит к ацидозу и увеличивает содержание HIF-1 α в гиппокампе крыс / В.П. Куликов, Ю.Г. Мотин, П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев, К.А. Шошин, Е.К. Зинченко, А.Е. Чернецкий // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова**. – 2018. - № 11. - С. 1347 – 1355. Импакт-фактор РИНЦ 0,579.
26. Геропротекторная эффективность гиперкапнически-гипоксических дыхательных тренировок / В.П. Куликов, П.П. Трегуб, И.С. Осипов, А.И. Труханов // Материалы VI Европейского Конгресса по превентивной, регенеративной и антивозрастной медицине ESCOPRAM-2019, 06-07 октября 2019 г. – Геленджик: Издательство ФНКЦ РР. – 2019, - С.12 – 13.
27. Гиперкапнически-гипоксические дыхательные тренировки как потенциальный способ реабилитационного лечения пациентов, перенесших инсульт / Т.М. Алексеева, П.Д. Ковзелев, М.П. Топузова, Т.В. Сергеева, П.П. Трегуб // **Артериальная гипертензия**. – 2019. - № 2. - С. 134 – 142. Импакт-фактор РИНЦ 1,492.
28. HIF-1 – Альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии / П.П. Трегуб, В.П. Куликов, Н.А. Малиновская, Д.А. Кузовков, П.Д. Ковзелев // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. - 2019. - № 4. - С. 115-122. Импакт-фактор РИНЦ 0,428.
29. Hypercapnic hypoxia as a potential means to extend life expectancy and improve physiological activity in mice / V. Kulikov, P. Tregub, I. Osipov, A. Trukhanov // **Biogerontology**. - 2019 - Vol.20, No 5. - P.677 – 686. Импакт-фактор JCR 4,284.
30. Hypercapnia potentiates HIF-1 α activation in the brain of rats exposed to intermittent hypoxia / P.P. Tregub, N.A. Malinovskaya, A.V. Morgun, E.D. Osipova, V.P. Kulikov, D.A. Kuzovkov, P.D. Kovzelev // **Respiratory Physiology & Neurobiology**. – 2020. - Vol. 278. - P. 103442. Импакт-фактор JCR 2,821.
31. Гиперкапния и гипоксия усиливают пролиферацию астроцитов и нейронов *invitro* / П.П. Трегуб, А.В. Моргун, Е.Д. Осипова, В.П. Куликов, Н.А. Малиновская, Д.А. Кузовков // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2020. – Т. 169, № 6. - С. 695-699. Импакт-фактор РИНЦ 0,265.
32. Гиперкапния и ее сочетание с гипоксией снижают проницаемость гематоэнцефалического барьера у крыс / П.П. Трегуб, Н.А. Малиновская, В.П. Куликов, Д.А. Кузовков // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2021. – Т. 65, № 2. - С. 30-36. Импакт-фактор РИНЦ 0,428.
33. Потенцирование защитного эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими нейропротекторами / В.П. Куликов, Л.А. Каланова, П.П. Трегуб // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2021. - № 3. - С. 21-25. Импакт-фактор РИНЦ 0,428.

34. Влияние гиперкапнии и гипоксии на физиологию и метаболизм церебрального эндотелия в условиях ишемии / П.П. Трегуб // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова**. – 2022. – Т. 108, № 5. – С. 579-593. Импакт-фактор РИНЦ 0,579.
35. Hypercapnia modulates the activity of adenosine A1 receptors and mitoK⁺ATP-channels in rat brain when exposed to intermittent hypoxia / P.P. Tregub, N.A. Malinovskaya, E.D. Osipova, A.V. Morgun, V.P. Kulikov, D.A. Kuzovkov // **NeuroMolecular Medicine**. – 2022. – Vol. 24, No 2. – P. 155-168. Импакт-фактор JCR 4,103.
36. Hypercapnic-hypoxic breathing exercises are effective in the rehabilitation of children with spastic cerebral palsy / V.P. Kulikov, P.P. Tregub, D.V. Parshin, Yu.V. Smirnova, K.V. Smirnov // **Neurological Research**. – 2022. – Vol. 44, No 8. – P. 738-747. Импакт-фактор JCR 2,529.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- | | |
|---|---|
| АПФ - Ангиотензин-превращающий фермент | GMFCS - Gross Motor Function Classification System / Система классификации общих двигательных функций |
| АТФ - Аденозинтрифосфат | GMFM-66 - General Motor Function Measure / Измерение общей двигательной активности |
| ВЖ - время жизни | GRP-78 / HSP70 / - Связывающий белок иммуноглобулина, также известный как GRP-78 или белок теплового шока 70 кДа |
| ВПП - время потери позы и двигательной активности; | 5 (HSP70) |
| ГЭБ - гематоэнцефалический барьер | HIF-1 α - hypoxia inducible factor 1-alpha / гипоксия индуцируемый фактор 1-альфа |
| ДОМП - Дополнительный объем мертвого пространства | HSP70 - Белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа |
| ДЦП - Детский церебральный паралич | Kir6.2 - Inward-rectifier potassium channels / Калиевые каналы внутреннего выпрямления - основная субъединица митоK ⁺ АТФ-канала |
| КИ - Клеточный индекс | MACS - Manual Ability Classification System / Система классификации мануальных навыков |
| миток ⁺ АТФ-каналы - митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы; | NF- κ B - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells / ядерный фактор «каппа-би» |
| НАД ⁺ - Никотинамидадениндинуклеотид | NSE - neuron specific enolase / нейрон-специфическая енолаза |
| НАДН - Восстановленная форма кофермента | PI3K - Phosphoinositide 3-kinase / фосфатидилинозитол-3-киназа |
| никотинамидадениндинуклеотида | TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling / Детектирование концевой фрагмента концевой дезоксиинуклеотидил - трансферазы |
| КИ - Клеточный индекс | VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста |
| ИГХ / ИЦХ - Иммуногистохимия / иммуноцитохимия | |
| УРПИ - Условный рефлекс пассивного избегания | |
| ЭПР - эндоплазматический ретикулум | |
| ЭЭГ - Электроэнцефалограмма | |
| AIF / АИФ - Apoptosis-inducible factor / Апоптоз-индуцирующий фактор | |
| Bax - Bcl-2 associated X / bcl-2-ассоциированный X-белок | |
| Bcl-2 - B-cell lymphoma 2 / фактор В-клеточной лимфомы 2 | |
| Bcl-xL - B-cell lymphoma-extra large / фактор В-клеточной лимфомы очень большой | |
| CFCS - Communication function classification system / Система классификации коммуникативных функций | |
| GFAP - glial fibrillary acidic protein / глиальный фибриллярный кислый белок | |