

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**Трегуб Павел Павлович**

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

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
д-р мед. наук, профессор  
Куликов Владимир Павлович

Красноярск – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	19
1.1. Базисные сигнальные пути в механизме нейропротекции	19
1.2. Репрограммирование апоптоза при формировании толерантности головного мозга к ишемии	28
1.3. HIF-1 – альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии	33
1.4. Гипоксическая модуляция адаптационных систем, связанных с A1 рецепторами и митохондриальными АТФ-зависимыми K <sup>+</sup> -каналами	38
1.5. Патофизиология и метаболизм церебрального эндотелия в условиях гипоксии/ишемии	42
1.6. Перспективы для оптимизации режима воздействия и повышения защитной эффективности гиперкапнической гипоксии	50
1.7. Терапевтический потенциал и возможности для клинического применения гиперкапнически-гипоксических тренировок	53
<b>ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	57
2.1. Объект и методы экспериментальной части исследования	57
2.2. Клиническая часть исследования	90
2.3. Математико-статистическая обработка результатов	98
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	99
3.1. 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	99
3.2. Ингибирование апоптоза в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов и нейронов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии	109
3.3. Содержание HIF-1α в ткани гиппокампа, клеток с HIF-1α в	125

околоинсульной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии	
3.4. Содержание клеток с A1 рецепторами и митоK <sup>+</sup> <sub>АТФ</sub> -каналами в околоинсульной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии	134
3.5. Изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии	144
<b>ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	147
4.1. Оптимизация параметров гиперкапнически-гипоксических тренировок для увеличения резистентности к острой гипоксии	147
4.2. Потенцирование защитного эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими средствами	150
4.3. Влияние воздействий гиперкапнической гипоксии на продолжительность жизни и интегративные показатели биологического возраста мышей	151
4.4. Функциональное состояние нервной системы у пациентов с детским церебральным параличом после курса гиперкапнически-гипоксических тренировок	159
<b>ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	170
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	209
<b>ВЫВОДЫ</b>	212
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	215
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	221

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 preconditionирования или курса гипоксических тренировок [Sazontova, T.G. et al., 2016; Dzhililova D.S. et al., 2018; Jung M.E. and 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; Tao T. et al., 2013, 2014; Pruimboom L. and 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 ретикулула, ингибирование апоптоза в околоинсультной области, протекторные эффекты гипоксией-индуцируемого фактора 1-альфа (HIF-1 $\alpha$ ), адаптивные эффекты митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов (миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы) и аденозиновых рецепторов, сохранение избирательной проницаемости и целостности гемато-энцефалического барьера (ГЭБ).

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 ретикулула (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. and 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  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), происходящая в ответ на накопление в просвете ЭПР дефектных белков и инициацию стресса [Kaneko

M., et al., 2003; Zhang K. and 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.B., 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-1α [Murphy B.J., 2004]. Концентрация и стабильность HIF-1α, 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-1α 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 др., 2018], а под действием аденозина происходит активация митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов [Deryagin O.G. et al., 2017; Szeto V. et al., 2018] и снижение передачи синаптического возбуждения [Ilie et al. 2006]. При этом углекислота может вызывать индукцию Ca<sup>2+</sup>-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 др., 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 preconditioning 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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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 preconditionированием механизмы [Seydyousefi M. et al., 2019]; органопротекторный антагонист опиоидных рецепторов (даларгин), который предотвращает эндотелиальную дисфункцию [Govindaswami, M. et al., 2008; Гребенчиков О.А. и др. 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. и соавторы [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. and 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 околоинсульной 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-1 $\alpha$  в ткани гиппокампа, относительное содержание клеток с HIF-1 $\alpha$  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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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 основной 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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в области ишемического/гипоксического повреждения и снижением проницаемости ГЭБ.
2. При сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии избыток CO<sub>2</sub> 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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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 последиplomного 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 работы**

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном и клиническом материале (621 экспериментальное животное, 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 ECOPRAM-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.

### **Структура и объем 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 соискателя**

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.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Данный обзор литературы сосредоточен на базовых и вспомогательных сигнальных механизмах и связанных с ними функциональных изменениях, влияющих на толерантность мозга к ишемии. Также обзор литературы содержит раздел, в котором описаны современные представления о потенциале для разработки новых нейропротективных стратегий, на основе данных о сигнальных путях толерантности головного мозга к ишемии.

#### 1.1. Базисные сигнальные и эффекторные пути в механизме нейропротекции

##### 1.1.1. Электролитный гомеостаз и энергетический метаболизм

В устойчивых к ишемии гиппокампальных нейронах региона CA1 была обнаружена высокая активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы клеточной стенки и усиленное связывание  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях [Ohta S. et al., 1996]. Уровень внутриклеточного кальция в нейронах этой области гиппокампа у животных толерантных к ишемии, значительно снижался после эпизода аноксии-агликемии [Shimazaki K. et al., 1998]. Так же показано, что после preconditionирования 3-нитро-пропионовой кислотой, в цитоплазматической мембране нейронов гиппокампа усиливалась экспрессия  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [Kato K. et al., 2005]. Важно отметить, что моделирование транзиторной глобальной ишемии у крыс усиливает в нейронах экспрессию генов  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, наряду с экспрессией белков теплового шока [Majda B.T. et al., 2001]. При этом локализация региона, где происходит ишемическое повреждение, определяет ген натрий-кальциевого обменника, подверженный повышенной экспрессии [Pignataro G. et al., 2004].  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник и  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -транспортер также являются важными ионными переносчиками, поскольку принимают участие в регуляции кислотно-щелочного равновесия и объема клеточной жидкости [Pedersen SF., 2006]. Руководствуясь этими данными, можно предположить, что эти мембранные

структуры также будут вовлечены в процесс формирования толерантности к ишемии, однако, подобные данные для центральной нервной системы пока не получены.

В эксперименте Brucklacher R.M. и соавторами были получены противоречивые результаты: уровень гликогена в головном мозге крыс повышался спустя 24 часа после гипоксического preconditionирования, а уровень остаточной АТФ в конце 1,5-часовой гипоксии-ишемии был значительно выше, чем в группе контроля [Brucklacher R.M. et al., 2002]. Такой быстрый рост уровня АТФ наряду с увеличением концентрации внеклеточного лактата во время ишемии [Frykholm P. et al., 2005] и во время ишемии с периинфарктной деполяризацией [Norwood S.E. et al., 2005] могут быть значимым метаболическим адаптивным изменением в головном мозге, особенно, во время реперфузии.

Обратный захват глюкозы в тканях мозга и ее утилизация происходят преимущественно при участии белков-транспортеров GLUT<sub>1</sub> и GLUT<sub>3</sub> [Yamada T. et al., 2006], модуляция которых может увеличивать толерантность мозга к ишемии. Кроме того, показано, что экспрессия GLUT<sub>1</sub> усиливается под влиянием HIF-1 $\alpha$  [Sharp F.R. et al., 2004] и ряда клеточных систем, ингибирующих апоптоз [Russo V.C. et al., 2004].

#### 1.1.2. Активация шаперонов.

Повышенная экспрессия генов белков теплового шока является универсальным клеточным ответом на повреждение, а их шаперонная активность обеспечивает цитопroteкцию во время стресса [Franklin T.B. et al., 2005]. Исследования *in vivo* показали, что толерантность к ишемии головного мозга непосредственно связана с индукцией неконституитивного HSP-70 и других шаперонов [Currie R.W. et al., 2005], а ранние исследования *in vitro* уже подтвердили, что инактивация HSP-70 ослабляет адаптивную цитопroteкцию [Riabowol K.T. et al., 1988]. Убедительно аргументирована важность HSP-70 в реализации механизма адаптивной цитопroteкции и

нейропротективные свойства его высоких уровней HSP-70. Это позволяет рассматривать этот молекулярный шаперон с множеством цитопротективных функций в качестве важного терапевтического объекта [Söti C. et al., 2005; Zheng Z. and Yenari M.A., 2006]

Ранние исследования уже подтвердили, что инактивация HSP-70 ослабляет адаптивную цито- и нейропротекцию [Riabowol K.T. et al., 1988; Nakata N. et al., 1993]. В то же время, большое количество фактов указывают на то, что сверхэкспрессия HSP-70, в т.ч. вирус-опосредованная, нейропротективна [Höehn B. et al., 2001; Kelly S et al., 2001, 2002]. Тем не менее, уровень HSP-70 также повышался через день после preconditionирования, когда толерантность еще не возникала [Chen J. et al., 1996]. Два других исследования показали, что толерантность к ишемии может и не коррелировать с ап-регуляцией HSP-70 [Currie R.W. et al., 2000; Nishino K. and Nowak T.S. Jr., 2004]. Последние данные поддерживают гипотезу, что HSP-70 (и другие шапероны) не единолично ответственны за толерантность к ишемии, и что они могут не требоваться для церебропротекции.

Вдобавок, HSP-70 способен выступать в качестве прямого антагониста апоптоза. HSP-70-индуцированная защита митохондрий предполагает стимуляцию выживаемости клеток после ишемического повреждения, и такой антиапоптозный эффект поддерживается на основании факта, что сверхэкспрессия HSP-70 сокращала выделение цитохрома C из митохондрий в межмембранное пространство [Matsumori Y. et al., 2005] и ядерную транслокацию апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) [Matsumori Y. et al., 2005; Sun Y. et al., 2006]. Что касается внутреннего каспазо-зависимого апоптоза, HSP-70 ингибирует реакции, приводящие к повышению проницаемости мембран митохондрий и высвобождению цитохрома C, преимущественно путем ингибирования транслокации Bax (проапоптозный член семейства Bcl-2) в митохондрию, предположительно через свою

способность подавлять активацию N-концевые киназы c-Jun (JNK) [Stankiewicz A.R. et al., 2005].

Значительный интерес представляет адаптивная реакция эндоплазматического ретикула во время стресса нервных клеток, регулируемая за счет шаперонового каскада [Ostergaard L. et al., 2009]. Важными сигнальными механизмами этого каскада считаются шаперон GRP-78 [Ostergaard L. et al., 2009] и NF-κB, который считается одним из основных сигнальных «передатчиков» прекодиционирования [Kaneko M. et al., 2003]. Кроме того, имеются данные, что HSP-70 может регулировать активацию NF-κB [Dirnagl U. et al., 2003]. В колониях, происходящих от иммунных клеток, двухцепочечная РНК-активированная протеинкиназа (PKR), вовлеченная в активацию NF-κB, была смодулирована посредством HSP-70, чем опосредовала его антиапоптозную функцию через активацию PKR/NF-κB-зависимого защитного пути [Frémont et al., 2006].

### 1.1.3. Пролиферация, самовосстановление и нейрогенез.

Потенциальная пролиферация стволовых клеток-предшественниц обеспечивает зрелый мозг гибкостью и самовосстановлением путем нейрогенеза, который происходит в ответ на внешние стимулы и повреждения [Lichtenwalner R.J. and Parent J.M., 2006]. В толерантном к ишемии мозге феномен нейрогенеза был изучен Naylor M. и соавторами [2005] на модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс. Было показано, что пролиферация клеток-предшественниц возрастала после создания фокальной ишемии, а также после прекодиционирования.

Изучение ростового и нейротрофического факторов привело к данным, поддерживающим мнение, что нейрогенез активируется в толерантном мозге. Некоторые факторы роста, включая основной фактор роста фибробластов (bFGF), эпидермальный ростовой фактор (EGF), нейротрофический фактор роста (BDNF) и васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), влияют на нейрогенез, и в интактном, и в ишемизированном мозге [Lichtenwalner R.J.

and Parent J.M., 2006]. Большое количество работ уже продемонстрировало, что нейрогенез, связанный с ишемическим повреждением мозга, может быть усилен путем добавления EGF, bFGF или VEGF [Baldauf K. and Reymann K.G., 2005; Dempsey R.J. et al., 2003; Sun Y. et al., 2003; Tureyen K. et al., 2005], но следует заметить, что в отношении BDNF наблюдался негативный эффект [Larsson E. et al., 2002].

Синаптогенез (т.е. аксональный рост и изменения дендритных шипиков) является другим потенциальным механизмом изменчивости и самовосстановления после ишемического повреждения в мозге. У взрослых крыс постинсультный рост аксонов сводился к массивному перераспределению связей между рядом расположенной соматосенсорной корой и зоной инфаркта, с уникальным профилем генов, ускоряющих нейрональный рост [Carmichael S.T. et al., 2001, 2005]. Что касается перестройки дендритов, изменения, предшествующие отсроченной гибели нейронов, и вызванные кратковременной ишемией в CA1 гиппокампе крыс, были связаны с нейродегенерацией [Martone M.E. et al., 1999; Ruan Y.W. et al., 2006], в то время как отдаленные изменения, такие как увеличение плотности дендритов в зонах, окружающих ишемическое повреждение коры, могут отражать морфологическую гибкость и восстановление [Adkins-Muir D.L. and Jones T.A., 2003].

#### 1.1.4. Антиоксидантный клеточный сигналинг

Существует множество свидетельств того, что свободно-радикальные механизмы принимают участие в процессе повреждения головного мозга, вызванного ишемией/реперфузией [Moro M.A. et al., 2005]. Во время восстановления кровотока происходит чрезмерный выброс оксида азота, что также может способствовать ишемическому повреждению нервной ткани посредством формирования активных форм азота, таких как пероксинитрит [Keynes R.G. and Garthwaite J., 2004]. Имеются данные о том, что генерация супероксидного аниона в процессе прекодиционирования, необходима для

последующего развития толерантности к ишемии [Furuichi T. et al., 2005]. К примеру, внутривенное введение крысам рекомбинантной супероксиддисмутазы перед ишемическим прекондиционированием исключало формирование толерантности к последующей транзиторной ишемии, так же, как и усиление экспрессии HSP-70 [Mori T. et al., 2000]. Существуют аналогичные данные о защитных свойствах NO°, включающих индукцию экспрессии генов, лежащих в основе прекондиционирования мозга [Cho S. et al., 2005; Zakynthinos S. et al., 2007].

Примечательным является то, что в умеренной концентрации CO<sub>2</sub> стимулирует антиоксидантную активность [Barth A. et al., 1998], активируя супероксиддисмутазу, стабилизируя железо-трансферриновый комплекс, нейтрализуя активные формы кислорода, соединяясь с пероксинитритом, а затем переходя в нитрокарбонат, и при соединении с водой, образуя карбокси-анион и нитроксид-анион [Zhao Z.S. et al., 1998; Goss SP. 1999; Kniffin C.D. et al., 2014]. В эксперименте, моделирующем воздействие гипоксии и гиперкапнии на беспозвоночных животных [Kniffin C.D. et al., 2014] было показано, что эти два фактора в умеренном режиме способствуют активации антиоксидантной системы при повреждении, увеличивая экспрессию генов цитоплазматической супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и пептид-метионин-оксид-редуктазы.

#### 1.1.5. Ограничение последствий нейровоспаления

После ишемии и реперфузии поврежденная ткань головного мозга выделяет цитокины и хемокины, которые привлекают воспалительные клетки в поврежденную область [Lakhan S.E. et al., 2009; Jin R. et al., 2010]. Эти клетки выделяют свои собственные секреторные факторы, которые могут накапливаться до токсичных уровней. Воспалительные процессы также приводят к выработке активных форм кислорода, что приводит к окислительному стрессу и активации матриксных металлопротеиназ (ММП), вызывая нарушение ГЭБ и отек. С другой стороны, воспаление также



оказывает благотворное воздействие, такое как увеличение притока крови к пораженной области и удаление поврежденной ткани фагоцитарными клетками и ММП.

Положительные и отрицательные эффекты воспаления после инсульта и целесообразность ограничения его последствий - часто обсуждаемая тема [del Zoppo G.J. et al., 2001]. Однако, обычно считается, что воспаление приносит больше вреда, чем пользы после инсульта, особенно на ранних стадиях. В действительности, изучение роли воспалительных цитокинов в нейроповреждении весьма затруднительно, поскольку механизмы, вовлеченные в этот процесс очень сложные, и цитокины действуют в очень низких концентрациях на многие клетки, как в головном мозге, так и за его пределами, они также опосредуют многие взаимозависимые про- и противовоспалительные процессы [Allan S.M. and Rothwell N.J., 2001; Calvo C.F. et al., 2005; Zhu Y. et al., 2006]. При этом можно сказать, что нейропротекторные стимулы вторично индуцируют экспрессию нескольких эндогенных ингибиторов воспаления, что сокращает воспалительную реактивность мозга, состояние, которое может явиться важной чертой толерантности к ишемии [Raghavendra Rao V.L. et al., 2002; Bates S. et al., 2001; Zubakov D. et al., 2003].

Одной из важных молекул, приводящих к повреждению и гибели клеток после инсульта, является фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) [Majid A. et al., 2013]. TNF $\alpha$  взаимодействует с двумя рецепторами (R1 и R2), которые опосредуют сигналы клеточной гибели через Fas-ассоциированный домен смерти (FADD) и индуцируют воспаление через NF- $\kappa$ B [Jablonska A. and Lukomska B., 2011]. Активация сигнального пути фактора NF- $\kappa$ B обычно используется в качестве индикатора воспаления в исследованиях инсульта. Следует отметить, что не все эффекты NF- $\kappa$ B при нейровоспалении являются вредными для нервной ткани при ишемическом повреждении, и связаны, преимущественно, с аномальным ацетилированием субъединицы RelA [Lanzillotta A. et al. 2012].

Интерлейкины выступают еще одним важным набором молекул в процессе нейровоспаления. Интерлейкин-(ИЛ)-1 обладает провоспалительным действием, тогда как ИЛ-10 обладает противовоспалительным действием, а ИЛ-6 обладает как про-, так и противовоспалительным действием [Jablonska A. and Lukomska B., 2011]. Было показано, что антагонисты рецептора ИЛ-1 обладают нейропротекторным действием при введении в ходе реперфузии у крыс с сопутствующей патологией при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) [Pradillo J.M. et al., 2012].

Различные сигнальные каскады, индуцируемые инсультом, приводят к активации и привлечению воспалительных клеток к месту повреждения. На ранних стадиях инсульта, до инфильтрации нервной ткани нейтрофилами и макрофагами, резидентная микроглия представляет пул первичных воспалительных клеток в головном мозге [Michalski D. et al., 2012]. Хотя микроглия служит полезной цели, удаляя мертвые ткани, она также высвобождает секреторные факторы, которые могут накапливаться до токсичных уровней, особенно в случаях избыточной активации, таких как ишемия. Сезамин и ретиноиды обладают нейропротекторным действием и, как было показано, предотвращают увеличение количества клеток микроглии [Ohnishi M. et al., 2012] и снижают уровень ее активации после ишемии [Matsushita H. et al., 2012]. Альтернативно, повышение реактивности микроглии также может оказывать нейропротекторное действие. Так, блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкламид увеличивает фагоцитарную способность микроглии, что приводит к улучшению неврологического исхода, уменьшению объема инфаркта и усилению нейрогенеза у крыс после ОСМА [Ortega F.J. et al., 2013; Wali B. et al., 2012]. Активация рецептора никотинового ацетилхолина альфа-7 микроглии индуцирует экспрессию гена гемоксигеназы-1, который связан с нейропротекцией у мышей после фототромботического инсульта [Parada E. et al., 2013].

### 1.1.6. Прочие механизмы формирования толерантности головного мозга к ишемии

Среди взаимосвязанных, полифакториальных сигнальных и эффекторных путей нейропротекции, кроме рассмотренных выше, многие авторы также выделяют следующие:

- возможность регулировать перегрузку клеток кальцием [Frykholm P. et al., 2005];
- сохранение мембранного потенциала митохондрий [Jensen M.S. et al., 2002; Wu L.Y. et al., 2004];
- предотвращение глутаматной эксайтотоксичности [Obrenovitch T.P. and Urenjak J., 1997; Danbolt N.C., 2001; Mahmoud S. et al., 2019];
- репарация ДНК в поврежденных клетках [Evans M.D. et al., 2004; Li W. et al., 2006];
- равновесие глутамат-эргической и ГАМК-эргической передачи [Schiene K. et al., 1999; Sommer C. et al., 2002];
- ремоделирование церебральных микрососудов и сохранение их реактивности [Choy M. et al., 2006; Ohtaki H. et al., 2006; Vlasov T.D. et al., 2005; Куликов В.П. и др., 2017];
- репрограммирование нейронального апоптоза в околоинсультной зоне;
- эпигенетические эффекты транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ ;
- модуляция адаптационных систем, связанных с A1-аденозиновыми рецепторами и митохондриальными АТФ-зависимыми K<sup>+</sup>-каналами;
- поддержание избирательной проницаемости и целостности ГЭБ;

Детальному рассмотрению последних четырех указанных механизмов посвящены следующие разделы настоящего литературного обзора.

## **1.2. Репрограммирование апоптоза при формировании толерантности головного мозга к ишемии**

Одним из важнейших механизмов увеличения толерантности головного мозга к ишемии является торможение апоптоза [Obrenovitch TP. 2008]. Этот защитный механизм в период реперфузии предотвращает гибель частично поврежденных нейронов в зоне ишемии. Клетки в очаге инфаркта обычно умирают по пути некроза, тогда как клетки в околоинфарктной зоне умирают по пути апоптоза. Основным фактором, определяющим механизм гибели клеток, является уровень АТФ внутри клетки [Majid A. et al., 2013]. Кроме того, в контексте терапевтического вмешательства апоптоз предпочтительнее некроза, поскольку он может быть заблокирован различными методами лечения, что позволяет спасти частично поврежденную ткань.

Классический (т.е. каспазо-зависимый) апоптоз может инициироваться двумя основными путями метаболизма: «внутренний» митохондриальный путь метаболизма и «внешний» путь метаболизма, запускающийся через рецепторы смерти. Оба этих пути пересекаются на семействе каспаз [Krantic S. et al., 2005]. Во «внутреннем» пути метаболизма, высвобождение цитохрома С из митохондрий инициирует активацию каспазного каскада через образование апоптосомы (комплекс Аraf-1/цитохром С/каспаза-9). В процессе сборки апоптосомы происходит аутоактивация прокаспазы-9, за которой следует накопление и активация прокаспазы-3. Расщепленная каспаза-9 остается связанной с апоптосомой, которая набирает и активирует эффекторные каспазы (каспаза-3, -6 и -7). Каспаза-3 расщепляет ингибитор дезоксирибонуклеазы (ДНКазы), активируя ее, что завершается интернуклеосомальной фрагментацией ДНК [Krantic S., et al., 2005]. В качестве альтернативы выступает внешний путь метаболизма, управляемый активацией каспазы-8 и плазматических мембранных рецепторов смерти. Митохондриальный, каспазо-независимый апоптоз инициируется после освобождения AIF из межмембранного пространства митохондрий в

цитозоль, из которого он перемещается в ядро. Поскольку AIF сам по себе не обладает эндонуклеазной активностью, итоговый распад ДНК требует сборки нижележащих нуклеаз, таких как циклофиллин А [Krantic S., et al., 2005]. Центральная роль митохондрий во внутреннем каспазо-зависимом и каспаза-независимом апоптозе и факт того, что сохранность митохондрий связана с толерантностью к ишемии [Jensen M.S. et al., 2002; Wu L.Y. et al., 2004], доказывают, что апоптоз может подавляться в толерантном к ишемии мозге, что и было рассмотрено в многочисленных работах [Cantagrel S. et al., 2003; Tanaka H. et al., 2004; Zhu H.C. et al., 2004]. Далее данная гипотеза была подкреплена множественными антиапоптозными эффектами HSP-70 (см. раздел 1.1.2).

Белок p53, подавляющий опухолевый рост, является важным транскрипционным фактором, обеспечивающим апоптоз, который следует за повреждением нейронов [Cregan S.P., 2004]. Ряд фактов показывает, что содержание этого белка сокращается в головном мозге, толерантном к ишемии:

- уровень p53 и экспрессия его РНК повышались в гиппокампе крыс спустя 24 часа после кратковременной ишемии переднего мозга [Tomasevic G., et al., 1999];

- диазоксид (агонист митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов) ингибировал апоптоз нейронов, культивированных из области СА1 гиппокампа в условиях гипоксии/аноксии, что ассоциировалось с уменьшением экспрессии p53 [Huang L. et al., 2006];

Несколько исследований, проведенных на крысах, мышах и песчанках *in vivo* или на культурах клеток *in vitro*, с использованием различных прекодиционирующих стимулов и последующих тестовых повреждений, были посвящены модификациям в семействе белков Bcl (т.е. Bcl-2, Bcl-xL и Bax), играющих важную роль в запрограммированной смерти клеток. Данные исследования доказывают, что толерантность к ишемии связана со сдвигом

соотношения Bax/ (Bcl-2, Bcl-xL) в сторону подавления апоптоза. Данные, поддерживающие эту гипотезу:

- постоянная сверхэкспрессия антиапоптозных генов Bcl-2 и Bcl-xL [Meller R. et al., 2005; Rybnikova E. et al., 2006];
- ап-регуляция проапоптозного гена Bax, возникающая после контрольного повреждения, снижалась в мозге прекондиционированных крыс [Brambrink A.M. et al., 2000; Rybnikova E et al., 2006];
- инфузия олигонуклеотидов Bcl-2 в желудочки мозга уменьшала экспрессию Bcl-2 и подавляла толерантность к ишемии у крыс [Shimizu S. et al., 2001].

Несмотря на то, что большинство сведений об антиапоптозных изменениях в толерантном к ишемии мозге связаны с событиями, предполагающими подавление активации каспазы-3, имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что прекондиционирование может способствовать выживаемости нейронов даже в условиях активации каспазы-3, но без последующей клеточной смерти. В частности, предполагается, что некоторые стадии активации каспазы-3 необходимы для максимального развития толерантности к ишемии [McLaughlin B. et al., 2003]. Также показано, что у крыс после ишемического прекондиционирования 10-минутная глобальная транзиторная ишемия способствовала активации каспазы-3, но не смогла увеличить содержание CAD в ядерном матриксе, индуцировать p75<sup>NTR</sup> и вызвать фрагментацию ДНК (т.е. нижележащие процессы, ведущие к клеточной гибели) [Tanaka H. et al., 2004].

Протоонкоген Akt1 является центральным компонентом сигнального пути трансдукции фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Как нижележащий эффектор этого пути, Akt1 способствует выживаемости клеток путем инактивации некоторых проапоптозных белков, включая каспазу-9, Bad (член семейства белков Bcl), факторов транскрипции семейства forkhead (FKHR) и гликоген-синтазы киназа-3 (GSK3) [Stoica B.A. et al., 2003]. Некоторые сведения подтверждают точку зрения о том, что поддержание

фосфорилированной формы Akt1 приводит к нейропротекции [Yamaguchi A. et al., 2001; Yano S. et al., 2001; Nakajima T. et al., 2004]. Тем не менее, данные других исследований показали, что Akt1 может играть роль в выживаемости нейронов только после ишемии, поскольку фосфорилирование Akt1 происходило вскоре после повреждения, и не было продолжительным [Namura S. et al., 2000; Shibata M. et al., 2002].

Существуют данные о том, что гипоксическое воздействие (как в режиме preconditionирования, так и при интермиттирующем влиянии) могут оказывать антиапоптозный эффект. Так, в исследовании Cantagrel S. и др. [2003], показано снижение апоптотических клеток в головном мозге, preconditionированном гипоксическим воздействием, через 24 и 48 часов после экспериментального инсульта. В работе Coimbra-Costa D. и др. Установлено, что 8-кратное 3-часовое воздействие интермиттирующей гипобарической гипоксии на крыс вызвало уменьшение уровня апоптотических белков в астроцитах головного мозга при острой повреждающей гипоксии [2021]. Кроме того, сигнальные пути фактора HIF-1 $\alpha$ , активированные в нейронах коры после гипоксического воздействия, замедляли их гибель посредством p53-зависимых механизмов [Halterman M.W. et al., 1999]. Следует отметить, что 6-часовое воздействие тяжелой гипоксии (7%), в том числе, сопровождающееся сверхэкспрессией HIF-1 $\alpha$  и оксидативным стрессом, вызвало повышение активности цитохрома C, AIF и каспазы-3 в гиппокампе в периоде 24-часовой реоксигенации [Coimbra-Costa D. et al., 2017].

Известно, что шаперон HSP-70, активность которого повышается после гипоксического preconditionирования, ингибирует апоптоз через стимулирование PKR/NF- $\kappa$ B-зависимого пути [Frémont M. et al., 2006]. Кроме того, HSP70 тормозит реакции, способствующие повышению проницаемости митохондриальных мембран и высвобождению цитохрома C, блокируя Bax и повышая экспрессию антиапоптозного фактора Bcl-2 [Stankiewicz A.R. et al., 2005]. Активация митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов предотвращает активацию цитохрома C

и, соответственно, также блокирует каспаза-зависимый путь апоптоза [Liu Y., et al., 1998].

Известно, что толерантность к ишемии связана с ап-регуляцией антиапоптозного онкогена Bcl-2 в поврежденных и неповрежденных нейронах и одновременной сверхэкспрессией HSP-70 [Kelly S. et al., 2002]. Тем не менее, последнее исследование не определяет, являлся ли этот эффект следствием прямого влияния HSP-70 на экспрессию Bcl-2. Наконец, сообщалось, что HSP-70 связывает протеазу апоптоза, активирующую фактор-1 (Araf-1), таким образом предотвращая сборку апоптосомы (Araf-1/цитохром C/активация комплекса каспазы-9) [Beere H.M. et al., 2000; Saleh A. et al., 2000]. Данная гипотеза, тем не менее, была опровергнута Steel R. и др. [2004], которые предположили, что ключевая реакция HSP-70 касемо внутреннего пути апоптоза - ингибирование высвобождения цитохрома C, либо путем прямого воздействия на митохондрию, либо на каком-то этапе обратного потока. Ясно, что Araf-1 не единственная мишень для антиапоптозного действия HSP-70 [Ravagnan L. et al., 2001], а сверхэкспрессия мутировавшего HSP-70, не имеющего АТФ-связывающего домена, который необходим для нейтрализации Araf-1, защищала астроциты от ишемического повреждения [Sun Y. et al., 2006]. Что касается каспазо-независимого апоптоза, HSP-70 нейтрализует митохондриальный эффектор AIF в реакции, независимой от АТФ-связывающего домена HSP-70 [Ravagnan L. et al., 2001]. Интересен тот факт, что отдельные домены HSP-70 вовлечены в предотвращение высвобождения митохондриального AIF и секвестрацию AIF в цитозоле, которая поддерживает гипотезу, что у HSP-70 есть потенциал подавлять клеточную смерть посредством различных механизмов [Ruchalski K. et al., 2006].

В последние годы исследователями из Китая были достаточно подробно раскрыты механизм ингибирования апоптоза при воздействии пермиссивной гиперкапнии в периоде реперфузии, следующей за транзиторной ишемией головного мозга [Zhou Q. et al., 2010; Tao T. et al.,



2013; Tao T. et al., 2014]. Авторы продемонстрировали, что ингаляция  $\text{CO}_2$  в умеренной концентрации ( $\text{Pa}_{\text{CO}_2} = 60\text{-}100$  мм рт. ст.) ингибирует активную форму основной эффекторной каспазы-3, снижает содержание в цитозоле цитохрома C и проапоптозного белка Вах, а также увеличивает концентрацию в митохондриях антиапоптотического белка Bcl-2.

### **1.3. HIF-1 – альтернативные сигнальные механизмы активации и формирования толерантности к гипоксии/ишемии**

В последние десятилетия усиливается интерес к изучению биологических эффектов молекулы HIF-1 $\alpha$  (фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа). Такое внимание, главным образом, обусловлено его ключевой ролью в механизме клеточной и тканевой адаптации к дефициту кислорода и ишемии, чему посвящен ряд работ авторитетных ученых [Semenza G.L., 1999; Adams J.M. et al., 2009; Лукьянова Л.Д., 2019].

Однако, несмотря на традиционные представления о природе сигнального механизма HIF-1 $\alpha$ , базирующегося на кислород-дефицитной аккумуляции, появилась информация об альтернативных механизмах его активации. Такие данные представляют высокий интерес для пересмотра отношения к этому транскрипционному фактору, который регулируется не только гипоксическим стимулом, но и может выступать в качестве мишени для потенцирования защитных эффектов от нескольких адаптогенных триггеров. Это открывает целый ряд перспектив для разработки новых методов и средств увеличения толерантности органов и тканей к ишемии.

HIF-1 $\alpha$  - белок, являющийся  $\alpha$ -субъединицей гетеродимерного транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1). Концентрация и стабильность HIF-1 $\alpha$ , его локализация в клетке, а также активность транскрипции прямо зависят от клеточного уровня кислорода [Semenza G.L. 1999]. Необходимо подчеркнуть, что во многих работах при обсуждении эффектов и молекулярных механизмов фактора HIF-1,

состоящего из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, исследователи часто отождествляют с ним именно  $\alpha$ -субъединицу, которая опосредует большую часть эффектов HIF-1.

Фактор HIF-1 играет важную роль в клеточном ответе на изменение кислородного гомеостаза у млекопитающих [Adams J.M. et al., 2009; Semenza G.L., 2000]. Основной функцией этого белка является индукция транскрипции генов, регулирующих кислородное обеспечение клеток и повышающих их толерантность к гипоксии/ишемии [Adams J.M. et al., 2009; Semenza G.L., 1999]. Число обнаруженных генов-мишеней, активируемых HIF-1, продолжает увеличиваться и включает в себя гены, участвующие в ангиогенезе [Carmeliet P. et al., 1998; Gerber H-P. et al., 1997; Ryan H.E. et al., 1998], энергетическом метаболизме [Iyer N.V. et al., 1998; Ryan H.E. et al., 1998; Wood S.M. et al., 1998; Lee J.W. et al., 2004], эритропоэзе [Jiang B-H. et al., 1996; Hu J. et al., 1998], клеточной пролиферации [Eckhart A.D. et al., 1997; Tazuke S.I. et al., 1998; Feldser D. et al., 1999], ремоделировании сосудов и вазомоторных реакциях [Melillo G. et al., 1995; Palmer L.A. et al., 1998].

Отдельного внимания заслужил факт сверхэкспрессии HIF-1 в процессе канцерогенеза многих злокачественных опухолей [Zhong H. et al., 1999], как по гипоксически-зависимому [Vaupel P. and Mayer A., 2007], так и по не связанному с дефицитом кислорода путям [Krieg M. et al., 2000]. В частности, при мутации гена-супрессора белка фон Гиппеля-Линдау (vHL) в клетках почечной карциномы происходит повышение экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$ .

Кроме того, активированный HIF-1 оказывает провоспалительное и антимикробное действие, посредством модуляции клеточного иммунного ответа [Cramer T. et al., 2003; Oda T. et al., 2006], проявляет проапоптотические эффекты, специфичные для определенного типа клеток [Krick S. et al., 2005; Li L. et al., 2007; Magnon C. et al., 2007] и регулирует эмбриональное развитие через повышение экспрессии VEGF [Carmeliet P. et al., 1998; Ryan H.E. et al., 1998]. При нормоксии Fe<sup>2+</sup>-содержащие пролил-гидроксилазы подвергают субъединицу HIF-1 $\alpha$  процессу гидроксилирования.

Затем белок vHL связывается с комплексом HIF-1 $\alpha$ -ОН, а после убиквитинирования, HIF-1 $\alpha$  подвергается протеасомной деградации [Huang L.E. et al., 1998, Mole D.R. et al., 2001].

При возникновении внутриклеточной гипоксии пролин-гидроксилазы теряют свою активность, что нарушает процесс убиквитин-протеазного разрушения альфа-субъединицы HIF-1 в vHL-опосредованном пути и вызывает аккумуляцию HIF-1 $\alpha$  с последующим его проникновением через нуклеарную мембрану. В ядре альфа-субъединица связывается с бета-субъединицей и приобретает транскрипционную активность в комплексе с коактиватором CBP/p300 [Huang L.E. et al., 1996]. Этот комплекс связывается с элементами ответа на гипоксию (HRE) нескольких генов и индуцирует транскрипцию этих генов.

Активированный гетеродимер HIF-1 связывается с ДНК в сайтах, представленных консенсусной последовательностью 58-RCGTG-38 [Semenza G.L. et al., 1996]. Сайт связывания с HIF-1, присутствующий в HRE, является цис-зоной транскрипционной регуляторной последовательности, которая может быть расположена в 58-фланкирующих, 38-фланкирующих или промежуточных последовательностях генов-мишеней. Наличие интактного сайта связывания HIF-1 необходимо, но недостаточно, чтобы эти элементы опосредовали активацию транскрипции [Semenza G.L. and Wang G.L., 1992; Semenza G.L. et al., 1996].

Наряду с классическим путем активации HIF-1, обусловленным воздействием гипоксии и процессом накопления HIF-1 $\alpha$ , существует целый ряд альтернативных (неканонических) механизмов. Эти сигнальные механизмы затрагивают практически все этапы регуляции активности фактора HIF-1 и его альфа-субъединицы: экспрессия, синтез, трансаktivация, накопление и деградация.

Например, синтез HIF-1 $\alpha$  может реализовываться через O<sub>2</sub>-независимые механизмы, посредством реакций, контролируемых системами MAPK (mitogen activated proteinkinase) и PI3K, имеющих важное значение в

процессах роста, пролиферации и дифференцировки [Лукьянова Л.Д., 2011]. Также, известно, что повышение транскрипционной активности HIF-1 наблюдается под действием окиси азота, ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 и ангиотензина [Yoon D. et al., 2006].

При этом известно, что хелаторы железа, индуцирующие экспрессию HIF-1 $\alpha$  подобно гипоксии [Wang G.L. and Semenza G.L. 1993], также предотвращают и его убиквитинирование [Kallio P.J. et al., 1999]. Доказано, что эти лекарства нарушают ассоциацию vHL и HIF-1 $\alpha$ , тогда как эти белки остаются связанными в клетках подверженных гипоксии [Maxwell P.H. et al., 1999].

В последнее время появились доказательства существования неканонического пути деградации HIF-1, который зависит от шаперон-опосредованной лизосомальной аутофагии [Ferreira J.V. et al., 2013, 2015; Hubbi M.E. et al., 2013, 2014]. Показано, что применение ингибиторов лизосомальной деградации в модели *in vitro* приводит к повышению уровня HIF-1 $\alpha$  и активности HIF-1, а использование активаторов шаперон-опосредованной аутофагии имеет противоположный эффект. При этом HSP70 и LAMP2, аналогичным образом влияют на активность HIF-1, выступая основными компонентами механизма лизосомальной аутофагии. Кроме того, транскрипционный фактор EB (TFEB), главный регулятор лизосомального биогенеза, также ингибирует HIF-1. Таким образом, модуляция активности лизосомальной аутофагии играет существенную роль в активации HIF-1 по независимому от кислорода пути.

Особый интерес для практического применения в терапии ишемических и гипоксических повреждений представляет, на наш взгляд, возможная альтернативная активация HIF-1 углекислым газом в условиях гиперкапнии.

Во многих экспериментальных работах по изучению классического O<sub>2</sub>-зависимого механизма активации HIF-1 исследователи пользуются моделями, которые вызывают в клетке не только дефицит кислорода, но и

неизбежное повышение уровня  $\text{CO}_2$ . Однако, углекислота также является существенным фактором влияния на внутриклеточный гомеостаз и может оказывать независимое от кислорода воздействие на активность HIF-1.

Поскольку продукция диоксида углерода в организме тесно связана с потреблением кислорода, существует обратная зависимость между уровнями этих газов в клетках и тканях. Повышенная продукция  $\text{CO}_2$ , возникающая при гипоксии, компенсируется за счет гипервентиляции. На тканевом и клеточном уровне устойчивая гиперкапния формируется при угнетении этого механизма и/или нарушении микроциркуляции, сопровождаясь активацией анаэробного гликолиза [Куликов В.П. и др., 2017]. Гипоксия и гиперкапния обычно сопутствуют респираторным расстройствам, таким как синдром ночного апноэ, пневмония и хроническая обструктивная болезнь легких [Budweiser S. et al., 2008; Krieger J., et al., 1989], а также заболеваниям, сопровождающимся нарушениями кровообращения и микроциркуляции [Kwasiborski P.J., 2012; Back S.A., 2015].

Существуют работы, показывающие стимулирующее влияние гиперкапнии на HIF-1 $\alpha$ . Так, в 2009 году было установлено, что в головном мозге после введения ацетазоламида происходит увеличение концентрации HIF-1 $\alpha$  [Xu J. et al., 2009]. Авторы позиционировали это как прямой эффект используемого средства, хотя основной механизм его действия заключается в блокировании карбоангидразы с последующим повышением уровня  $\text{CO}_2$ , который гипотетически также мог быть причиной обнаруженного эффекта.

Benderro GF и др. [2013] оценивали уровень HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$  в коре головного мозга в ходе 3-недельного воздействия хронической гипероксии и гиперкапнии, отмечая их повышенное накопление, но в сопряжении со снижением плотности капиллярного русла и факторов роста сосудов.

Важно отметить, что есть публикации, в которых сделаны противоположные заключения о влиянии гиперкапнии на уровень HIF-1 $\alpha$ . Так, в экспериментальном исследовании Selfridge A.C и др. [2016] гиперкапния подавляла стабильность белка HIF и экспрессию его гена-

мишени *in vivo* и *in vitro*, что ассоциировалось с прямым снижением внутриклеточного pH. А в исследовании Raeis V. B. и др. [2010] выявлено отсутствие корреляции между повышением экспрессии HIF-1 $\alpha$  и уровнем CO<sub>2</sub> после 24-часовой экспозиции кардиомиоцитов в условиях гиперкапнической гипоксии *in vitro*. Однако, в указанных работах супрессия белка HIF была обнаружена при использовании модели с высоким уровнем гиперкапнии (FetCO<sub>2</sub>=10%) и/или длительным воздействием (4-6 часов и 24 часа), что могло вызвать дезадаптивный эффект.

#### **1.4. Гипоксическая модуляция адаптационных систем, связанных с A1-аденозиновыми рецепторами и АТФ-зависимыми K<sup>+</sup>-каналами**

Высокое значение для повышения толерантности головного мозга к ишемии при воздействии гипоксии имеет аденозин [Kulinski V.I. et al., 2006; Martire A. et al., 2019]. Он активирует митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы и снижает передачу синаптического возбуждения, сдвигая равновесие ЦНС в сторону торможения [Ilie A. et al., 2006]. При этом активация аденозиновых A1-рецепторов полностью воспроизводит эффект прекондиционирования [Yellon D.M. and Downey J.M., 2003]. Эти сигнальные элементы имеют существенное значение в протекторном механизме прекондиционирования и при формировании толерантности головного мозга к ишемии.

Аденозин, как один из ведущих клеточных триггеров, вместе с одноименными рецепторами играют важную роль в формировании толерантности головного мозга к ишемии [Heurteaux C. et al., 1995]. Ишемическое прекондиционирование повышает восприимчивость A1-рецепторов к аденозину в СА1 регионе гиппокампа у крыс на 1, 3 и 7 сутки после эпизода нейропротекции, т.е. в рамках временного окна толерантности к ишемии [Zhou A.M. et al., 2004]. Однако, подобное изменение не обнаруживалось у мышей после сублетальной экспозиции с 3-нитропропионовой кислотой [Von Arnim C.A. et al., 2000], и связано ли

повышение уровня A1 рецепторов с улучшением функции все еще нужно выяснить.

Так как активация A1 рецепторов преимущественно снижает передачу возбуждения через синапс в ЦНС [Dunwiddie T.V. and Masino S.A., 2000], они должны апрегулироваться в толерантном мозге. Затем аденозин высвобождается либо как нейромодулятор, либо как продукт распада АТФ, и может влиять на ГАМК-эргические процессы, сдвигая равновесие между возбуждением и торможением в сторону последнего [Pie A. et al., 2006]. Важно заметить, что при отсутствии прекондиционирования, эндогенная активация A1 рецепторов приводит к подавлению синаптической активности во время ишемической атаки и в СА1 регионе гиппокампа и в коре [Fowler J.C. et al., 2003]. Это показывает, что опосредованная через A1 рецептор блокировка синаптической активности происходит вследствие недостатка энергоснабжения, что эффективно и в неадаптированном к ишемии мозге.

Гипоксическое прекондиционирование оказывает на аденозин и A1 рецепторы эффекты, аналогичные ишемическому прекондиционированию. Например, показано, что воздействие 4 циклов гипоксии в режиме прекондиционирования на мышей вызывает в СА1 регионе гиппокампа, мосте и продолговатом мозге сохраняет плотность A1 рецепторов и повышает их сродство к аденозину, что приводит к нейропротекторному эффекту [Zhang W.L. and Lu G.W., 1999], а блокада циклопениладенозином A1 рецепторов снимает защитный эффект как введения аденозина, так и гипоксического прекондиционирования при глобальной ишемии головного мозга [Минакина Л.Н. и др, 2018]. Эти данные подтверждаются экспериментами с аноксическим воздействием на изолированные срезы гиппокампа в режиме прекондиционирования [Perez-Pinzon M.A. et al., 1996; Perez-Pinzon M.A., 2007]. Также установлено, что снижение уровня внеклеточного аденозина приводит к потере индуцированной гипоксией нейропротекции после интермиттирующего воздействия гипоксии, что прямо связано с HIF-регулируемой экспрессией генов-мишеней [Cui M. et al., 2013].

Активация митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов вызывает защитный эффект сходный с ишемическим preconditionированием, а их ингибирование, напротив, усиливает последствия ишемии [Ahmet I. et al., 2004]. Локализованные во внутренней мембране митохондрий митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы блокируются АТФ, АДФ, длинной цепью сложного эфира КоА и 5-гидроксидеканоатом, и их блокада АТФ снимается ГТФ, ГДФ, кромакалимом, диазоксидом и другими активаторами K<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов [Obrenovitch T.P., 2008]. Предполагалось, что первостепенная роль митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов заключается в регуляции объема митохондриального матрикса, который увеличивается с открытием митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов (либо предотвращается его уменьшение, вызванное слабой деполяризацией митохондрий), но физиологические последствия открытия митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов включают в себя также респираторную стимуляцию и подщелачивание матрикса [Costa A.D. et al., 2006]. Роль митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов в кардиопротекции подтверждена сведениями о том, что активация этих каналов влияет и на индукторы, и на эффекторы толерантности сердца к ишемии [Oldenburg O. et al., 2002]. Однако, в отличие от сердца, митохондрии клеток головного мозга содержат митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов в 6-7 раз больше, а регулируются одними и теми же лигандами с кардиомиоцитами [Bajgar R. et al., 2001].

Открытие митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов является важным, сигнальным механизмом нейропротекции. На это указывают следующие данные:

- Селективный блокатор митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов 5-гидроксидеканоат, введенный крысам перед preconditionированием 3-нитропропионовой кислотой, блокирует развитие толерантности к фокальной церебральной ишемии [Horiguchi T. et al., 2003], подтверждая тем самым и проясняя предыдущие результаты, полученные с неселективным блокатором митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов глибенкламидом [Heurteaux C. et al., 1995];
- Предварительное введение активаторов митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов (дiazоксид или BMS-191095) уменьшает гибель нейронов, вызванную



кратковременной фокальной церебральной ишемией или венозной ишемией у крыс [Mayanagi K. et al., 2007; Nakagawa I. et al., 2005; Shimizu K. et al., 2002];

- В модели ОСМА на мышах диазоксид заметно снижает повреждение коры и уменьшает апоптоз нейронов в периинфарктной зоне, а этот церебропротективный эффект нивелируется действием 5-гидроксидеканоатом [Liu D. et al., 2002];

- Диазоксид также защищает нейроны гиппокампа и мозжечка от апоптоза, спровоцированного ставроспорином, гипоксией или оксидативным стрессом [Liu D. et al., 2002, Teshima Y. et al., 2003];

- Не смотря на то, что  $K^+_{\text{АТФ}}$ -каналы присутствуют также и на поверхности клеток (включая нейроны), а некоторые экспериментальные работы доказывают их участие в цитопротекции, центральная роль именно митохондриального типа данных каналов является признанной [Wang L. et al., 2011; Ortega F.J. et al., 2012]. Это подтверждается, к примеру тем, что отсроченное ишемическое прекондиционирование гиппокампальных нейронов не менялось у нокаутных мышей с недостатком клеточных  $K^+_{\text{АТФ}}$ -каналов SUR1 типа [Muñoz A. et al., 2003];

Наряду с этим, конечным эффектором в феномене гипоксического прекондиционирования считаются мито $K^+_{\text{АТФ}}$ -каналы [Mayanagi K. et al., 2007]. Интермиттирующая гипоксия также вызывает защитный эффект через активацию мито $K^+_{\text{АТФ}}$ -каналов на модели изолированного миокарда [Xie Y. et al., 2004] и у адаптированных к высотной гипоксии крыс [Asemu G. et al., 1999]. Особенно важными в этом отношении являются следующие работы: Zhang S. и др. [2016], где показано повышение экспрессии и активности SUR1 и  $K_{\text{ir}}6.2$  (субъединицы мито $K^+_{\text{АТФ}}$ -канала) в образцах ишемизированного головного мозга крыс после длительной интермиттирующей гипоксии, которые устранялись введением блокатора 5-гидроксидеканоата; Sun H.S. и др. [2015], в которой установлено, что гипоксическое прекондиционирование, выполненное до гипоксически-

ишемического повреждения у постнатальных 7-дневных мышей, индуцировало повышение уровня белка изоформы  $K_{ir6.2}$  и усиление текущей активности мито $K^+_{ATФ}$ -каналов. Кроме того, интересным фактом является то, что под влиянием гиперкапнии происходит активация  $Ca^{2+}$ -активируемых и АТФ-зависимых калиевых каналов [Lindauer U. et al., 2003; Smith C.O. et al., 2017].

Важно упомянуть, о том, что по мнению Yabe K. и др. [1995] для preconditionированного миокарда ни активация  $A_1$  рецепторов, ни открытие АТФ-зависимых калиевых каналов не участвуют в протекторном механизме. Однако, в указанной работе существует ряд ограничений для формулировки категорических выводов, поэтому не стоит прямо экстраполировать эти результаты на интерпретацию в механизме нейропротекции в головном мозге.

### **1.5. Патопфизиология и метаболизм церебрального эндотелия в условиях гипоксии/ишемии**

ГЭБ — сложная и неоднородная система головного мозга с многоуровневым избирательным транспортом, необходимая для поддержки регуляции и защиты ЦНС. Структурную основу ГЭБ составляют эндотелиальные клетки, астроциты и перициты. Эндотелиальные клетки церебральных сосудов связаны между собой плотными контактами. Это имеет важное значение для реализации главной функции ГЭБ – поддержания гомеостаза мозга и защиты нервной ткани от циркулирующих в крови токсинов, микроорганизмов, гуморальных и клеточных факторов иммунной системы, воспринимающих ткань мозга как чужеродную [Ballabh P. et al., 2014; Tran K.A. et al., 2016].

Исследователи подчеркивают роль дисфункции ГЭБ при развитии различных неврологических заболеваний. Например, при посттравматическом исследовании резецированной церебральной ткани и мозга у пациентов с фармакочувствительной и резистентной эпилепсией [Liu

J.Y. et al., 2012] выявлено, что имеется четко локализованная избыточная экспрессия Р-гликопротеина в эпилептогенном гиппокампе у больных с лекарственно устойчивой эпилепсией. Авторы считают, что на фоне хронического течения эпилепсии развивается воспаление в церебральной сосудистой сети, повышается проницаемость ГЭБ и экспрессия Р-гликопротеина.

Установлена многоуровневая система химической регуляции гомеостаза в ткани головного мозга, повышающая защиту нейронов от стресса и повреждения, а также роль многочисленных ростовых и нейротрофических факторов в репаративных процессах, во многом определяющих исходы и прогноз гипоксического поражения мозга [Моргун А.В. и др., 2013; Кувачева Н.В. и др., 2013].

Отмечается, что повышение проницаемости ГЭБ в условиях хронической гипоксии/ишемии мозга в пери- и неонатальном периоде может выступать одним из факторов прогрессирования нейродегенеративных процессов, возникающих из-за поступления в периферический кровоток забарьерных антигенов с последующим иммунным ответом и дисфункцией протеолитических и нейромедиаторных систем [Чехонин В.П. и др., 2003, 2004].

Нарушение целостности и проницаемости ГЭБ является важным элементом в патогенезе гипоксического/ишемического и инфекционного поражения головного мозга [Abbott N.J. et al., 2017]. Однако, особенности функционирования ГЭБ при нарушениях развития головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях изучены существенно меньше. При этом исследование молекулярных механизмов этих особенностей выступает не только важным шагом в понимании патогенеза заболеваний, но и перспективным направлением для повышения эффективности фармакотерапии. Так, недавно появились убедительные экспериментальные свидетельства о нарушении структуры тесных контактов и дизрегуляции белков-транспортеров ГЭБ при таких нарушениях развития головного мозга,

как аутизм, шизофрения, эпилепсия, а также нейродегенеративных состояниях (болезни Альцгеймера и Паркинсона) [Chalbot S. et al., 2010].

Эпигенетические факторы, обуславливающие метилирование ДНК и ремоделирование гистонов, важны для нормального развития мозга в онтогенезе [Ванюшин Б.Ф., 2006]. Они подвержены регулирующему влиянию гипоксического стимула, который может вызвать как повреждающий эффект, так и эффект прекондиционирования [Нетребенко О.К. и др., 2020]. Если стимул является избыточным и/или длительным, то это вызывает наступление гипоксически-ишемическое поражение мозга и определяет будущие неврологические расстройства.

Показано, что блокирование гистон-деацетилазы в культуре микроглии оказывает защитное действие на олигодендроциты после экспериментальной гипоксии-ишемии [Meng Q. et al., 2020]. При этом фракция M1 подавляет активность олигодендроцитов, а M2 ее усиливает и позволяет снижать экспрессию провоспалительных факторов и снижать экспрессию противовоспалительных цитокинов. Метилирование и деметилирование происходит при участии большого количества ферментов, в т.ч. гистонацетилтрансфераз, деацетилазов, гистоновых метилтрансфераз и деметилаз [Jambhekar et al., 2019; Yao B. and Jin P., 2014]. Эти процессы способствуют модулированию транскрипции в ответ на эндогенные и экзогенные факторы, такие как гипоксия и воспаление [Чурилова А.В. и др., 2018]. В моделях *in vivo* показано, что при экспериментальной гипоксии/ишемии в неонатальном периоде возрастает экспрессия каспазы-3, снижается экспрессия синапсина и ингибируется метилирование гистонов H3K4me2/-me3 и H3K27me2/-me3, что вызывает индукцию нейронального апоптоза в гиппокампе [Pierre W.C. et al., 2020; Deniz B.F. et al., 2021].

В настоящее время наиболее существенными факторами эпигенетического влияния являются микроРНК (Mir) - небольшие некодирующие РНК, обеспечивающие посттранскрипционную модуляцию экспрессии генов [Tornabene E. et al., 2019]. Эти молекулы играют важную

роль в онтогенетическом развитии мозга и патогенезе неврологических заболеваний, в том числе ишемического инсульта [Rink C. and Khanna S., 2017]. При этом ГЭБ рассматривается в качестве мишени для патогенетических факторов [Shen G. and Ma Q., 2020]. При гипоксии-ишемии нарушение структуры и организации этих белков в наружной мембране эндотелиальных клеток обуславливает нарушение проницаемости церебрального эндотелия [Ek C.J. et al., 2015]. Повышенная адгезия иммунных клеток к поврежденному эндотелию, в том числе, обуславливает их инфильтрацию в окружающую ткань [Cerutti C. and Ridley A.J., 2017].

Доказано, что деградация ГЭБ повышает риск раннего инсульта, а ее блокирование обеспечивает защиту паренхимы головного мозга [Shi Y. et al., 2017]. Деградация белков плотных контактов, или белков клеточной адгезии, под действием MMP напрямую регулируется микроРНК. Mir-539 напрямую ингибирует экспрессию MMP-9 и защищает эндотелиальные клетки от экспериментальной ишемии, предотвращая повышение проницаемости ГЭБ [Fan F. et al., 2018]. Mir-143 активируется после ишемического инсульта на моделях человека и животных [Bai Y. et al., 2018; Wang Y. et al., 2018].

Некоторые микроРНК могут защищать целостность ГЭБ за счет снижения адгезии иммунных клеток и экспрессии провоспалительных цитокинов. Например, Mir-210 активирует экспрессию ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и хемокиновые лиганды CCL1 и CCL2, связанные с провоспалительным ответом в модели ишемического инсульта у мышей [Huang L. et al., 2018], а сверхэкспрессия Mir-126-3p и -5p в ишемизированном мозге мышей подавляет провоспалительные цитокины и молекулы адгезии, сохраняя целостность церебрального эндотелия и снижает негативные последствия после перенесенного инсульта [Pan J. et al., 2020; Bernstein D.L. et al., 2020]. Напротив, Mir-34a активируется в эндотелиальных клетках после эпизода острой гипоксии-ишемии, что отрицательно влияет на функцию митохондрий в эндотелиоцитах, воздействуя на цитохром C. При этом нокаутирование Mir-34a снижает проницаемость ГЭБ, выраженность

нарушений плотных межклеточных контактов и улучшает исходы инсульта [Bukeirat M. et al., 2016; Hu H. et al., 2020].

Mir-26b ингибирует аутофагию и выживание эндотелиоцитов при экспериментальной гипоксии/ишемии *in vitro*, а длинная некодирующая РНК MALAT1, связывая Mir-26b, оказывает обратное действие [Li Z. et al., 2017]. МикроРНК Mir-15a активируется в церебральном эндотелии мышей после острого кислородно-глюкозного голодания и вызывает гибель клеток и ингибируется через активацию  $\delta$ -рецептора, под воздействием пролифератора пероксисом PPARs, который выступает потенциальным нейропротектором при ишемическом инсульте [Yin K.J. et al., 2018]. Главное значение в сохранении проницаемости ГЭБ принадлежит эндотелию и, в меньшей степени, перицитам. Показано, что при гипоксически-ишемическом поражении перициты отделяются и мигрируют от базальной мембраны, способствуя повышению проницаемости. Данный процесс индуцируется под действием Mir-149-5p [Wan Y. et al., 2018].

Mir-210 признана одним из важнейших регуляторов неонатальной гипоксии-ишемии [Chan Y.C. et al., 2012]. Эта микроРНК активирована при неонатальной гипотрофии, а острая гипоксия-ишемия приводит к усилению сверхэкспрессии Mir-210, что увеличивает проницаемость ГЭБ за счет ингибирования экспрессии окклюдина и  $\beta$ -катенина [Ma Q. et al., 2017]. Сообщалось, что mir-210 проявляет широкий спектр биологической активности, включающей митохондриальный обмен и дифференцировку клеток [Zaccagnini G. et al., 2021]. В норме сверхэкспрессия mir-210 способствует ангиогенезу и нейрогенезу [Ma Q. et al., 2019]. Она обуславливает защитный эффект при ишемическом инсульте и способствует накоплению нервных клеток-предшественников вокруг перинфарктной области [Jiang Y. et al., 2015; Meng Z.Y. et al., 2018]. Другие микроРНК (mir-21, mir-374a, mir-424, mir-199a и mir-20b), также могут играть роль в патогенезе гипоксически-ишемического поражения головного мозга [Garberg

H.T. et al., 2017; Whitehead C.L. et al., 2018; Ge X. et al., 2015; Yao X. et al., 2018].

ГЭБ анатомически определяется тесными соединениями между соседними эндотелиальными клетками, выстилающими просвет микрососудов мозга, но в структуру ГЭБ также входят астроциты, перициты, нейроны и внеклеточный матрикс [Салмина А.Б. и др., 2014]. Последний представляет собой базальную мембрану, лежащую в основе сосудистой сети, и ее нарушения тесно связаны с повышенной проницаемостью ГЭБ в патологическом состоянии. При этом нарушение целостности ГЭБ с последующим вазогенным отеком является ранним признаком ишемического повреждения мозга, и выступает ранним прогностическим фактором неблагоприятного исхода [Siegenthaler J.A. et al., 2013].

Несколько исследований показали, что толерантность к ишемии способствует сохранности ГЭБ и сокращает образование отека во время контрольной ишемии. Препрекондиционирование, вызванное 15-минутной окклюзией средней мозговой артерии и проведенное за три дня до тестовой ишемии у крыс, сокращало и нарушение целостности ГЭБ и отек в перинфарктной зоне, но не в ядре ишемии, что было измерено после 24-часовой окклюзии [Masada T. et al., 2013]. Позднее это было подтверждено Zhang и соавторами [Zhang FY et al, 2006] во время эксперимента, когда молодых крыс подвергали 2-часовой гипоксии/ишемии, транссудация вбммуноглобулинов класса G, как признак нарушения целостности ГЭБ, была связана с ранним повреждением нейронов, и оба этих неблагоприятных эффекта значительно ослаблялись после гипертермического препрекондиционирования [Ikeda T. et al., 1999]. И опять же, сложно определить, приводила ли сохранность целостности ГЭБ к уменьшению ишемического повреждения или являлась его последствием. С механистической точки зрения совершенно ясно, что уменьшение воспалительной реактивности головного мозга, вероятно, способствует сохранению целостности ГЭБ [Салмина А.Б. и др., 2021; Gang L. et al., 2011; Huang L. et al., 2018]. Тем не

менее, сохранение целостности ГЭБ может быть главной чертой толерантности к ишемии, принимая во внимание взаимодействие между поврежденной/уязвимой тканью и циркулирующей воспалительных клеток во время рециркуляции.

Известно, что ММП, в особенности ММП-9, разрушают нейроваскулярный матрикс в результате реперфузии, приводя, таким образом, к разрушению ГЭБ [Maruoka N. et al., 2012; Yang Y. et al., 2017]. Было показано, что нарушение целостности ГЭБ, наряду с экспрессией ММП-9 уменьшались после экспериментальной ишемии у крыс, которой предшествовало ишемическое прекондиционирование [Zhao B.Q. et al., 2006], что связывается авторами с влиянием белка теплового шока с молекулярной массой 70 килодальтон (HSP70), сверхэкспрессия которого подавляет ММП-9.

Адгезионные молекулы, выделяемые клетками эндотелия (например, ICAM-1), опосредуют прочное прилипание лейкоцитов к выстилке сосудов и, также запускают сигнальные каскады, которые способствуют увеличению проницаемости ГЭБ и лейкоцитарной инфильтрации [Tohidpour A. et al., 2017]. Повышенная экспрессия ICAM-1 клетками церебрального эндотелия наблюдалась во время ишемии/реперфузии в моделях *in vivo* и *in vitro* [Frijns et al., 2012; Zhang W. et al., 1999]. Прекондиционирование в культуре эндотелиальных клеток сокращало их ответную воспалительную реакцию и полностью блокировало повышенные уровни ICAM-1, индуцируемые посредством ФНО- $\alpha$  [Zahler S. et al., 2000]. Данные, подтверждающие эти результаты, были получены с гипоксическим прекондиционированием, которое также ингибировало адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам, вызванную гипоксией/реоксигенацией [Zhou et al., 2013].

Регуляция метаболизма в клетках, входящих в структуру ГЭБ, подвержена как гуморальным факторам, присутствующим в периферическом кровотоке, так и молекулярно-клеточным сигнальным системам, влияющим



на церебральный эндотелий [Хилажева Е.Д. и др., 2017]. Особенно важным это становится в условиях гипоксии и ишемии тканей головного мозга.

Важная роль в метаболическом регулировании церебрального эндотелия отведена продукции и межклеточному транспорту лактата [Verdegem D. et al., 2014], а также его утилизации из окружающей ткани и системного кровотока, что имеет место при развитии ишемического повреждения [Pavlidis S. et al., 2009]. При этом продукция лактата тесно связана с редокс-состоянием клеток, в частности соотношением НАД<sup>+</sup>/НАДН в митохондриях [Bergersen L.H. and Gjedde A., 2012]. Кроме того, в условиях высокой потребности в энергопродукции, сформированной кислородно-глюкозной депривацией, активируются процессы митохондриального биогенеза [Vásquez-Trincado C. et al., 2016]. Этот процесс стимулируется  $\gamma$ -ко-активатором 1 $\alpha$ -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PGC-1 $\alpha$ ) и АМФ-активируемой протеинкиназой (AMPK) [Jornayvaz F.R. and Shulman G.I., 2010], а ингибируется HIF-1 [Lin X.W. et al., 2016].

Многие события при межклеточных взаимодействиях на уровне ГЭБ определяются активностью транскрипционного фактора HIF-1, опосредующего ответ клеток на гипоксию [Ruzaeva V.A. et al., 2016]. Известно, что HIF-1-индуцируемые реакции энергетического обмена находят свое отражение в изменении процессов гликолиза, аккумуляции лактата и изменении характера нейрон-астроглиального метаболического сопряжения [Patten D.A. et al., 2010]. В числе генов, контролируемых HIF-1, входят гены, кодирующие фактор 1 из стромальных клеток (SDF-1), ферменты гликолиза, переносчики глюкозы и лактата, что необходимо для обеспечения функционирования клеток в условиях острой или хронической гипоксии [Siegenthaler J.A. et al., 2013].

### **1.6. Перспективы для оптимизации режима воздействия и повышения защитной эффективности гиперкапнической гипоксии**

Подробно описана сравнительная эффективность гипоксических тренировок при различной продолжительности курса воздействий [Лукьянова Л.Д. и др., 2009, 2019]. Многие исследования гипоксических тренировок посвящены интервальному воздействию с периодами реоксигенации [Neckar J. et al., 2002; Shatilo V.B. et al., 2008; Goryacheva A.V. et al., 2010]. Недостатком описанных воздействий является необходимость длительной экспозиции и большого количества сеансов в рамках одного курса, как правило, 1–15-часовое гипоксическое воздействие с кратностью сеансов не менее 7 раз [Лукьянова Л.Д. и др., 2009; Neckar J. et al., 2002; Chen W.J. et al., 2005; Yang C.C. et al., 2009]. При этом для гиперкапнически-гипоксического воздействия показано, что достижение протекторной эффективности наблюдается уже после 3-кратного гиперкапнически-гипоксического воздействия, а увеличение кратности воздействий сопровождается пропорциональным увеличением резистентности [Tregub R.P. et al., 2013]. Однако, несмотря на высокую эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии, по сравнению с изолированной гипоксией остаются открытыми вопросы об оптимальной продолжительности тренировочной экспозиции, наличии зависимости эффекта от интервалов реоксигенации и кратности применения в течение суток. Вместе с тем, комбинирование респираторных гиперкапнически-гипоксических воздействий с фармакологическими модуляторами сигнальных путей нейро-/кардио-/цитопротекции представляется наиболее перспективной терапевтической стратегией. Дополнительная эффективность может быть умеренной, аддитивной или даже синергетической в некоторых случаях [Majid A. et al., 2013].

Основываясь на выраженных и глубоких регуляторных эффектах HIF-1 $\alpha$ , модуляция его активности (в том числе, фармакологическая) может представлять терапевтический интерес при лечении пациентов с сердечно-

сосудистыми заболеваниями, ишемическими повреждениями и злокачественными новообразованиями [Лукьянова Л.Д., 2011, 2019].

Перспективным для использования в качестве средства модуляции эффектов HIF-1 $\alpha$  представляется сочетание воздействий, влияющих как на традиционный, так и на альтернативный механизм его активации [Левченкова О.С. и Новиков В.Е., 2014; Zhang, Y.B. et al., 2014]. Интересным в этом отношении является потенцирование гиперкапнически-гипоксических респираторных воздействий с фармакологическими средствами, стимулирующих неканонические пути активации HIF-1 (хелаторы железа, блокаторы карбоангидразы, селективные ингибиторы лизосомальной аутофагии и активаторы MAPK и PI3K и т.д.). При этом комбинация средств, повышающих активность HIF-1 $\alpha$ , с респираторными воздействиями и лекарствами, влияющими на другие адаптогенные механизмы, может быть наиболее эффективной. Это подтверждается увеличением кардиопротекторного эффекта при сочетании гипоксического preconditionирования с антагонистами и активаторами опиоидных рецепторов [Maslov L.N. et al., 2009; Lassoukova T.V. and Maslov L.N., 2012] и протекторного эффекта гиперкапнически-гипоксических воздействий при сочетании с активаторами АТФ-зависимых калиевых каналов и аденозиновых рецепторов [Трегуб П.П. и др., 2014].

Существует значительный интерес к изучению плеiotропных нейропротекторных методов лечения инсульта с благоприятным воздействием на более чем один механизм повреждения, связанного с инсультом. Некоторые из этих методов лечения были обнаружены только недавно и все еще находятся на ранних стадиях исследования, а другие, уже стали предметом детального изучения и показывают большие перспективы для лечения инсульта: лиганд ITH33/IQM9.21, имеющий антиоксидантный и антиэксайтотоксический эффекты [Lorrio S. et al. 2013]; антиоксидант TAT-M9 с антиапоптотическим действием [Guo F. et al. 2013]; глицирризиновая кислота, обладающая противовоспалительным и антиоксидантным эффектом

[Kim S-W. et al. 2012]; сульфокислота таурин, оказывающая антиэксайтотоксическое, аниоксидантное и антиапоптотическое влияние на нервные клетки при экспериментальном инсульте [Gharibani P.M. et al. 2013]; ингибитор ангиотензин-превращающего фермента с антиоксидантным эффектом - эналаприла [Гацура С.В. и Зинчук В.В., 2004].

На основании данных о нейропротекторных механизмах, реализуемых посредством модулирования функционального состояния ГЭБ, можно выделить сигнальные пути, дополнительная стимуляция которых имеет потенциал для усиления защитных эффектов при сочетании с респираторными гиперкапнически-гипоксическими воздействиями. Очевидно, что высоким потенциалом для потенцирования эффективности гиперкапнической гипоксии воздействий могут обладать лекарственные средства, обладающие антиоксидантной эффективностью и оказывать эндотелиопротективный эффект [Шахмарданова С.А. и др, 2016]. Например, аскорбиновая кислота (витамин С) и  $\alpha$ -токоферол (витамин Е) [Ashor A.W. et al., 2015], ретинол (витамин А) [Brüll V. et al., 2017] и S-нитрозоглутатион [Khan M. et al., 2012].

Перспективным направлением, с точки зрения положительного влияния на гемореологию крови, провоспалительные факторы и нормализацию показателей NO-продуцирующей системы при сочетании с гиперкапнической гипоксией, является использование производных 3-оксипиридина [Смирнова К.В. и Гильдилов Д.И., 2021]. У этих соединений обнаружено свойство восстанавливать NO-продуцирующую функцию эндотелия, улучшать эндотелий-зависимую и эндотелий-независимую вазодилатацию в клинических условиях. Так, на фоне гипотензивного и кардиопротекторного свойств, этилметилгидроксипиридина сукцинат в сочетании с гиперкапнической гипоксией оказывает выраженное позитивное влияние на гемореологию [Москаленко С.В. и др., 2018]. Кроме того, эти лекарственные средства оказывают мощное мембранопротекторное действие, повышают активность антиоксидантных ферментов, поддерживают процесс

окислительного фосфорилирования в условиях гипоксии и активируют энергопродукцию в митохондриях в результате увеличения доставки и потребления клетками сукцината [Хлебодаров Ф.Е. и др., 2009; Семененков И.И. и Пристром М.С., 2019]. Эффективное потенцирование может также вызывать пролонгация эффекта гиперкапнии при блокировании карбоангидразы [Bejaoui M. et al., 2015].

Высокий потенциал для усиления защитных эффектов гиперкапнической гипоксии имеет ингибирование JNK при использовании синтетических лекарственных средств (например, IQ-1), которые оказывают выраженный кардио-/нейропротекторный эффект [Шведова М.В. и др., 2016; Plotnikov M.B. et al., 2020]. Принимая во внимание, что гиперкапническая гипоксия активирует сигнальные пути нейропротекции, не связанные напрямую с ингибированием пируватдегидрогеназы, то можно ожидать, что комбинация респираторного воздействия с лекарственными средствами-ингибиторами JNK будет обладать большим нейропротекторным потенциалом, чем их изолированное применение. Кроме того, на основании данных о том, что JNK репрограммирует метаболизм митохондрий на гликолитическую продукцию лактата посредством фосфорилирования пируватдегидрогеназы (PDH) [Zhou Q. et al., 2008], можно предположить, что нейропротекторные свойства ингибиторов JNK могут быть опосредованы повышением активности PDH и изменением уровня НАД<sup>+</sup> в клетках эндотелия ГЭБ с модуляцией его проницаемости.

### **1.7. Терапевтический потенциал и возможности для клинического применения гиперкапнически-гипоксических тренировок**

Использование гиперкапнически-гипоксических тренировок имеет, в первую очередь, адаптогенный и профилактический потенциал у здоровых добровольцев. Доказано, что при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии в течение месяца у здоровых мужчин увеличивается сосудистое сопротивление в головном мозге, снижается реактивность церебральных

сосудов на гиперкапнию и легкую физическую нагрузку, увеличивается коллатеральный резерв и скорость ауторегуляции мозгового кровообращения [Беспалов А.Г. и др., 2004; Kulikov V.P. et al., 2009]. Была проведена оценка оптимизирующего влияния тренировок с гиперкапнической гипоксией на системную гемодинамику у практически здоровых лиц с разными типами регуляции кровообращения. Показано, что оптимизирующие эффекты гиперкапнически-гипоксического воздействия на сердечно-сосудистую систему более выражены у лиц с гипокинетическим типом регуляции кровообращения по сравнению с испытуемыми с эу- и гиперкинетическим типами [Хананашвили Я.А. и Халявкина И.О., 2014].

В ряде клинических исследований была показана эффективность гиперкапнически-гипоксических тренировок при лечении ряда неврологических нарушений и заболеваний. Особенно примечательно, что наибольшая эффективность гиперкапнической гипоксии была продемонстрирована при использовании гиперкапнической гипоксии у пациентов в детском возрасте для улучшения памяти, внимания, снижения агрессивности и депрессивности, а так же в лечении неврозов [Суховершин А.В. и др., 2009], нарушений речи [Шилов С.Н. и др., 2013], малой мозговой дисфункции [Чудимов В.Ф. и др., 2010; Старцев А.А., 2014; Муллер Т.А. и др., 2015] и диабетической полинейропатии у детей [Смирнов К.В. и др., 2018]. Такая эффективность может быть связана с высокой нейропластичностью и адаптогенным потенциалом у детей.

Безусловно, перспективным направлением для применения гиперкапнически-гипоксических дыхательных тренировок остается реабилитация пациентов с ишемией головного мозга. К примеру, показано, что повышение устойчивости головного мозга к ишемии можно достигнуть после реабилитации пациентов с хронической ишемией мозга 1 степени и сопутствующим стенозом ветвей дуги аорты с использованием дыхательного тренажера и постепенного нарастания гиперкапнической гипоксии. Отмеченная положительная клиническая эффективность проведенной

реабилитации в сочетании с регрессом и уменьшением степени выраженности симптомов хронической ишемии мозга приводят к значимому улучшению когнитивных функций и качества жизни пациентов [Косарев М.О. и др. 2021].

Интересно, что курс респираторных тренировок с гиперкапнической гипоксией находит применение не только в восстановительной медицине и неврологии, но также в педиатрической, урологической и стоматологической практике. Например, у группы детей возрастом 5 – 16 лет с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря гиперкапнически-гипоксические тренировки меняли функциональную активность мозга, оптимизируя нейроэнергообмен, обеспечивая полноценность сна и подконтрольность функций мочеиспускания [Текутьева Н.А. и др., 2021]. Ряд клинических наблюдений об эффективности дыхательных тренировок с гиперкапнической гипоксией можно объяснить ее положительным влиянием на показатели микроциркуляции в органах и тканях. Так, отмечено, что применение 10-кратного курса гиперкапнически-гипоксических воздействий на дыхательном тренажере у мужчин в возрасте от 20 до 50 лет улучшало артериальный кровоток и перфузию предстательной железы при хроническом абактериального простатите [Неймарк А.И. и Максимова С.С., 2016]. Также, имеются данные, что использование курса из 30 сеансов гиперкапнической гипоксии после процедуры сиадолитэктомии оказало благоприятное воздействие на параметры микрогемоциркуляции и оксигенации слюнных желез [Семенникова Н.В. и др., 2019], а 14 сеансов повысили качество жизни детей с хроническим эрозивным гастродуоденитом [Печкина К.Г. и др., 2011]. Кроме того, по результатам 6-месячного наблюдения девочки в возрасте 6 лет с диагнозом бронхиальная астма была выявлена положительная динамика показателей функции внешнего дыхания и качества жизни после проведения терапии с использованием тренажера «Карбоник» [Данилов А.Н. и др., 2013].

Если принимать во внимание, что использование гиперкапнически-гипоксических воздействий является патофизиологически обоснованным и имеет хорошие предпосылки для применения в неврологической практике у детей, то одним из перспективных направлений для применения этого метода является лечение ДЦП. Гиперкапнически-гипоксические воздействия при этой патологии активно применяются с середины прошлого века [Doman G. et al., 1960], но способ их использования ограничен и не позволяет эффективно контролировать и дозировать воздействие [Ziring P.R. et al. 1999]. Ранее, украинские исследователи продемонстрировали, что курсовое 10-кратное воздействие прерывистой нормобарической гипоксии ( $F_{etO_2}$  12%) у детей с ДЦП, улучшает двигательную активность на 20%, церебральную гемодинамику на 26% и спектральные компоненты ЭЭГ на 14%, по сравнению с применением общепризнанной терапии (медикаментозное лечение, массаж, Бобат-терапия, Войта-терапия и др.) [Yatsenko K.V. et al., 2012]. Кроме того, по результатам мета-анализа, проведенного Ма J. и Ye H. [2016] было показано, что клиническое применение пермиссивной гиперкапнии у недоношенных младенцев не увеличивает риск ДЦП. Эти факты позволяют предполагать, что сочетанное воздействие умеренной гиперкапнии и гипоксии является перспективным методом для клинического применения в лечении ДЦП.



## ГЛАВА 2

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Объект и методы экспериментальной части исследования

##### 2.1.1. Животные

Исследования проводились с использованием моделей *in vivo* и *in vitro* на 590 крысах-самцах линии Wistar, средней массой 250-300 г и на 36 мышах (19 самцов и 17 самок) линии BALB/c. Все животные были получены из Института Цитологии и Генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Эксперименты на животных были одобрены биоэтической комиссией локального этического комитета ФГБОУ ВО КрасГМУ (Протокол №81/2018 от «22» февраля 2018 г) и проводились с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в научных целях (Директива ЕС 2010/63/ЕС), и принципов 3R. Рандомизация животных перед началом экспериментов выполнялась с использованием SPSS 11.5 (SPSS Inc, США). Животные находились в клетках при контролируемой комнатной температуре (~23 °C) и естественном освещении, со свободным доступом к еде и воде. До и после экспериментов животные взвешивались.

##### 2.1.2. Группы и экспериментальный дизайн

Экспериментальная часть исследования сгруппирована в 7 изолированных блоков, включающие модели *in vitro* и *in vivo*:

Блок I-A – экспериментальные серии по оценке 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 – экспериментальная серия по оценке содержания GRP-78 и NF-κB в околоинсультной области головного мозга крыс после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии;

Блок II – экспериментальные серии по оценке влияния гиперкапнии и гипоксии на апоптоз в околоинсультной области головного мозга крыс и у культур астроцитов и нейронов;

Блок III-A – экспериментальные серии по оценке содержания транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии в тканях гиппокампа и клеток с HIF-1 $\alpha$  в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов;

Блок III-B – экспериментальные серии по оценке содержания клеток с A1 рецепторами и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии в околоинсультной области головного мозга крыс и культурах астроцитов;

Блок IV – экспериментальная серия по оценке влияния гиперкапнии и гипоксии на проницаемость ГЭБ у крыс;

Блок V – экспериментальные серии по определению оптимальных параметров гиперкапнически-гипоксических тренировок у крыс;

Блок VI – экспериментальная серия по оценке возможности потенцирования эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими средствами;

Блок VII – экспериментальная серия по оценке влияния гиперкапнической гипоксии на продолжительность жизни и показатели биологического возраста у мышей в старости;

Причем, иммуногисто-/иммуноцитохимические исследования блоков III-A и III-B выполнены на образцах, полученных от одних и тех же животных и клеточных культур. Также общими были образцы, полученные в блоках I-A и I-B.

Блок I состоял из двух серий экспериментов (рисунок 2.1). Первая, серия была общей для блоков I-A и I-B. Первая серия выполнялась на модели *in vivo* и включала 4 группы крыс, различавшихся по парциальному давлению кислорода (P<sub>O2</sub>) и парциальному давлению углекислого газа (P<sub>CO2</sub>):

- НБГ (нормобарическая гипоксия,  $n=15$ ):  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ПермГ (пермиссивная гиперкапния,  $n=15$ ):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст.;  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ );
- ГиперГ (гиперкапническая гипоксия,  $n=15$ ):  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- Кон (контрольная группа,  $n=15$ ):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ . Животные в этой группе подвергались всем экспериментальным процедурам, но без воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

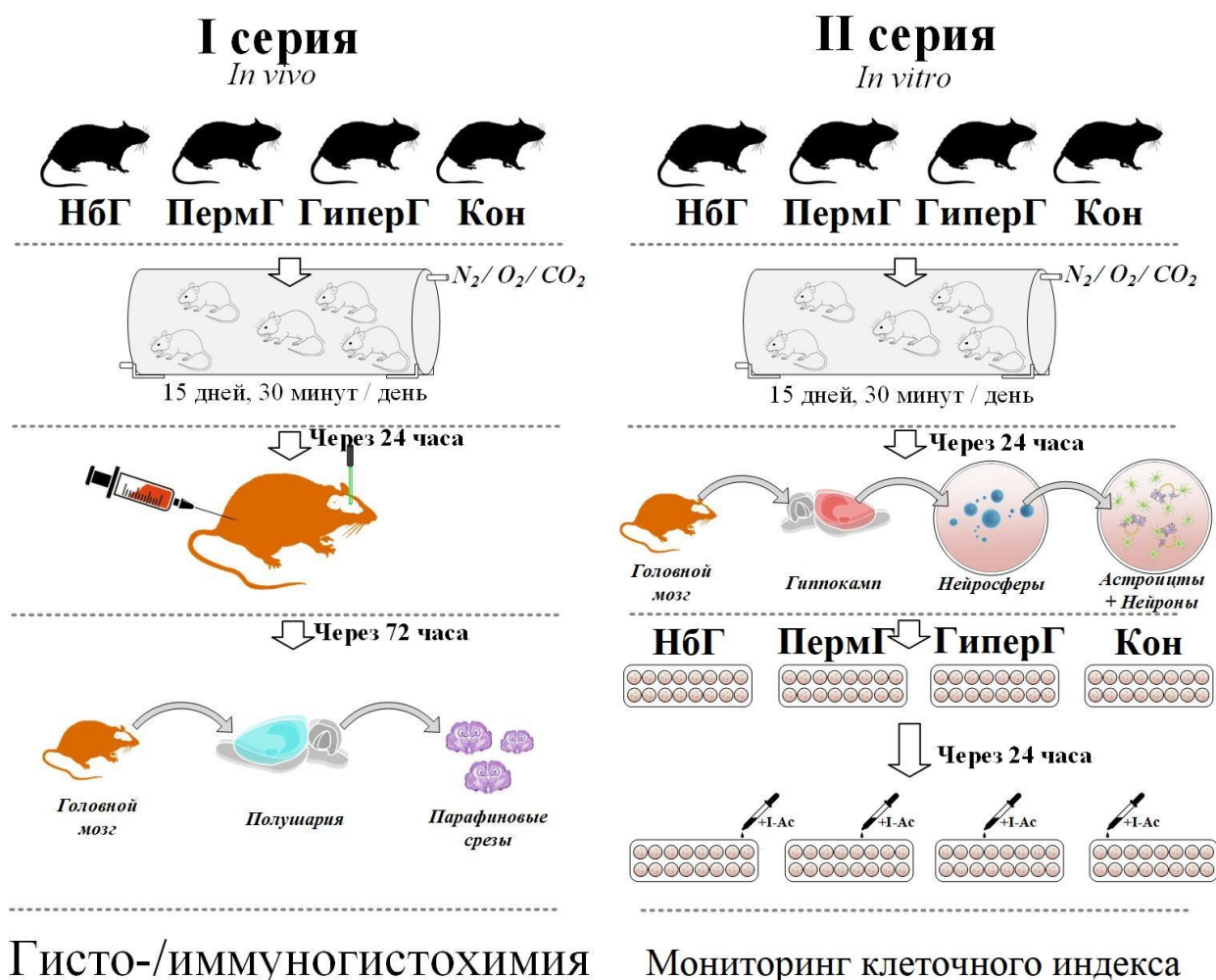


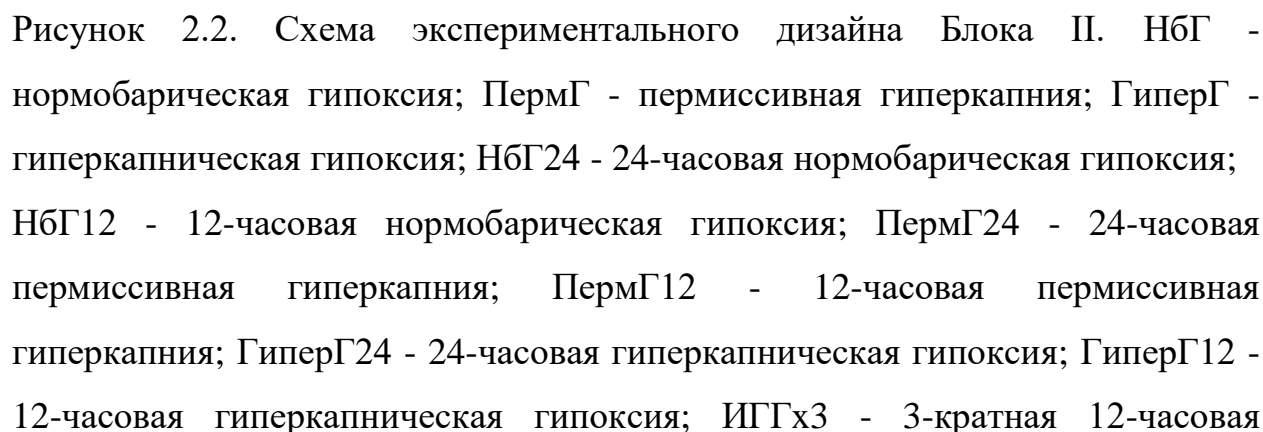
Рисунок 2.1. Схема экспериментального дизайна в Блоке I. НБГ - нормобарическая гипоксия; ПермГ - пермиссивная гиперкапния; ГиперГ -

гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа. I-Ас – йодацетат натрия.

В первой серии эксперимента проводились респираторные воздействия у крыс *in vivo* в специальной камере в течение 15 дней, по 30 минут ежедневно. На следующие сутки после завершения курса воздействий у всех животных моделировалось фокальное ишемическое повреждение головного мозга методом фотохимического тромбоза. Через 72 часа после инсульта животные декапитировались и головной мозг извлекался. Препараты после гистологической подготовки секционировались (толщина среза 10 мкм). Для части срезов головного мозга животных проводилось окрашивание ядрышковых организаторов методом импрегнации серебром с использованием набора «AgNORs» (Блок I-A), а для другой части срезов – иммуногистохимическая оценка экспрессии GRP-78 и NF-κB (Блок I-B).

Во второй серии эксперимента по аналогичным режимам проводились респираторные воздействия у крыс (n=20) в течение 15 дней. Крысы были рандомизированы на 4 равные группы и после завершения курса респираторных воздействий крыс декапитировали. Далее из выделенных стволовых клеток гиппокампа выполнялась процедура культивирования нейросфер и их дифференцировка в нейроны и астроциты. После завершения дифференцировки и накопления необходимой клеточной массы для продолжения экспериментов (7-е сутки), клетки сокультуры астроцитов и нейронов переносили в 16-луночные планшеты «xCelligence» (Roche, Швейцария). Далее проводилась регистрация и изучение динамики клеточного индекса у сокультур астроцитов и нейронов в нормоксических условиях и после моделирования химической гипоксии.

Блок II состоял из трех серий экспериментов (рисунок 2.2). Первая серия выполнялась на модели *in vivo* и включала 4 группы крыс, различавшихся по парциальному давлению кислорода ( $P_{O_2}$ ) и парциальному давлению углекислого газа ( $P_{CO_2}$ ):



гиперкапническая гипоксия; ИГГх2 - 2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа. I-Ас – йодацетат натрия.

Вторая и третья серия выполнялась на модели *in vitro*, где каждая серия включала 9 групп клеточных культур, различавшихся по парциальному давлению кислорода ( $P_{O_2}$ ) и парциальному давлению углекислого газа ( $P_{CO_2}$ ):

- НБГ24 (24-часовая нормобарическая гипоксия):  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 35$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- НБГ12 (12-часовая нормобарическая гипоксия):  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 35$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ПермГ24 (24-часовая пермиссивная гиперкапния):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ПермГ12 (12-часовая пермиссивная гиперкапния):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ГиперГ24 (24-часовая гиперкапническая гипоксия):  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ГиперГ12 (12-часовая гиперкапническая гипоксия):  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ИГГх3 (3-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия):  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ИГГх2 (2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия):  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- Кон (контрольная группа):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 35$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ . Животные в этой группе подвергались всем экспериментальным процедурам, но без воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

В первой серии эксперимента проводились респираторные воздействия у крыс *in vivo* в специальной камере в течение 15 дней, по 30 минут ежедневно. На следующие сутки после завершения курса воздействий у всех животных моделировалось фокальное ишемическое повреждение головного

мозга методом фотохимического тромбоза. Через 72 часа после операции проводилась перфузионная фиксация с последующей декапитацией и извлечением головного мозга. Для части срезов головного мозга животных из первой серии выполнялась оценка уровня апоптоза при помощи набора «ApopTag™ ISOL», а для другой части срезов – иммуногистохимическая оценка модуляторов апоптоза (каспаза-3, апоптоз-индуцирующий фактор, Вах, Bcl-2).

Во второй и третьей экспериментальной серии *in vitro* использовались астроциты и нейроны, дифференцированные из первичной тканевой культуры стволовых клеток ЦНС и начальной культуры крысиных нейросфер, полученных из гиппокампа интактных крыс. Астроциты и нейроны после дифференцировки находились в специальной гипоксической камере при условиях нормобарической гипоксии, пермиссивной гиперкапнии и гипоксии в сочетании с гиперкапнией в течение 24 или 12 часов, или интервалами гипоксия/реоксигенация по 12 часов (в зависимости от назначения группы). Через 6 часов после завершения экспозиции часть культур клеток из второй серии подвергалась химической гипоксии. После химической гипоксии на культурах клеток из второй серии выполнялось иммуноцитохимическое исследование содержания апоптотических и некротизированных клеток, а на культурах клеток из третьей серии – иммуноцитохимическая оценка содержания модуляторов апоптоза (каспаза-3, апоптоз-индуцирующий фактор, Вах, Bcl-2). В качестве контроля для этих серий использовались клетки, которые находились в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора: температура - 37°C, относительная влажность - 80%, P<sub>O2</sub> ≈ 150 мм рт.ст. и P<sub>CO2</sub> ≈ 35 мм рт.ст.; остальное – N<sub>2</sub>.

Блок III состоял из пяти серий экспериментов (рисунок 2.3), каждая из которых включала по 4 группы образцов/животных. Первая, вторая и третья серии были общими для блоков IIIA и IIIB. Первая и вторая серия выполнялась на моделях *in vitro*, а третья, четвертая и пятая серии выполнялись на моделях *in vivo*. В каждой экспериментальной серии группы

различались по парциальному давлению кислорода ( $P_{O_2}$ ) и углекислого газа ( $P_{CO_2}$ ), в зависимости от используемой модели *in vitro* / *in vivo*:

НБГ (нормобарическая гипоксия): *in vivo* -  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ; *in vitro* -  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 35$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;

ПермГ (пермиссивная гиперкапния):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст.;  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ );

ГиперГ (гиперкапническая гипоксия): *in vivo* -  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ; *in vitro* -  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;

Кон (контрольная группа): *in vivo* -  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ); *in vitro* -  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 35$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ). Животные в этой группе подвергались всем экспериментальным процедурам, но без воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.



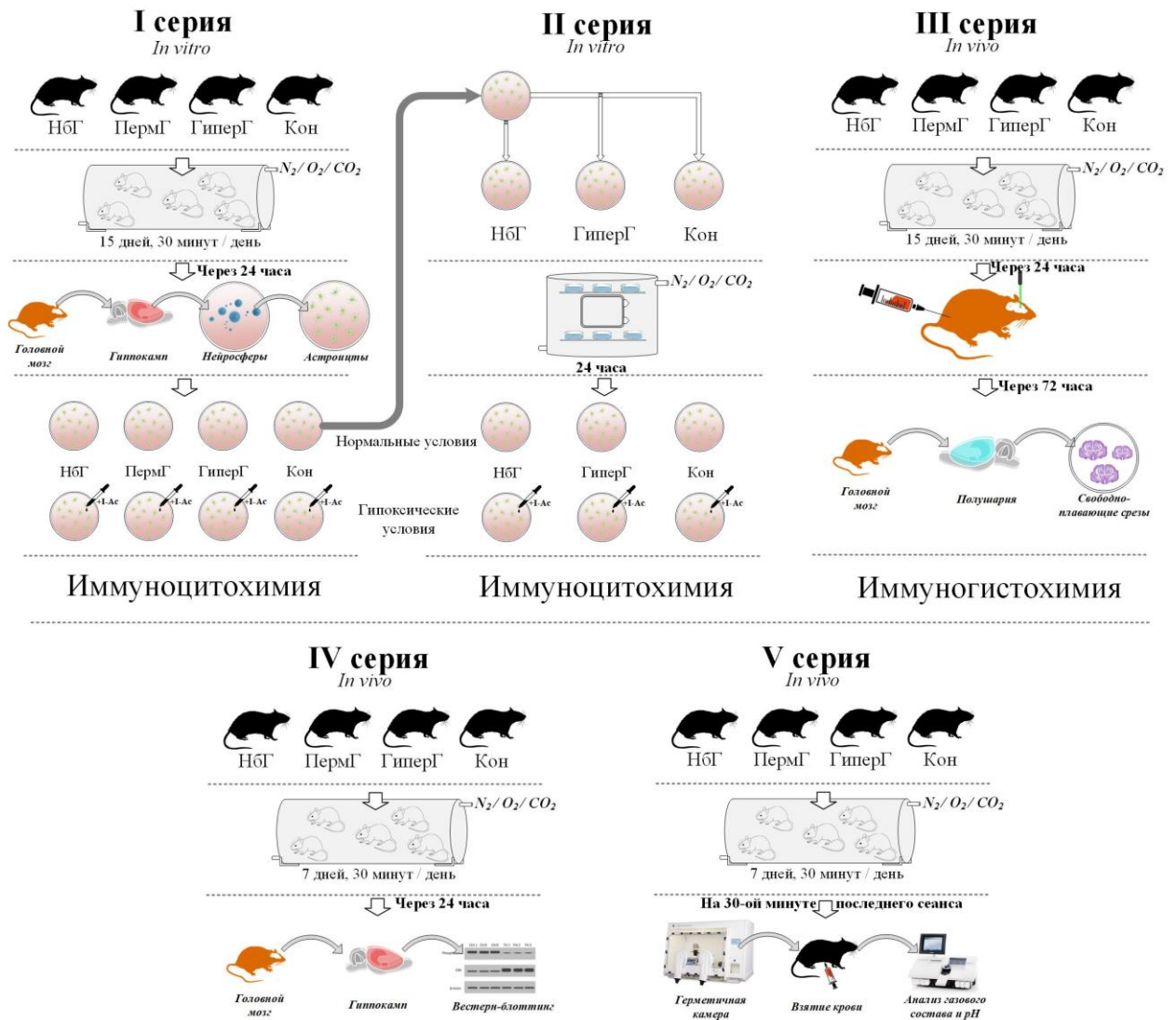


Рисунок 2.3. Схема экспериментального дизайна Блока III. НбГ - нормобарическая гипоксия; ПермГ - пермиссивная гиперкапния; ГиперГ - гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа. I-Ас – йодацетат натрия.

В первой экспериментальной серии респираторные воздействия у крыс (n=20) проводились в специальной камере в течение 15 дней, по 30 минут ежедневно. Через 24 часа после завершения курсов воздействия по 5 крыс из каждой группы были подвержены эвтаназии путем декапитации. Гиппокамп извлекался для получения первичной тканевой культуры нейрогенных стволовых клеток ЦНС и начальной культуры крысиных нейросфер. Нейросферы использовались для последующей дифференцировки в

астроциты. После дифференцировки проводилось иммуноцитохимическое исследование процентного содержания HIF-1 $\alpha$ , A1 рецепторов и Kir6.2 (субъединицы митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов) при нормоксических условиях и после моделирования химической гипоксии.

Во второй серии экспериментов астроциты, полученные из первичной тканевой культуры нейрогенных стволовых клеток контрольной группы первой экспериментальной серии, находились в гипоксической камере при условиях нормобарической гипоксии ( $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст.;  $P_{CO_2} \approx 35$  мм рт.ст.; остальное – N<sub>2</sub>) и гипоксии в сочетании с гиперкапнией ( $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст.;  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное – N<sub>2</sub>) в течение 24 часов и через 6 часов подвергались химической гипоксии с последующим иммуноцитохимическим исследованием процентного содержания HIF-1 $\alpha$ , A1 рецепторов и Kir6.2 (субъединицы митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов). В качестве контроля для этой серии использовались клетки, которые находились в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора.

В третьей экспериментальной серии аналогично проводились респираторные воздействия у крыс (n=40) в течение 15 дней по 30 минут ежедневно. На следующие сутки после завершения курса воздействий у всех животных моделировалось фокальное ишемическое повреждение головного мозга методом фотохимического тромбоза. Через 72 часа после операции проводилась перфузионная фиксация с последующей декапитацией и извлечением головного мозга для иммуногистохимического исследования с оценкой процентного содержания HIF-1 $\alpha$ , A1 рецепторов и Kir6.2.

В четвертой экспериментальной серии аналогично проводились респираторные воздействия у крыс (n=40) в специальной камере в течение 7 дней по 30 минут ежедневно. Через 24 часа после завершения тренировочных курсов животные были подвержены эвтаназии путем декапитации и произведен забор гиппокампа с последующим выделением цитоплазматических и нуклеарных белковых экстрактов и проведением вестерн-блоттинга с оценкой уровня HIF-1 $\alpha$ .

В пятой экспериментальной серии аналогично проводились респираторные воздействия у крыс ( $n=40$ ) в специальной камере в течение 7 дней по 30 минут ежедневно. На 30-й минуте последнего сеанса респираторного воздействия под наркозом (внутрибрюшинное введение 3% р-ра хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг) забирали кровь из брюшной аорты в шприц с гепарином, сбалансированным по электролитам (Radiometer, Дания) для немедленной оценки газового состава крови и pH на анализаторе «ABL-835Flex» (Radiometer, Дания).

Блок IV включал 4 группы крыс (рисунок 2.4), различавшихся по парциальному давлению кислорода ( $P_{O_2}$ ) и парциальному давлению углекислого газа ( $P_{CO_2}$ ):

- НБГ (нормобарическая гипоксия,  $n=10$ ):  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- ПермГ (пермиссивная гиперкапния,  $n=10$ ):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст.;  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ );
- ГиперГ (гиперкапническая гипоксия,  $n=10$ ):  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- Кон (контрольная группа,  $n=10$ ):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ . Животные в этой группе подвергались всем экспериментальным процедурам, но без воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

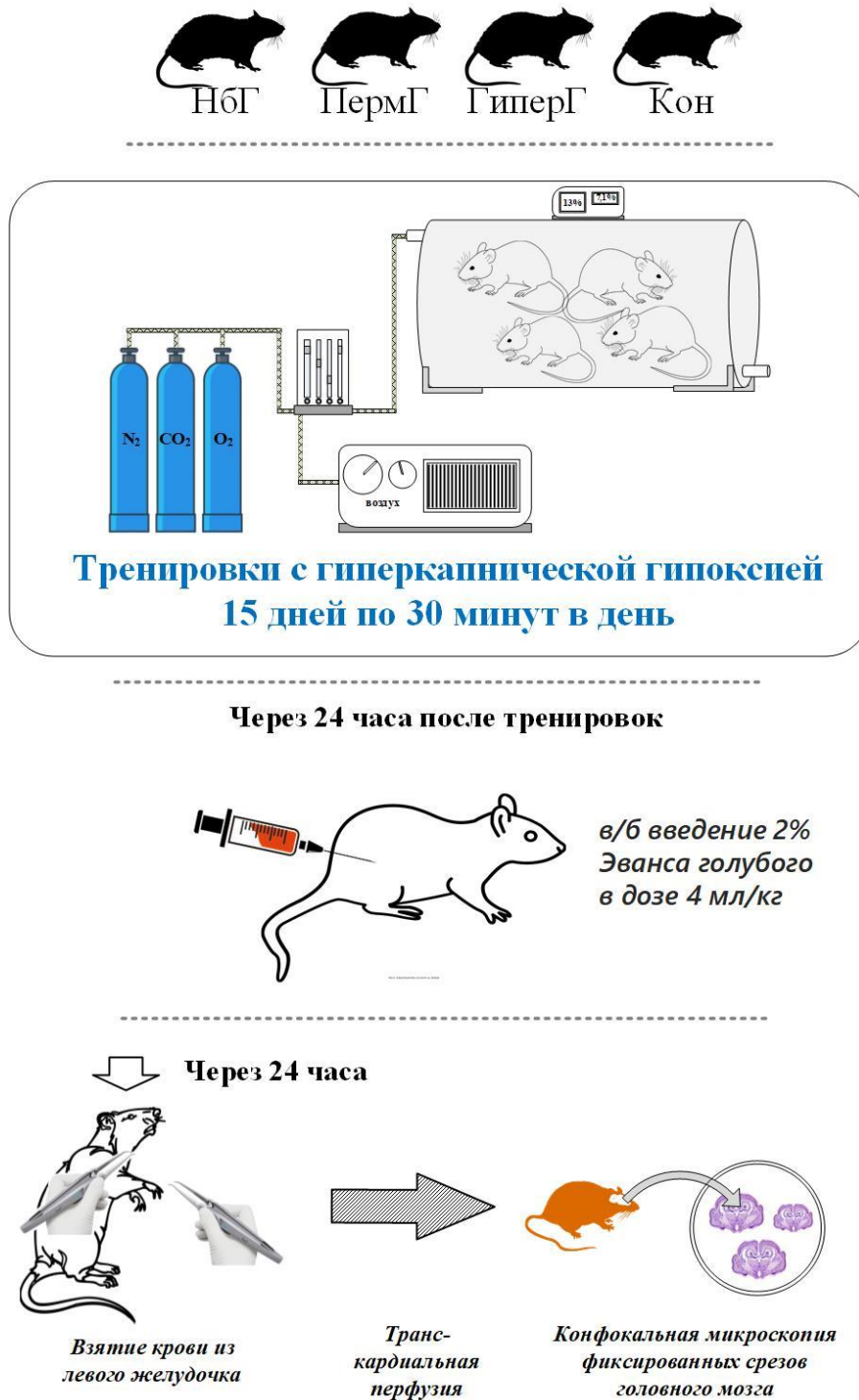


Рисунок 2.4. Схема экспериментального дизайна Блока IV. НбГ - нормобарическая гипоксия; ПермГ - пермиссивная гиперкапния; ГиперГ - гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа.

Курс воздействий для всех групп составлял 15 сеансов по 30 минут ежедневно. Через 24 часа после завершения курсов респираторных

воздействий животным внутрибрюшинно вводился 2% р-р красителя Эванса голубого, в объеме 4 мл/кг веса животного. Еще через 24 часа наркотизированным крысам (внутрибрюшинное введение 3% р-ра хлоралгидрата в дозировке 400 мг/кг) производилась процедура взятия крови, перфузионная фиксация и взятие головного мозга для оценки проницаемости ГЭБ.

Блок V состоял из трех экспериментальных серий (рисунок 2.5), в которых использовались стандартные параметры парциального давления вдыхаемых газов для моделирования гиперкапнической гипоксии ( $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ):

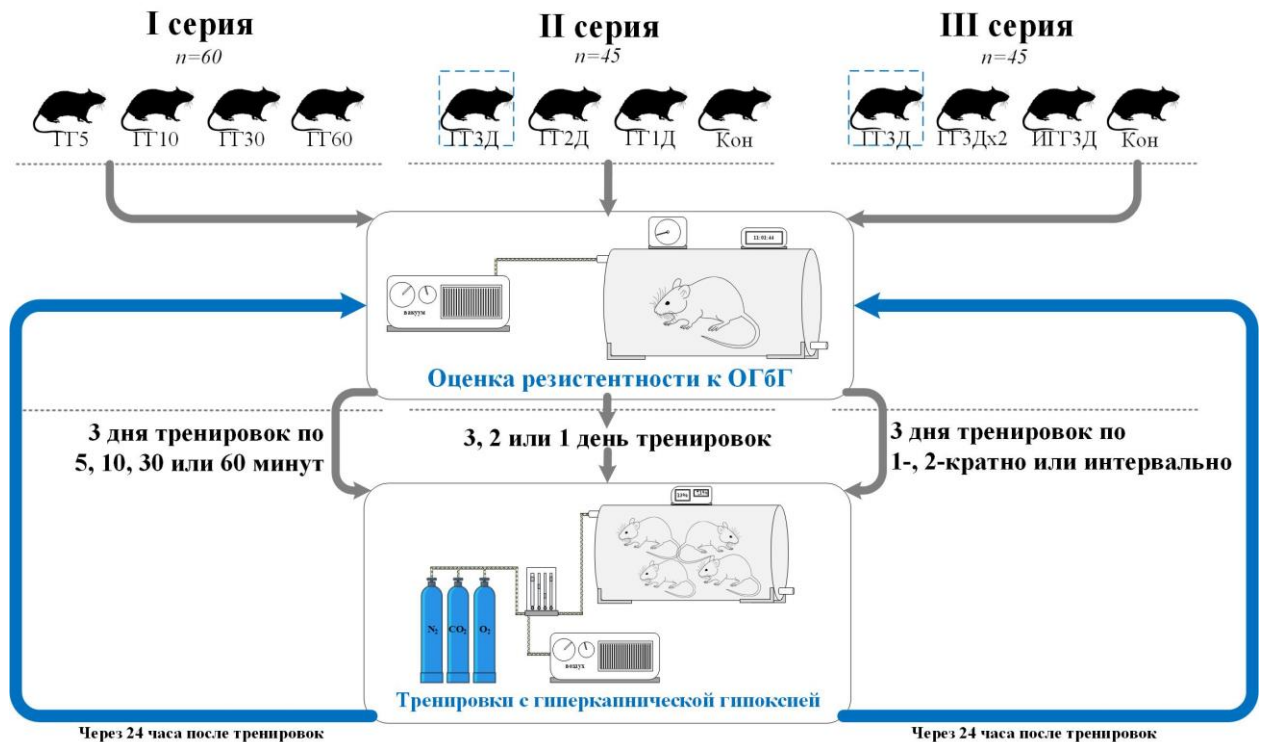


Рисунок 2.5. Схема экспериментального дизайна Блока V. ГГ5 – 5-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ10 – 10-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ30 – 30-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ60 – 60-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ1Д - 1-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГ2Д - 2-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГЗД - 3-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГЗДx2 – 3-дневная гиперкапническая гипоксия по 2 сеанса в день; ИГГЗД - 3-дневная интервальная гиперкапническая гипоксия.

гипоксия; Кон- контроль; ОГБГ – острая гипобарическая гипоксия. Пунктирной линией обозначены группы, которые использовались для сравнения из других серий.

- 1 серия. Определение оптимальной продолжительности одного сеанса тренировки: 60 животных были разделены на 4 равные группы, прошедшие впоследствии 3-дневный курс гиперкапнически-гипоксических тренировок с продолжительностью сеанса 5 (ГГ5), 10 (ГГ10), 30 (ГГ30) и 60 (ГГ60) минут. После завершения серии определялась оптимальная продолжительность тренировочного сеанса, которая использовалась в последующих сериях эксперимента.

- 2 серия. Определение зависимости эффекта от количества дней тренировок: - 1-дневный (ГГ1Д), 2-дневный (ГГ2Д) и 3-дневный (ГГ3Д) курс гиперкапнически-гипоксических тренировок. Для этого использовали 45 животных, распределенных поровну в группы ГГ1Д, ГГ2Д и контроля, а показатели резистентности группы ГГ3Д брали из результатов 1-й серии.

- 3 серия. Определение зависимости эффекта от наличия периода реоксигенации и кратности применения в течение суток: 45 животных были разделены на 3 равные группы: 1 группа проходила 3-дневный курс тренировок 2-кратно – в 12:00 и 19:00 часов (ГГ3Д×2); 2 группа – 3-дневный курс тренировок с интервальной гиперкапнической гипоксией (ИГГ3Д) сеансами, состоящими из 6 циклов общей длительностью 60 мин. Каждый из циклов включал 5 минут дыхания гиперкапнически-гипоксической газовой смесью и 5 минут дыхания атмосферным воздухом; 3 группа – контрольная.

У всех животных определялся исходный уровень резистентности к острой гипоксии, а через 24 часа после окончания курса тренировок выполнялась ее повторная оценка.

Блок VI состоял из одной экспериментальной серии (рисунок 2.6) в которой использовались стандартные параметры парциального давления

вдыхаемых газов для моделирования гиперкапнической гипоксии ( $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ).

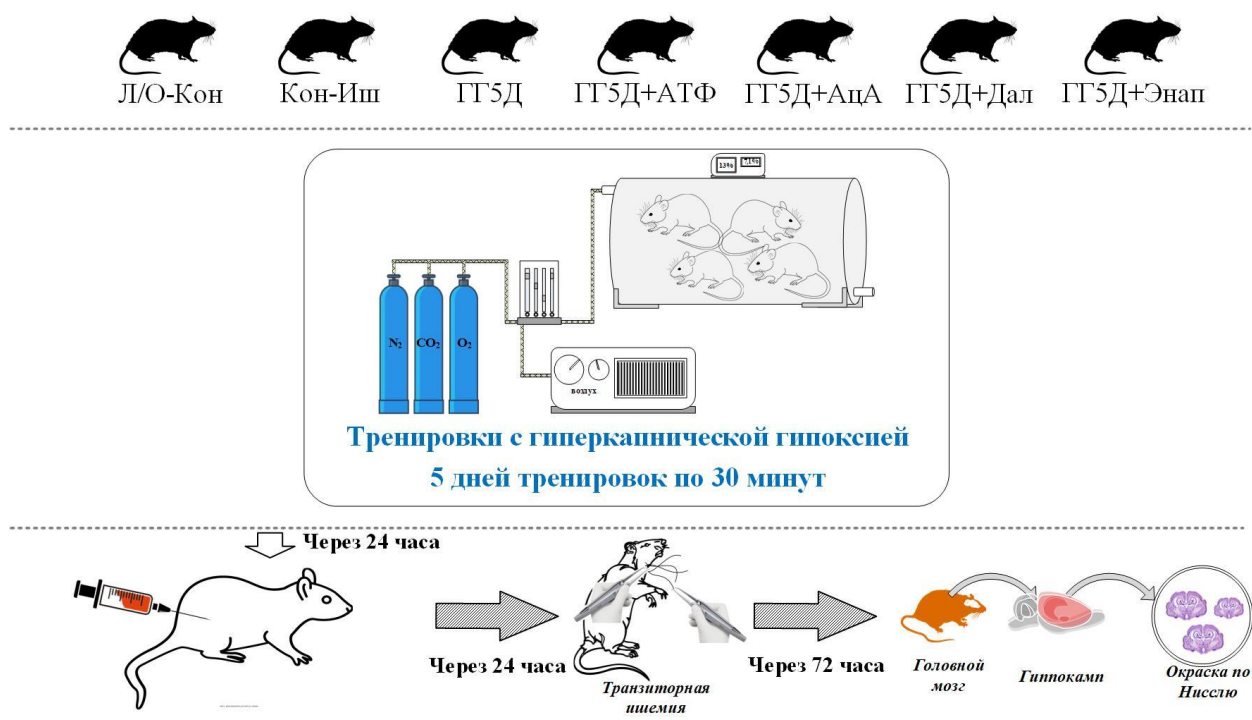


Рисунок 2.6. Схема экспериментального дизайна Блока VI. Л/О-Кон – ложно-оперированная контрольная группа; Кон-Иш – контроль с ишемическим повреждением; ГГ5Д – 5-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГ5Д+АТФ – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с аденозин трифосфатадинатриевой солью; ГГ5Д+АцА – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с ацетазоламидом; ГГ5Д+Дал – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с даларгином; ГГ5Д+Энап – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с эналаприлом.

140 животных были рандомизированы на 7 равных групп по 20 крыс в каждой: ложно-оперированная контрольная группа (Л/О-Кон); контроль с ишемическим повреждением (Кон-Иш); группа воздействия гиперкапнической гипоксии (ГГ5Д) и 4 группы воздействия гиперкапнической гипоксии в сочетании с разными фармакологическими средствами:

- активатором аденозиновых рецепторов - Аденозин трифосфат динатриевая соль (ГГ5Д+АТФ), в дозе 2 мг/кг [Ertan C. et al., 2008; Seydyousefi M. et al., 2019];
- блокатором карбоангидразы - ацетазоламидом (ГГ5Д+АцА), в дозе 30 мг/кг [Bejaoui M. et al., 2015; Dettori I. et al., 2021];
- антагонистом опиоидных рецепторов - даларгином (ГГ5Д+Дал), в дозе 0,5 мг/кг [Лишманов Ю.Б. и др., 2002; Гребенчиков О.А. и др. 2018];
- блокатором ангиотензин-превращающего фермента - эналаприлом (ГГ5Д+Энап), в дозе 0,1 мг/кг [Гацура С.В. и Зинчук В.В., 2004].

Респираторные воздействия у крыс проводились в течение 5 дней по 30 минут ежедневно. Через 24 часа после завершения курсов воздействий животным внутривенно вводились фармакологические средства или физиологический р-р, соответственно назначению группы, а еще через 24 часа под анестезией 3% р-ром хлоралгидрата (400 мг/кг) производилось моделирование транзиторной ишемии головного мозга у всех групп, кроме ложно-оперированной группы, где во время хирургического вмешательства окклюзия не выполнялась.

Блок VII включал 2 группы мышей (Рисунок 2.7). Животные в возрасте 2 недель были рандомизированы на две экспериментальные группы. При рандомизации соблюдался принцип равномерного гендерного состава. В контрольной группе было 9 самок и 9 самцов, а в группе воздействия гиперкапнической гипоксией - 8 самок и 10 самцов.



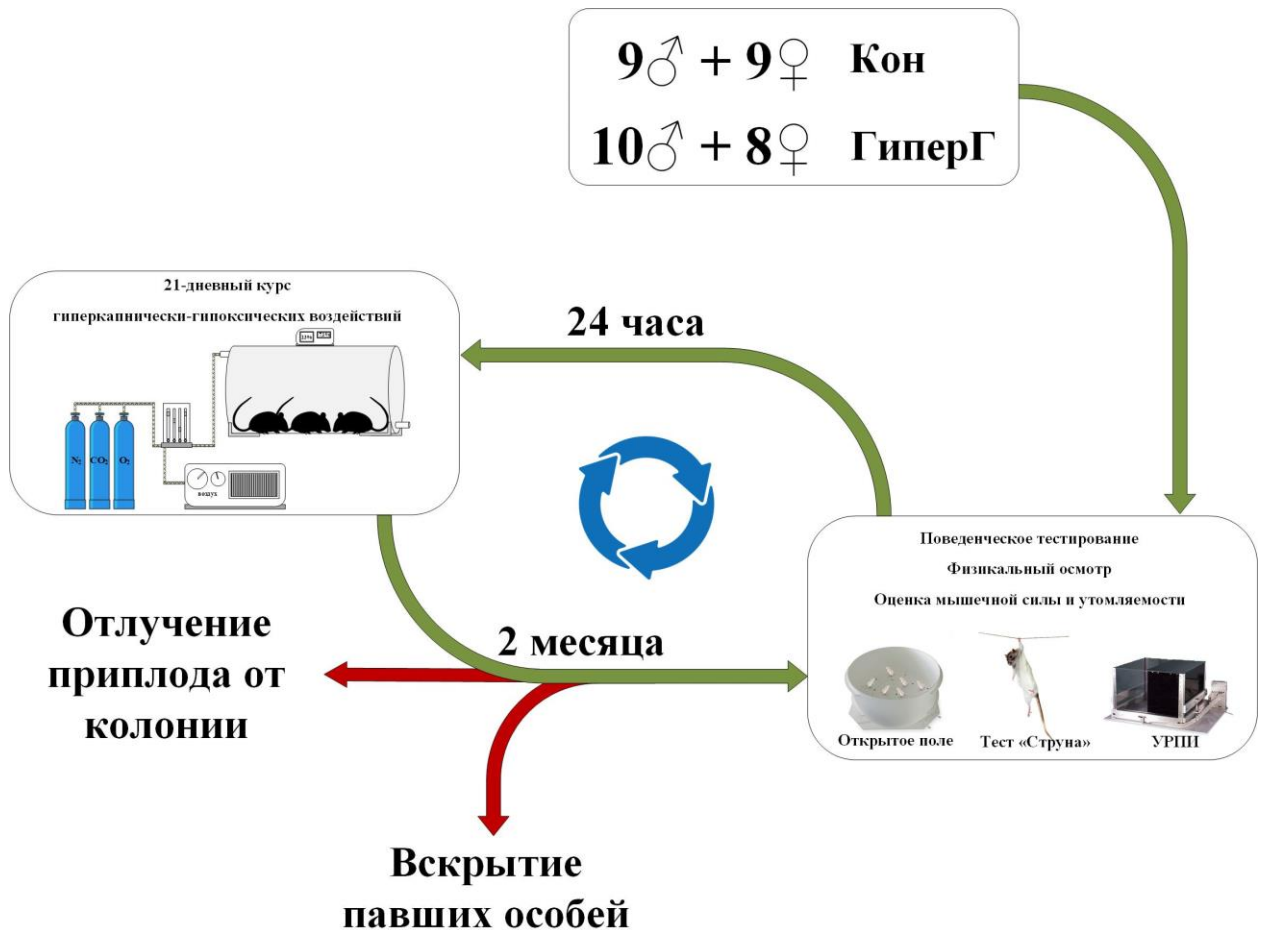


Рисунок 2.7. Схема экспериментального дизайна Блока VII. ГиперГ-гиперкапническая гипоксия; Кон – контрольная группа; УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания.

Группы различались по парциальному давлению кислорода ( $P_{CO_2}$ ) и углекислого газа ( $P_{CO_2}$ ) во время респираторных воздействий:

- ГиперГ (гиперкапническая гипоксия,  $n=18$ ):  $P_{O_2} \approx 90$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ ;
- Кон (контрольная группа,  $n=18$ ):  $P_{O_2} \approx 150$  мм рт.ст. и  $P_{CO_2} \approx 1$  мм рт.ст.; остальное –  $N_2$ . Животные в этой группе подвергались всем экспериментальным процедурам, но без воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

Респираторные тренировки начинали после достижения мышами возраста 3 месяца. Перед началом воздействий проводилась визуальная оценка состояния животных, измерение массы тела, оценка мышечной силы,

физической утомляемости и поведения. Во время проведения эксперимента ежедневно проводили визуальный осмотр состояния животных и фиксировали эпизоды рождения и смертности среди потомства у самок. После достижения пубертантного возраста рожденное потомство отлучалось от гнезда. Мыши обеих групп в течении всей жизни проходили 21-дневный курс респираторных воздействий, продолжительностью 30 минут в день, с интервалом между курсами 2 месяца. На следующие сутки после завершения каждого курса воздействий у всех животных проводилась повторная оценка, мышечной силы, физической утомляемости и поведения. Эксперимент продолжался до момента естественной смерти всех особей. Каждая умершая особь подвергалась вскрытию с установлением вероятных причин смерти.

### 2.1.3. Модель респираторных воздействий *in vivo*

Для проведения респираторных воздействий использовалась проточная камера (рисунок 2.8). Общий объем камеры составлял 60 л. Газовая смесь подавалась в камеру компрессором со скоростью 15 л/мин. Для поддержания равномерного давления в камере имелось выпускное отверстие, соединенное шлангом с емкостью, наполненной водой. Это предотвращало обратную диффузию газов в камеру.

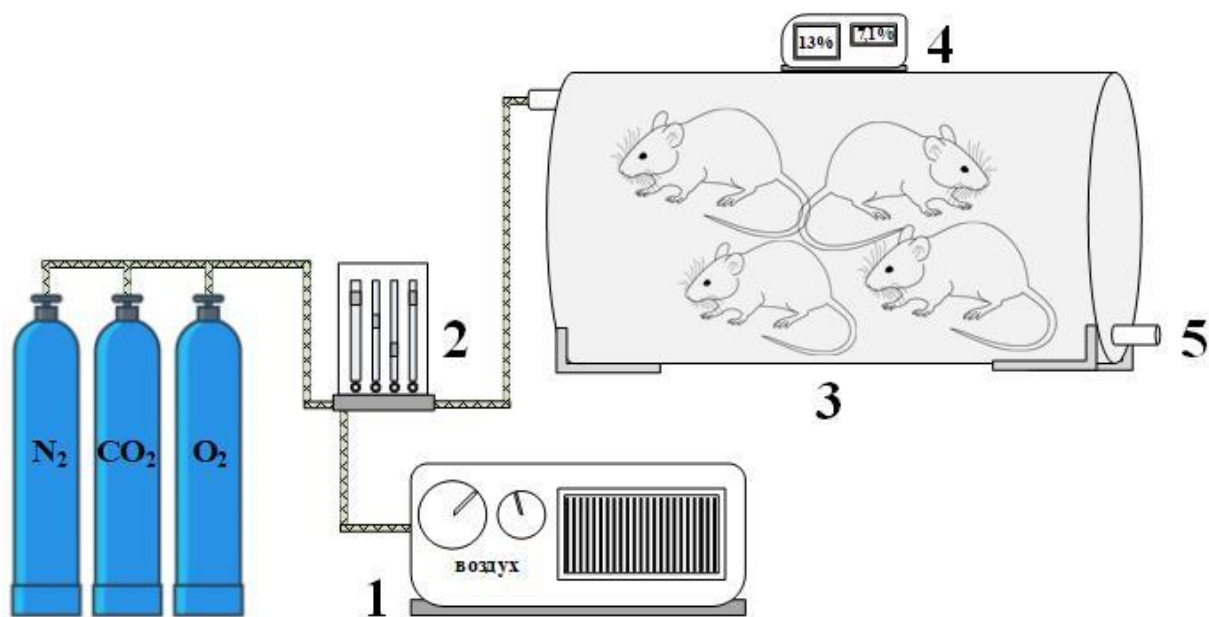


Рисунок 2.8. Схема установки для проведения респираторных воздействий  
 1 – Баллоны с углекислым газом, кислородом, азотом и компрессор для подачи атмосферного воздуха; 2 – Ротаметры; 3 – Герметичная проточная камера; 4 – Газоанализатор; 5 – Выпускной клапан.

Экспериментальные группы крыс дышали газовой смесью, состав которой зависел от назначения группы. Контрольные группы находились в камере при аналогичных условиях, но вместо газовой смеси компрессором нагнетался атмосферный воздух. Контроль газового состава в камере производился газоанализатором «Microlux O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>» (ООО «Микролюкс», Россия).

#### 2.1.4. Модель фокальной ишемии головного мозга

Все животные накануне перед операцией не получали питание, но имели свободный доступ к воде. Каждой крысе производилась анестезия путем внутривентрального введения 3% р-ра хлоралгидрата в дозировке 400 мг/кг. В левой паховой области был произведен стерильный разрез. 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.

Ишемическое повреждение коры головного мозга выполнялось методом транскраниального фотохимического тромбоза [Pevsner et al., 2001; Barth and Mody, 2011]: проводилось 10-минутное освещение скальпированных костей черепа зеленым лазером (532 нм) мощностью 20 мВт. На черепе освещался участок правой теменной кости, диаметром 2 мм, расположенный посередине между брегмой и ламбдовидным швом и на 2 мм латеральнее сагиттального шва.

#### 2.1.5. Получение культур нейронов и астроцитов из ткани гиппокампа

Гиппокамп отделялся от головного мозга, полученного от интактных крыс (самцы линии Wistar, возрастом 5-6 месяцев), в 2% р-ре глюкозы в PBS и измельчался. Полученные фрагменты переносились в свежий 2% р-р глюкозы в PBS с последующим удалением супернатанта после пассивного осаждения. После осаждения ткань ресуспензировалась в 1 мл среды из набора «NeuroCult Proliferation Kit (Mouse & Rat)» (StemCell, Канада) и тритурировалась до получения однородной суспензии клеток. Далее, супернатант, полученный после осаждения, центрифугировался при 150g в течение 5 минут. Полученная суспензия клеток содержала нейрогенные стволовые клетки, которые и были основой для дальнейшего культивирования [Pi M. et al., 2009].

Выделенные из головного мозга клетки, плотностью 6-12 млн жизнеспособных клеток/мл, засевали в культуральные флаконы T-25 в 10 мл культуральной среды «NeuroCult Proliferation Kit (Mouse & Rat)» (StemCell, Канада). В дальнейшем культуры клеток содержали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C.

После 24 часов инкубации наблюдали образование свободно плавающих нейросфер (конгломерата клеток, пролиферирующих в виде сфероидов). Нейросферы использовались для дифференцирования в астроциты и нейроны после 4-5 суток культивирования.

Для дифференцировки нейросфер в среду для культивирования добавлялись факторы дифференцировки «NeuroCult® NS-A Differentiation Kit» (StemCell, Канада). В качестве питательной среды использовалась среда NeuroCult® NS-A Differentiation Medium (StemCell, Канада). Через 7 суток проводили иммуноцитохимическую оценку чистоты полученных культур, для чего использовали флюоресцентные маркеры для астроцитов (GFAP) и нейронов (NSE) по стандартным протоколам непрямого метода иммуноцитохимии.

После завершения дифференцировки нейросфер и накопления необходимой клеточной массы, астроциты и нейроны переносились в 24-луночные планшеты для дальнейших экспериментов.

#### 2.1.6. Модель химической гипоксии *in vitro*

Культуры астроцитов и нейронов инкубировали с натрия йодацетатом в течение 30 минут 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Концентрация натрия йодацетата в среде составляла 50 мкМ. По окончании инкубации клетки отмывали и делали полную замену культуральной среды, после чего продолжали культивирование клеток в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение 24 часов до начала иммуноцитохимического исследования.

#### 2.1.7. Модель гипоксии, гиперкапнии и их сочетания *in vitro*

Моделирование гипоксического и гиперкапнически-гипоксического воздействия у культур астроцитов и нейронов, выделенных из нейрогенных стволовых клеток, проводилось в специальной камере «НурохуLab» (Oxford Optronix Ltd, Великобритания), которая автоматически поддерживала заданный состав атмосферы (для гипоксии -  $P_{O_2} \approx 35$  мм рт.ст.; для гиперкапнии -  $P_{CO_2} \approx 50$  мм рт.ст.), температуру 37°C и влажность на уровне 80% в течение 12 или 24 часов, либо 2-3 интервалами по 12 часов гипоксии с гиперкапнией в чередовании с 12-часовыми периодами нормоксии.

### 2.1.8. Иммуногистохимические исследования антигенов 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). Перфузионная фиксация выполнялась после введения летальной дозы 3% р-ра хлоралгидрата (800 мг/кг). После перфузионной фиксации головной мозг извлекался и содержался в течение 2 суток в 4% р-ре PBS-забуференного параформальдегида и 2 суток в 30% р-ре сахарозы. Далее головной мозг секционировался на вибротоме (толщина фронтальных срезов 60 мкм). Секционированные срезы индивидуально переносились в 30% р-р сахарозы в 24-луночные планшеты на хранение или анализ.

Иммуногистохимическое исследование проводилось по протоколу на свободноплавающих срезах методом двойной/тройной непрямой иммунофлуоресценции. В лунки вносился блокирующий р-р с BSA на 60 минут с шейкированием в количестве 300 мкл и последующей двухкратной промывкой (500 мкл PBS + 5 мг BSA + Тритон-X100 x2). Далее на срезы наносился р-р первичных антител (300 мкл) с инкубацией на шейкере в течение ночи при температуре +4 °С. Далее после трехкратной промывки наносился р-р вторичных антител с инкубацией на шейкере в темноте в течение 2 часов при комнатной температуре.

В качестве первичных антител использовали:

- Моноклональные мышинные антитела к каспазе-3 (Thermo Fisher, Кат. №43-7800, США) в рабочем разведении 1:500;
- Моноклональные кроличьи антитела к апоптоз-индуцирующему фактору (Thermo Fisher, Кат. №MA5-32032, США) в рабочем разведении 1:200;
- Моноклональные мышинные антитела к Bax (Thermo Fisher, Кат. №MA5-14003, США) в рабочем разведении 1:500;

- Поликлональные кроличьи антитела к Bcl-2 (Thermo Fisher, Кат. №PA5-36742, США) в рабочем разведении 1:200;
- Моноклональные мышинные антитела к HIF-1 $\alpha$  (Thermo Fisher, Кат. №SA5-10211, США) в рабочем разведении 1:500;
- Поликлональные кроличьи антитела к A1-аденозиновым рецепторам (Thermo Fisher, Кат. №PA1-041A, США) в рабочем разведении 1:500;
- Моноклональные кроличьи антитела к K<sub>ir</sub>6.2 (Thermo Fisher, Кат. №PA5-75331, США) в рабочем разведении 1:200;

В качестве вторичных антител использовались:

- Поликлональные козы антитела против кролика, конъюгированные с AlexaFluor555 в рабочем разведении 1:500 (Thermo Fisher, Кат. №A-21428, США);
- Поликлональные козы антитела против мыши, конъюгированные с AlexaFluor488 в рабочем разведении 1:2000 (Thermo Fisher, Кат. №A-11001, США);

Для разведения всех антител использовался 1% р-р BSA в PBS.

После инкубации и трехкратной промывки срезы переносились на предметные стекла, после чего на них наносился флюоромаунт с добавлением DAPI и покровные стекла. Подсчет количества иммунопозитивных клеток, содержащих целевые антигены в околоинсультной области, производился не менее, чем в 5 полях зрения на конфокальном микроскопе «FV10i-W» (Olympus, Япония) с использованием программного обеспечения «Olympus FluoView software» (Ver.4.0a). Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

#### 2.1.9. Иммуноцитохимические исследования *in vitro*

Иммуноцитохимическая оценка количества клеток, содержащих каспазу-3, апоптоз-индуцирующий фактор, Bax, Bcl-2, HIF-1 $\alpha$ , A1-рецепторы к аденозину и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы, в культурах астроцитов и нейронов

выполнялась методом двойной/тройной непрямой иммунофлуоресценции. Предварительно проводили префиксацию клеток 2% р-ром параформальдегида в культуральной среде в течение 5 минут. Последующая фиксация клеток осуществлялась 4% р-ром параформальдегида в течение 15 минут.

После фиксации проводилась пермеабилзация с 0,1% р-ром Тритон Х-100 (10 минут при комнатной температуре) и блокирование неспецифических антигенов с 10% р-ром BSA в PBS (30 минут при 37°). После удаления BSA и 3-кратной промывки р-ром PBS к астроцитам добавляли р-р первичных антител на 2 часа при 37°С. После удаления первичных антител и 3-кратной промывки р-ром PBS к астроцитам добавляли р-р вторичных антител на 1 час при 37°С. Для контрастирования ядер добавлялся р-р DAPI.

В качестве первичных и вторичных антител использовали аналогичные тем, которые применялись для иммуногистохимического анализа в аналогичных разведениях (раздел 2.1.8).

Флуоресцентная микроскопия проводилась на системе клеточного анализа «ZOE» (Bio-Rad, США) с подсчетом числа иммунопозитивных клеток, содержащих целевые антигены, относительно общего количества клеток. Микрофотографии обрабатывались при помощи программы «ImageJ» 1,41 (Scion Inc., США). Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

#### 2.1.10. Оценка интенсивности апоптоза в околоинсультной области головного мозга крыс

Срезы головного мозга крыс анализировались по протоколу оценки апоптоза методом детекции двойной флуоресцентной метки при помощи набора «ApopTag® ISOL Dual fluorescence apoptosis kit» (Sigma-Aldrich, Кат. №ART1000, Германия), предназначенного для детектирования олигонуклеотидов в типичных апоптотических двухцепочечных разрывах ДНК.



В основе метода лежит использование олигонуклеотидного зонда, содержащего две внутренние метки: карбоксифлуоресцеин (FAM) и Cal Fluor Red 590 (CR590). Зонд, меченный CR590, детектирует разрывы ДНК, индуцированные ДНКазами I типа, а зонд, помеченный FAM, детектирует разрывы ДНК, индуцированные ДНКазами II типа. Метод является более селективным, по сравнению обычными методами, такими как ISEL (ДНК-полимераза Кленова), TUNEL (концевой дезоксинуклеотидил трансфераза, TdT) и ISNT (ДНК-полимераза I) и позволяет достоверно дифференцировать апоптотические клетки от обратимо поврежденных по наличию в ядре и цитоплазме сразу двух меток.

Протокол пробоподготовки осуществлялся согласно инструкциям производителя, а анализ выполнялся на конфокальном микроскопе «FV10i-W» (Olympus, Япония), с использованием программного обеспечения «Olympus FluoView software» (Ver.4.0a). Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

#### 2.1.11. Оценка интенсивности апоптоза и некроза *in vitro*

Оценка интенсивности апоптоза и некроза проводилась после завершения курсов воздействий гипоксии и/или гиперкапнии *in vitro* с использованием набора «Apoptosis/Necrosis Detection Kit (blue, green, red)» (Abcam, Кат. №ab176749, Великобритания), согласно инструкциям производителя. Флуоресцентная микроскопия проводилась на системе клеточного анализа «ZOE» (Bio-Rad, США) с подсчетом числа иммунопозитивных клеток, содержащих целевые антигены, относительно общего количества клеток. Подсчет проводили не менее, чем в 5 полях зрения, на 1000 клеток в образце. Микрофотографии обрабатывались при помощи программы «ImageJ 1,41» (Scion Inc., США). Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

### 2.1.12. Вестерн-блоттинг

После выделения гиппокампа из головного мозга крыс с селективной экстракцией цитоплазматических и нуклеарных белков при помощи набора «Mammalian Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit» (SERVA, Германия) экстракт нуклеарных белков сохранялся до проведения анализа при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Перед началом электрофореза образцы размораживались при комнатной температуре и эквивалентно разводились буфером для образцов «Tris/Glycine/SDS» (SERVA, Германия) с добавлением меркаптоэтанола, а затем подогревались в течение 5 минут при  $95^{\circ}\text{C}$  на твердотельном термостате.

Электрофорез белков проводился в готовом 8% акриламидном геле «TG PRiME» (SERVA, Германия). Для измерения общего содержания белка в образцах и определения объема для внесения использовался микрометод Лоури на спектрофлуориметре «CM2203» («Солар», Белоруссия). Процедура электрофореза проводилась в камере «miniVE Amersham Biosciences» (GE Healthcare, США) в течение 90 минут при 20 мА и 230 В. Для переноса белков с геля на поливинилденфторидные мембраны использовался набор буферов «Semi-Dry Blotting Buffer» (SERVA, Германия). Полусухой блоттинг проводился на системе «TE77 Amersham» (GE Healthcare, США) при 65 мА в течение 60 мин.

Блокирование неспецифических антигенов на мембране проводилось раствором «BlueBlock PF» (SERVA, Германия) в течение 60 минут. После чего проводилась инкубация в течение ночи при  $+4^{\circ}\text{C}$  с первичными антителами к HIF-1 $\alpha$  (Thermo Fisher, Кат. № SA5-10211, США) и  $\beta$ -актину (Thermo Fisher, Кат. № MA5-15739, США), в разведении 1:1000, и далее со вторичными антителами (разведение 1:10000), конъюгированными с пероксидазой хрена (Thermo Fisher, Кат. № A27-025, США) в течение 2 часов при комнатной температуре.

Хемилюминисцентная детекция проводилась при помощи набора «SERVALight Eos» (SERVA, Германия) и гель-документирующей системы

«Amersham Imager 600 UV» (GE Healthcare, США) в полуавтоматическом режиме с последующей денситометрией на программе «ImageJ 1,41» (Scion Inc., США).

#### 2.1.13. Оценка синтетической активности в околоинсультной области головного мозга крыс

Препараты после гистологической подготовки секционировались (толщина среза 10 мкм). Далее проводилось окрашивание ядрышковых организаторов методом импрегнации серебром для выявления белков, афинных к Ag в области ядрышковой активности с использованием набора «AgNORs» (BioOptica, Италия) [Husain N. et al., 1997]. Подсчет количества ядрышковых организаторов выполнялся не менее чем в 100 клетках из околоинсультной области не менее чем в 5 полях зрения. Общая площадь для проведения анализа на гистологических срезах составляла 1 мм<sup>2</sup>. Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

#### 2.1.14. 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) [Guan N. et al., 2013]. Через 24 ч после начала измерения в половине лунок планшетов моделировали химическую гипоксию: сокультуру астроцитов и нейронов инкубировали с йодацетатом натрия в течение 30 мин при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Конечная концентрация йодацетата натрия в среде составляла 50 мкМ. По окончании инкубации клетки отмывали и полностью меняли культуральную среду, после чего продолжали культивирование клеток в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение 24 ч. Электроды в лунках планшетов «xCelligence» регистрируют изменения сопротивления, вызванные присутствием клеток, а

специализированное программное обеспечение рассчитывает показатель клеточного индекса (КИ).

КИ является импедансозависимым и определяется количеством и размерами клеток. В лунки планшета добавляли по 100 мкл суспензии клеток (нейроны, астроциты) для создания сопоставимого исходного количества клеток и 100 мкл среды для культивирования. Соотношение нейронов и астроцитов 1:2, общая клеточность —  $3 \cdot 10^4$  в каждой лунке. Для каждой группы количество индивидуальных повторов в лунках планшетов составляло не менее трёх. В качестве контроля для нормализации индекса использовалась культуральная среда без клеток. Инкубацию проводили в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C.

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.

#### 2.1.15. Иммуногистохимическая оценка содержания GRP-78 и NF-κB в околоинсультной области головного мозга крыс

Препараты после гистологической подготовки секционировали (толщина среза 10 мкм). Иммуногистохимическое исследование проводили непрямым двухшаговым стрептавидин-биотиновым методом с контролем специфичности реакции. После стандартной процедуры депарафинизации и регидратации выполняли блокирование эндогенной пероксидазы согласно рекомендациям производителя антител (Santa Cruz Biotechnology, США). Восстановление антигенной специфичности проводили с помощью предварительной обработки срезов, погруженных в цитратный буфер (pH = 6.0), и трехкратного 7-минутного воздействия микроволнового излучения мощностью 600Вт.

В качестве первичных антител использовали антитела к NF-κB (Santa Cruz Biotechnology, Кат. №sc-101744, США) и к шаперону GRP-78 (Santa

Cruz Biotechnology, Кат. №sc-1050, США) в рабочих разведениях 1:50. Продукты реакции визуализировали с помощью набора Goat ABC Staining system (Santa Cruz Biotechnology, Кат. №sc-2023, США) и диаминобензидина.

Анализ содержания иммунопозитивных клеток проводили на микроскопе «SX51» (Olimpus, Япония) с помощью программного комплекса «ImageJ 1,41» (Scion Inc., США). Согласно методике, интенсивность белого спектра (максимальное значение - 255, минимальное - 0) в цитоплазме и ядре считалась обратно пропорциональной уровню экспрессии антигена. Анализировали не менее 100 клеток из околоинсультной области не менее чем в 5 полях зрения. Общая площадь для проведения анализа на гистологических срезах составляла 1 мм<sup>2</sup>. Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

#### 2.1.16. Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера

Оценка проницаемости ГЭБ проводилось путем фотометрического измерения содержания красителя Эванса голубого (Sigma-Aldrich, США), в объеме 4 мл/кг веса животного в плазме крови и флуоресцентной микроскопии ткани головного мозга через 24 часа после его внутрибрюшинного введения [Manaenko A. et al., 2011].

Животные перед декапитацией подвергались транскардиальной перфузионной фиксации (введение 500 мл PBS, а затем 250 мл 4% PBS-забуференного параформальдегида) под анестезией хлоралгидратом (400 мг/кг, внутрибрюшинно). После перфузионной фиксации головной мозг извлекался, с последующим хранением в течение 2 суток в р-ре 30% сахарозы. Далее головной мозг секционировался на вибротоме (толщина фронтальных срезов 60 мкм). Секционированные срезы индивидуально переносились в культуральные 24-луночные планшеты. После промывки р-ром PBS срезы переносились на предметные стекла, после чего на них наносился флюоромаунт с добавлением DAPI и покровные стекла. Анализ интенсивности флуоресценции Эванса голубого в ткани головного мозга

проводился на конфокальном микроскопе «FV10i-W» (Olympus, Япония) при 650 нм. Микрофотографии обрабатывались при помощи программы «ImageJ 1,41» (Scion Inc., США). Определялась флуоресцентная интегративная оптическая плотность Эванса голубого с последующим расчетом индекса проницаемости по концентрации красителя в крови [Xu Y. et al., 2019]. Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

Перед началом транскардиальной перфузии у крыс из левого желудочка сердца шприцем (с 10 мкл 10% р-ра этилендиаминтетрауксусной кислоты) собирали 200 мкл крови. Затем кровь центрифугировали в течение 5 минут при 3000 rpm и замораживали до проведения анализа при -20°C. После размораживания к крови добавляли такой же объем 50% трихлоруксусной кислоты, инкубировали ночь при 4°C, центрифугировали (30 минут при 13000 об/мин, 4°C). Определение содержания красителя в крови осуществляли фотометрически (при 610 нм) с использованием планшетного фотометра «Multiscan FS» (Thermo Scientific, США) по калибровочным кривым.

#### 2.1.17. Оценка резистентности крыс к острой гипобарической гипоксии

Резистентность крыс к острому дефициту кислорода определяли по устойчивости к острой гипобарической гипоксии [Лукьянова Л.Д., 2011]. Острая гипобарическая гипоксия моделировалась в барокамере с объемом 7 л (рисунок 2.9). Воздух из барокамеры откачивался вакуумным насосом в течение 1 минуты. Уровень атмосферного давления в ходе эксперимента контролировался альтиметром. Атмосферное давление в барокамере соответствовало высоте 11500 м над уровнем моря (180 мм рт. ст.). Для восстановления исходного уровня атмосферного давления барокамера имела впускной клапан. После выключения вакуумного насоса восстановление давления происходило в течение 1 минуты. После установления в барокамере давления 180 мм рт. ст. регистрировались параметры: время потери позы

(ВПП, сек) и время жизни (ВЖ, сек). Регистрация проводилась тремя экспериментаторами, двое из которых не знали о назначении группы. Время фиксировалось с помощью электронного секундомера. ВПП – период от момента установления атмосферного давления 180 мм рт. ст. до момента принятия крысой бокового положения с переходом на патологические типы дыхания. Этот параметр характеризует устойчивость организма к экстремальным условиям (состояние двигательной активности и дыхания). ВЖ – период от момента установления атмосферного давления 180 мм рт. ст. до наступления агонии (патологический тип дыхания до 2 агонального вдоха). Этот параметр характеризует предельные возможности защитных функций организма (жизнеспособность организма в условиях острого дефицита кислорода). После завершения экспериментов все крысы выживали и восстанавливали активное поведение без видимых признаков патологии.

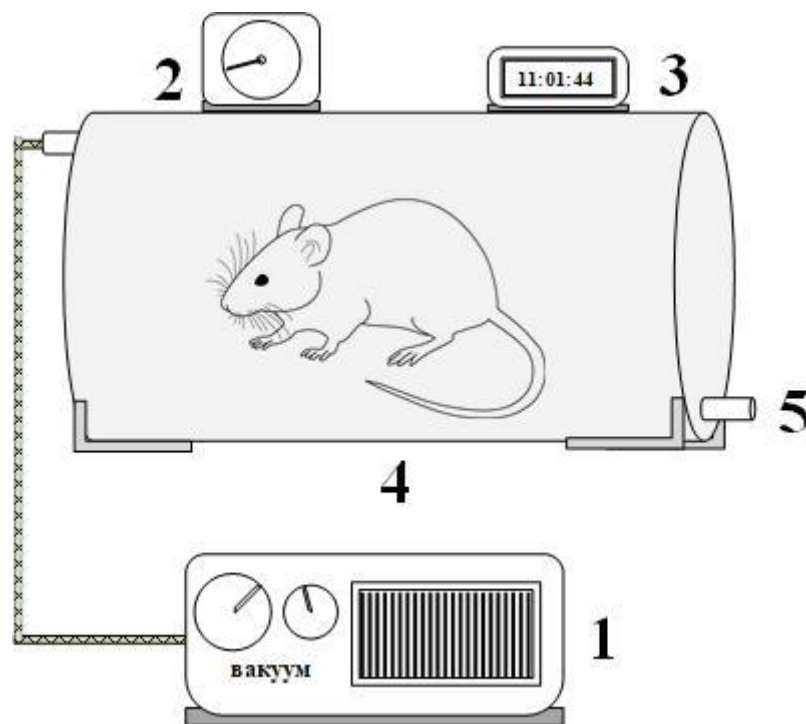


Рисунок 2.9. Установка для моделирования острой гипобарической гипоксии. 1 – вакуумный компрессор; 2 – альтиметр; 3 – электронный таймер; 4 – герметичная камера, 5 – впускной клапан.

#### 2.1.18. Модель транзиторной ишемии головного мозга и оценка выживаемости нейронов гиппокампа

Для моделирования транзиторной ишемии у наркотизированных крыс (внутрибрюшинное введение 3% р-ра хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг) производилась билатеральная окклюзия общих сонных артерий на 20 минут [Sharifi Z.N. et al., 2012]. Выполнялся продольный разрез кожи шеи, затем послойное разделение фасций и мышц шеи до гортани. Окклюзия отсепарированных общих сонных артерий проводилась при помощи шелковой нити таким образом, чтобы воздействие на окружающие мягкие ткани, сосуды и нервы было минимальным. Спустя 72 часа после моделирования транзиторной ишемии, животные были подвержены эвтаназии путем декапитации с последующим извлечением головного мозга для морфологической оценки выживаемости нейронов в СА1 регионе гиппокампа на световом микроскопе «Микмед 6, вар.7» (ЛОМО, Россия).

После декапитации и извлечения, из мозга секционировался участок больших полушарий между 2,5-8,5 мм от края затылочных долей и проводилась гистологическая обработка с окраской по Ниссля. Далее исследовался участок гиппокампа в промежутке между 4,8 и 5,8 мм от интерауральной линии и 3,3 – 3,4 мм от линии Bregma во фронтальном разрезе, что соответствует участку больших полушарий мозга на расстоянии 5,5 мм от края затылочных долей. Затем выполнялся подсчет поврежденных и уцелевших клеток в СА1 регионе гиппокампа [Zhan L. et al., 2010]. Анализировали не менее 100 клеток не менее чем в 5 полях зрения. Общая площадь для проведения анализа на гистологических срезах составляла 1 мм<sup>2</sup>. Анализ микрофотографий проводили исследователи, не знающие о назначении группы.

#### 2.1.19. Поведенческое тестирование и оценка мышечной силы у мышей.



Процедура поведенческого тестирования в установке «Открытое поле» включала подготовку, направленную на минимизацию стрессовых воздействий на животное, и собственно тестирование [Hall C.S., 1936]. Во время тестирования регистрировали горизонтальную двигательную активность по количеству пересеченных секторов, вертикальную двигательную активность по количеству «вставаний» на задние лапы; продолжительность исследования «норок» (отверстий в полу) в секунду за все время теста. Тест позволяет оценить эмоционально-поведенческую реактивность животного и стратегию исследовательского/оборонительного поведения [Hall C.S., 1936; Gould T.D. et al., 2010].

Установка «Темно-светлая камера» использовалась в исследовании для оценки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), который основан на врожденном стремлении мышей к ограниченному замкнутому пространству [Bourin M. and Hascoët M., 2003]. Экспериментальная камера состояла из 2-х отделений, большего (освещенного) и меньшего (затемненного с электропроводным полом). В течение 3 минут регистрировали общее время пребывания животного в меньшем отделении и время первого перехода в него. По истечении 3 мин в момент, когда мышь находилась в затемненном отделении, ей наносили электроболевое раздражение силой тока 0,45 мА и напряжением 30 В до тех пор, пока животное не выбегало в освещенное отделение. Сохранность УРПИ тестировали через 24 ч после его выработки путем помещения мыши в освещенное отделение. При оценке сохранности УРПИ учитывали общее время пребывания в затемненном отсеке и разницу во времени пребывания в затемненном отделении до выработки УРПИ и при его тестировании ( $\Delta t$ ).

Для изучения мышечной силы и физической утомляемости мышей использовалась струна, натянутая на высоте 75-80 см [Jackson H.F. and Broadhurst P.L., 1982]. Животным давалась возможность ухватиться за струну передними лапами, и в таком положении они весели до момента утомления и падения – так измерялось «время удержания». Через 20 минут процедура

повторялась и вычислялось среднее значение из двух измерений и разница между временем удержания при первой и второй попытке.

## **2.2. Клиническая часть исследования**

### **2.2.1. Пациенты и рандомизация**

Рандомизированное тройное слепое плацебо-контролируемое исследование проведено на 42 пациентах со спастической формой детского церебрального паралича в возрасте от 3 до 7 лет. Пациенты рандомно распределялись в группу А (группа плацебо, n=20), где происходила имитация респираторных тренировок атмосферным воздухом, или в группу В (группу воздействия гиперкапнической гипоксией, n=22), в которой проводились респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией.

Пациенты, принимавшие участие в исследовании, находились на лечении в условиях стационара «Алтайский краевой психоневрологический детский санаторий», куда поступали с уже установленным диагнозом. Исследование выполнено в соответствии с разрешением Локального этического комитета ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава РФ (протокол №3 от «4» апреля 2015 г.). Оценка неврологического статуса проводилась с помощью валидированных неврологических шкал (см. раздел 2.2.4).

Критерии включения в исследование:

1. Наличие ДЦП в форме спастической диплегии или гемиплегии.
2. Возраст от 3 до 7 лет;
3. Уровень глобальных моторных функций по классификации GMFCS I – III;
4. Возможность вступления в контакт по классификации CFCS I до III;
5. Уровень мануальных моторных функций по классификации MACS I – III;
6. Отсутствие в анамнезе хирургического лечения;
7. Отсутствие в анамнезе ботулинотерапии 6 и более месяцев;
8. Отсутствие острых инфекционных и воспалительных заболеваний.

Критерии исключения из исследования:

1. Обнаружение симптомов острых инфекционных и воспалительных заболеваний.
2. Возникновение стойких неблагоприятных эффектов в виде тахикардии (ЧСС 110 и более ударов в минуту), повышения артериального давления (150/100 мм рт. ст. и более), головной боли и головокружения.

Стандартное лечение включало медикаментозную терапию с использованием ноотропной терапии (пирацетам), массаж классический, теплолечение с использованием парафина и озокерита, лечебная гимнастика, ортопедические укладки, иппотренажер, динамическая проприоцептивная коррекция с использованием костюма «Адели» (Россия), вертикализация пассивная, если ребенок не способен к самостоятельной вертикализации, электростимуляция антагонистов спастичных мышц, логопедические занятия по показаниям, светотерапия на рефлекторные зоны (Биоптрон, Россия) и групповые занятия с психологом по показаниям.

#### 2.2.2. Схема проведения исследования

Перед началом исследования и на следующий день после завершения курса тренировок пациенты проходили неврологическое и нейрофизиологическое обследование (Рис. 2.10). Диагностические исследования, терапевтические процедуры и неврологический осмотр проводились специалистами, не имевшими информации о принадлежности пациента к определенной группе исследования.

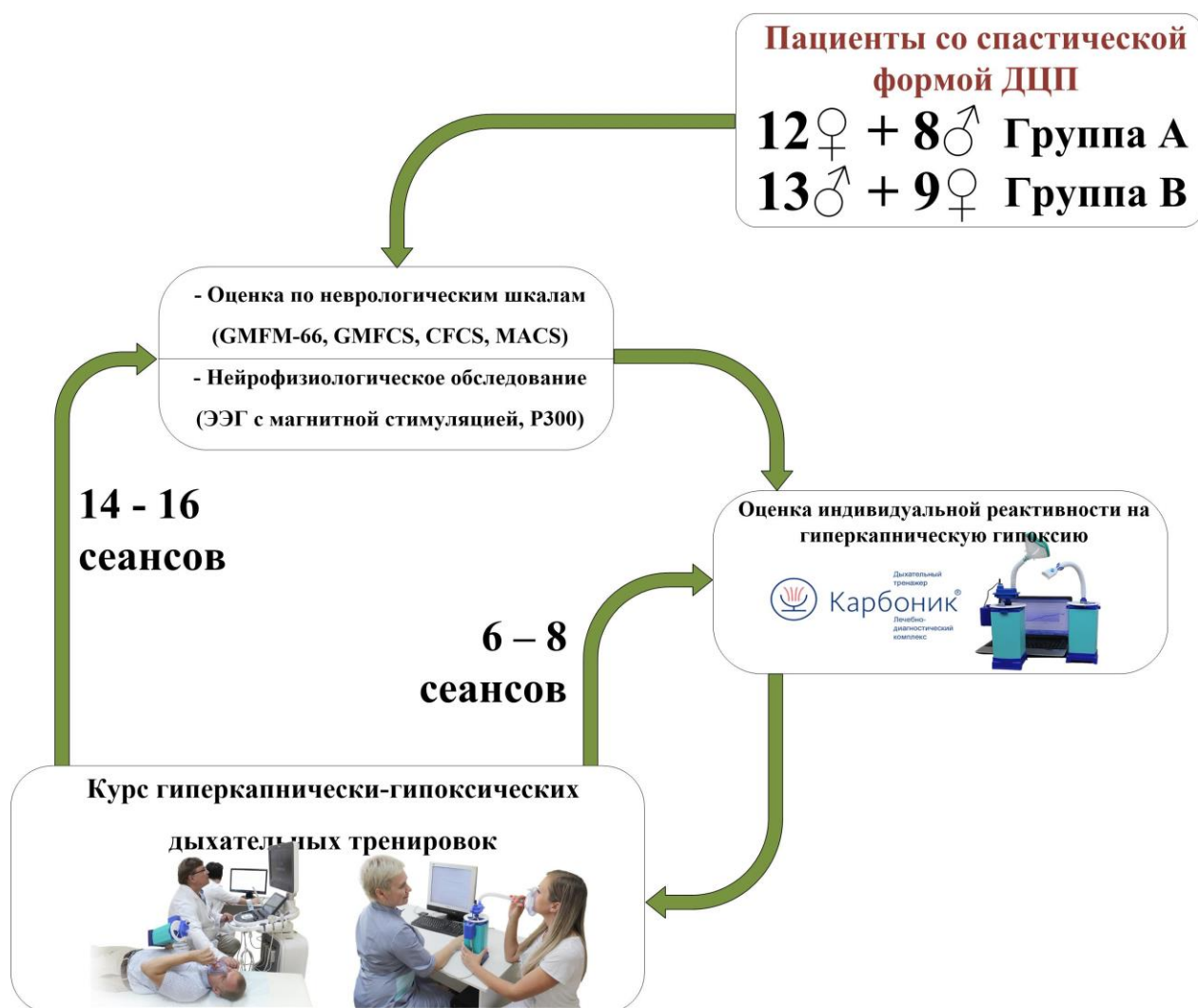


Рисунок 2.10. Схема дизайна клинического блока. Группа А - группа сравнения с плацебо; группа В - группа воздействия гиперкапнической гипоксией; ЭЭГ – электроэнцефалограмма; ДЦП – детский церебральный паралич.

В группе воздействия гиперкапнической гипоксией пациенты проходили курс гиперкапнически-гипоксических тренировок на дыхательном тренажере «Карбоник» (НПК «Карбоник», Россия) продолжительностью от 14 до 16 сеансов, в зависимости от срока пребывания в стационаре. Тренировки проходили под контролем медицинского специалиста, не имевшего информации о принадлежности пациента к определенной группе. В группе плацебо пациенты проходили аналогичные процедуры, но

тренировки проходили на плацебо-тренажерах той же модели, но с измененной конструкцией, не отличающейся внешне.

### 2.2.3. Методика гиперкапнически-гипоксических тренировок

Для каждого пациента подбирали оптимальный режим тренировочных воздействий на основе данных о концентрации углекислого газа и кислорода в выдыхаемом воздухе, измеренных с использованием лечебно-диагностического комплекса «Карбоник» (Рис. 2.11).

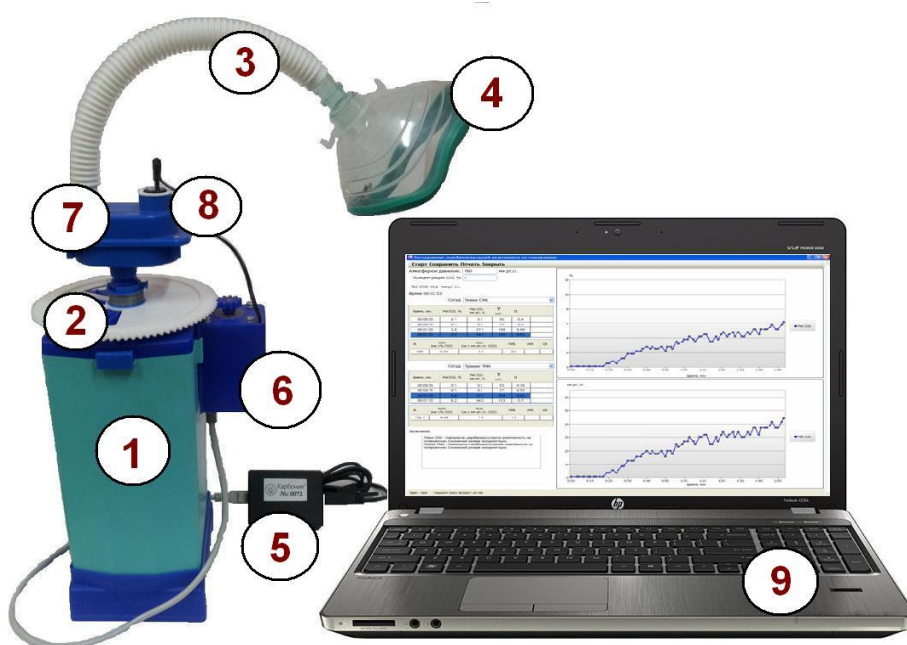


Рисунок 2.11. Лечебно-диагностический комплекс «Карбоник». 1 - корпус со встроенной ячеистой кассетой; 2 - заслонка, изменяющая дополнительный объем мертвого пространства; 3- дыхательная трубка; 4 – дыхательная маска; 5 – электронный блок управления; 6 - электропривод заслонки; 7 - узел разделения воздушных потоков; 8 - датчик газоанализа; 9 – персональный компьютер с программным обеспечением.

Оптимальным считался режим дыхательных тренировок, при котором удавалось стабильно поддерживать целевое значение  $F_{etCO_2}$  в диапазоне 5-6%. В соответствии с показаниями газоанализатора, этому значению соответствовало значение  $F_{etO_2}$  в диапазоне 15-16%. Прибор также

автоматически рассчитывал значения  $P_{etCO_2}$  и  $P_{etO_2}$  в мм рт.ст. по уровню актуального атмосферного давления. Для достижения целевого значения концентрации альвеолярных газов изменялся дополнительный объем мертвого пространства (ДОМП) посредством изменения положения заслонки прибора, которая закрывала или открывала ячейки встроенной в корпус кассеты, регулируя ДОМП в диапазоне от 500 до 1000 мл. В случае, если значение  $P_{etCO_2}$  было больше целевого при минимальном значении ДОМП в 500 мл, заглушку, герметично закрывающую специальное отверстие в днище прибора, заменяли на одну из заглушек с калибровочным отверстием диаметром 5 или 10 мм. Это обеспечивало дополнительное поступление в прибор атмосферного воздуха и позволяло достигать целевого значения  $P_{etCO_2}$ , в случае его превышения при использовании герметичной заслонки. Отмечалось оптимальное значение ДОМП (от 500 до 1000 мл с шагом в 25 мл) в месте совмещения риски на корпусе прибора и на заслонке, при котором  $P_{etCO_2}$  находилось в диапазоне 5-6%, в течение, как минимум, 2-х минут. Отмеченное значение (мл), и соответствующую калибровочную заглушку использовали для ежедневных тренировок на дыхательном тренажере «Карбоник». Процедура подбора режима тренировок (определение значения ДОМП, при котором поддерживалось целевое значение  $P_{etCO_2}$  в диапазоне 5-6%) повторялась спустя 6-8 тренировок и, при необходимости, корректировалось тренировочное значение ДОМП и использование калибровочной заглушки на оставшийся период респираторных тренировок. Все показатели концентрации альвеолярных газов и подробные комментарии о поведении детей отражались в протоколе подбора режима тренировок.

В группе воздействия гиперкапнической гипоксией и группе плацебо пациенты проходили аналогичные процедуры с применением дыхательного тренажера «Карбоник» (Рис. 2.12). Различия были только в состоянии коннектора. В группе плацебо (Рис. 2.12А) отверстие коннектора было открыто так, что дыхание производилось из атмосферы, минуя ДОМП, а в

группе воздействия (Рис. 2.12В), дыхание происходило через тренажер, что сопровождалось созданием в организме гиперкапнической гипоксии. При этом важно, что приборы вариантов А и В внешне между собой не различались.

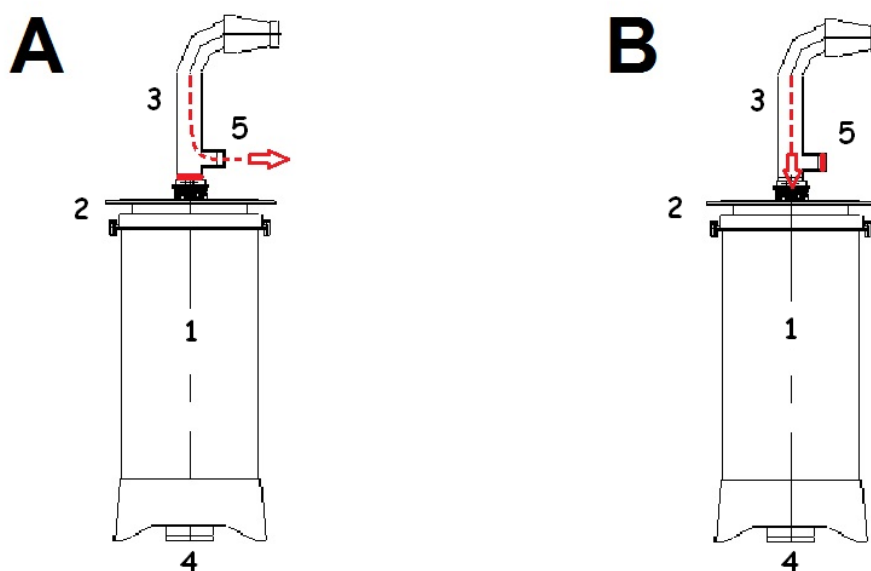


Рисунок 2.12. Дыхательный тренажер «Карбоник». 1 - корпус со встроенной ячеистой кассетой; 2 - заслонка, изменяющая дополнительный объем мертвого пространства; 3- дыхательная трубка; 4-заглушка в днище прибора; 5-коннектор. Стрелками и пунктиром показано движение выдыхаемого воздуха при открытом (А, группа плацебо) и закрытом (В, группа воздействия гиперкапнической гипоксией) отверстии коннектора.

Дыхательные тренировки проводили ежедневно по 20 минут в групповом режиме, приблизительно в одинаковое время дня. При затруднениях во время тренировки допускали перерывы продолжительностью до 60 секунд.

#### 2.2.4. Оценка неврологического статуса

Клиническую оценку динамических изменений в ходе исследования проводил детский невролог дважды – за день до начала дыхательных

тренировок и на следующий день после их завершения. Клиническое обследование включало оценку мышечного тонуса и оценку двигательных навыков по шкале General Motor Function Measure (GMFM-66) [Russell D.J. et al., 2010].

Шкала GMFM разработана для оценки изменений моторных функций у детей с ДЦП в возрасте от 5 месяцев до 16 лет. Категория нарушений по данной шкале не включается в структуру диагноза, но является признанным стандартом для оценки эффективности реабилитации. Наиболее часто применяется вариант шкалы GMFM-66, являющийся информативным и быстрым. В зависимости от результатов оценки моторных функций нарушения относят к одной из пяти категорий:

- 0 – 20% – 5 категория (максимальная степень тяжести);
- 20 – 40% – 4 категория;
- 40 – 60% – 3 категория;
- 60 – 80% – 2 категория;
- 80 – 100% – 1 категория (минимальная степень тяжести).

Для оценки качества рандомизации и определения соответствия пациентов критериям включения перед началом курса респираторных воздействий все пациенты дополнительно оценивались по классификациям GMFCS (Gross Motor Function Classification System) [Palisano R.J. et al., 2008], CFCS (Communication function classification system) [Hidecker M.J. et al., 2011] и MACS (Manual Ability Classification System) [Eliasson A. et al., 2007].

В классификации GMFCS выделяют 5 уровней, отражающих степень тяжести, где V уровень – максимальная степень тяжести, а I уровень – минимальная степень тяжести. Для разных возрастных категорий (до 2 лет; 2-4 года; 4-6 лет; 6-18 лет) применяются критерии для определения уровня нарушений.

Система классификации CFCS описывает возможности установления коммуникаций ребенка в повседневной жизни в форме 5 уровней коммуникации от максимальной (I уровень) до минимальной (V уровень).



Система классификации MACS описывает возможности самостоятельной двуручной деятельности ребенка в повседневной жизни от I уровень (минимальная степень тяжести) до V уровень (максимальная степень тяжести).

#### 2.2.5. Нейрофизиологическое обследование

Нейрофизиологическое исследование проводилось перед началом и после окончания респираторных тренировок и включало регистрацию ЭЭГ, магнитную стимуляцию пирамидного тракта с определением порога возбудимости корковых мотонейронов [Куликов В.П. и др., 2004], когнитивные (эндогенные) вызванные потенциалы P300. Все исследования были проведены на аппаратах фирмы «Nicolet Biomedical Inc.» (США). Регистрация ЭЭГ проводилась по международной системе «10-20» с использованием стандартных функциональных проб (реакция открывания глаз, фотостимуляция и гипервентиляции) при монополярных (R-18.1) и биполярных отведениях (LB-18.1), чувствительности 7 мкВ, фильтрах низких и высоких частот 0,5 и 70 Гц.

Для регистрации когнитивных вызванных потенциалов (методика P300) применялась слуховая стимуляция. Стимулы подавались с вероятностью появления 20% для значимых и 80% для незначимых стимулов. Пациенту предлагали реагировать нажатием на кнопку пульта в ответ на редкий значимый стимул. Для регистрации использовали монополярные отведения Fr1- M1 и Fr2-M2 по системе 10-20 с расположением заземляющего электрода в точке Frz. Измеряли латентность пиков P1, N1, P2, N2, P3 и амплитуду пиков N2, P3. Для магнитной стимуляции использовали электромиограф, синхронизированный с магнитным стимулятором. Оценивали порог, латентность, амплитуду и фазность вызванного моторного ответа, время центрального моторного проведения.

### 2.3. Математико-статистическая обработка результатов

Размер общей выборки и размер выборки каждой группы рассчитывался по результатам предыдущих исследований на аналогичной модели по методу количественной шкалы [Dell R.B. et al., 2002]. 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. В случаях несоблюдения условий нормальности распределения использовались методы непараметрической статистики: сравнение между независимыми группами производилось по непараметрическому критерию Манна-Уитни, а между зависимыми группами по критерию Вилкоксона. Для сравнения различий между несколькими группами использовался критерий Краскела-Уоллиса.

Анализ выживаемости мышей проводился методом Каплан-Майера при помощи log-rank test с применением F-теста Кокса для расчета p-уровня [Harrison D.E. et al., 2009].

Количественные данные при соблюдении закона нормального распределения представлены в виде среднего ( $M$ )  $\pm$  среднеквадратичное отклонение ( $\sigma$ ); при отсутствии нормального распределения - в виде медианы ( $Me$ ), 25 и 75 перцентилей ( $P_{25}$  и  $P_{75}$ ). Достоверными считались различия, для которых вероятность ошибки ( $p$ ) была меньше 0,05. Данные на блоковых графиках представлены в виде медианы,  $P_{25}$ ,  $P_{75}$ , минимума и максимума.

## ГЛАВА 3

### РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### **3.1. 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.**

##### **3.1.1. Синтетическая активность нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс.**

У всех животных во всех экспериментальных сериях и блоках настоящего исследования, для которых выполнялась модель фотохимического тромбоза, обнаружены типичные фотохимические инсульты с участием всех слоев сенсомоторной коры головного мозга. В зоне инфаркта на всех срезах из области ишемического повреждения различались фиброзные изменения и микрососуды с наличием тромбов, что характерно для модели фотохимического тромбоза [Pevsner P.H. et al., 2001; Barth A.M. and Mody I., 2011]. Морфологическая картина была сходной во всех экспериментальных группах, а отличия были обусловлены размером зоны инфаркта в головном мозге.

В околоинсультной области коры головного мозга на парафиновых срезах наблюдалось различное количество областей ядрышкового организатора в нервных клетках (Рис. 3.1). 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  $\text{CO}_2$ .

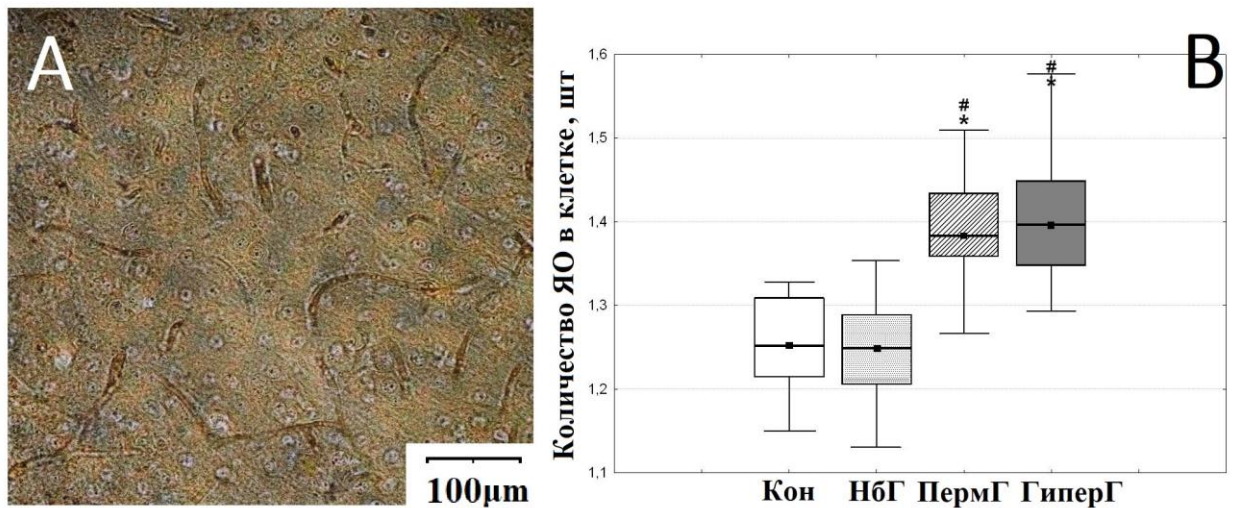


Рисунок 3.1. Микрофотография околоинсультной области головного мозга крысы, содержащего нервные клетки с ядрышковыми организаторами (А). Окраска методом импрегнации серебром (AgNORs). Увеличение  $\times 400$ . Содержание ядрышковых организаторов в 1 нервной клетке околоинсультной области (В). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ); # - различия статистически значимы по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.2. Динамика клеточного индекса у сокультур нейронов/астроциты после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии

Респираторное воздействие гипоксии и/или гиперкапнии, моделируемое у крыс *in vivo*, проявлялось различными тенденциями в динамике изменения клеточного индекса у сокультур астроцитов и нейронов *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.

Наиболее активная динамика в приросте КИ наблюдалась в течение первых 4 часов эксперимента: экспоненциальный базисный прирост у всех

групп (рис. 3.2). Такие высокие показатели связаны, прежде всего, с процессом осаждения клеток на дно лунок планшета и их распластыванием, которое происходит в первые часы наблюдения [Кувачева Н.В. и др., 2016]. Данный период представляется малоинформативным в оценке клеточного индекса, так как в большей мере зависит от морфофункциональных и физических факторов.

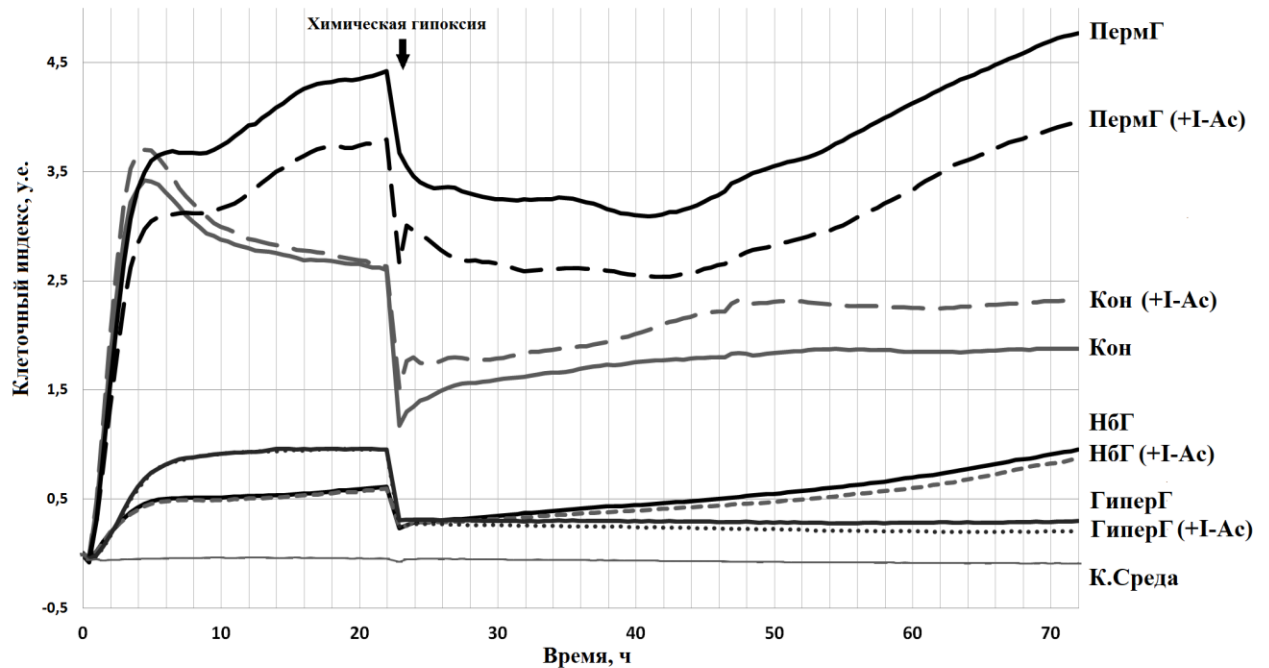


Рис. 3.2. Первичные показатели клеточного индекса для всех групп за весь период экспериментального наблюдения. Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; К.Среда — культуральная среда (фоновая ячейка); +I-Ac —добавление йодацетата натрия.

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 (Рис. 3.3). 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.

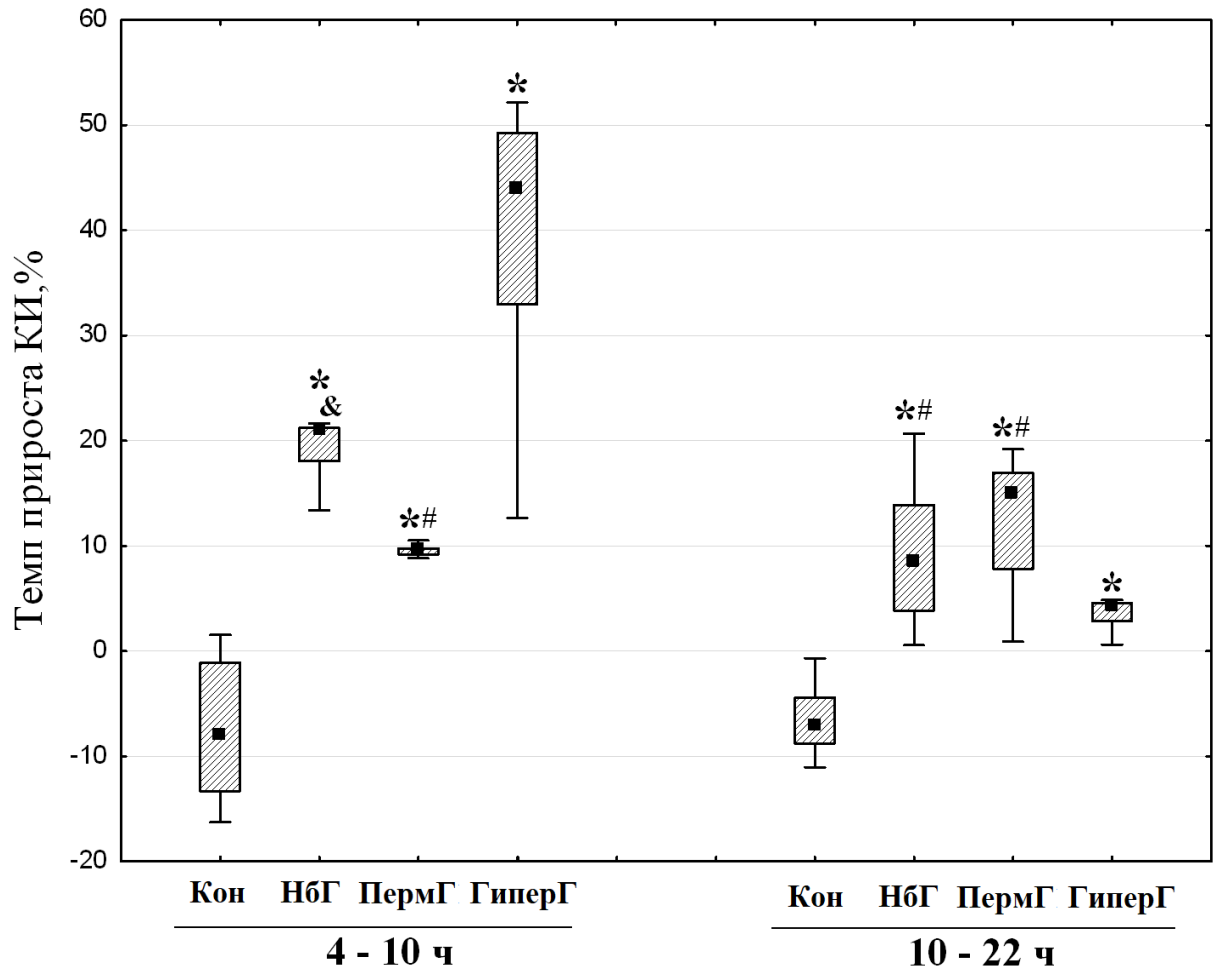


Рис. 3.3. Динамика клеточного индекса за 1-е сутки эксперимента. \* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ); КИ – клеточный индекс; Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; & - различия статистически значимы по сравнению с группой ПермГ ( $p < 0,001$ ). # - различия статистически значимы по сравнению с группой ГиперГ ( $p < 0,001$ ).

В интервале 24-36 ч после частичной смены среды в планшете наибольший прирост КИ наблюдался в группах контроля и НбГ (Рис. 3.4А), 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.

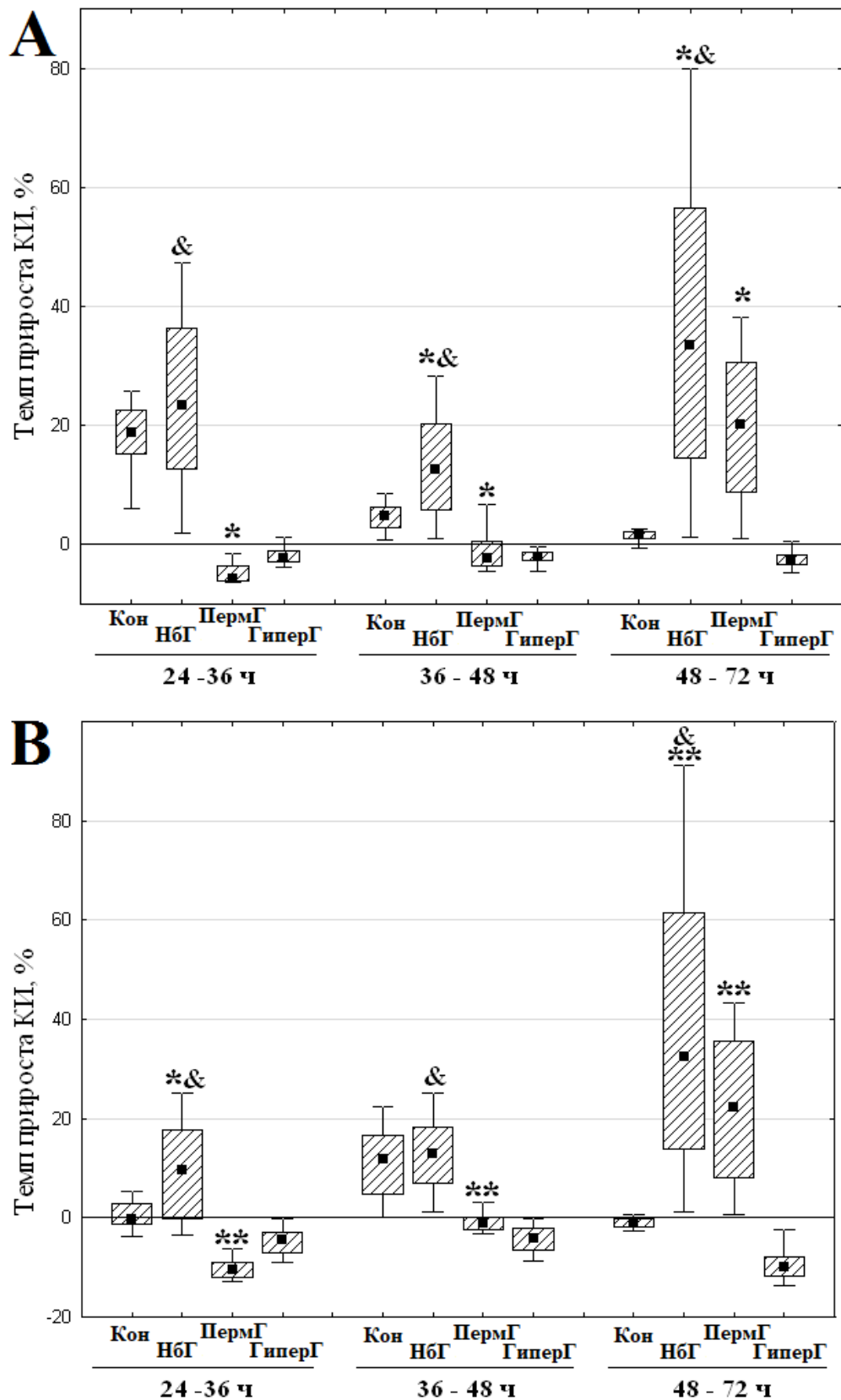


Рис. 3.4. Динамика клеточного индекса за 2-е и 3-и сутки эксперимента в образцах клеток без моделирования химической гипоксии (А) и после моделирования химической гипоксии (В). КИ – клеточный индекс; Кон –



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 ( $p < 0,001$ ).

Кроме того, для отдельных групп образцов через 24 часа после начала эксперимента моделировалась химическая гипоксия и проводился параллельный мониторинг показателя КИ (Рис. 3.4В). 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.

### 3.1.3. Содержание шаперона GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB в околоинсультной области головного мозга крыс.

В телах нейронов крыс из контрольной группы и группы ГиперГ отчетливо наблюдались выраженные различия по содержанию шаперона GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB (Рис. 3.5).

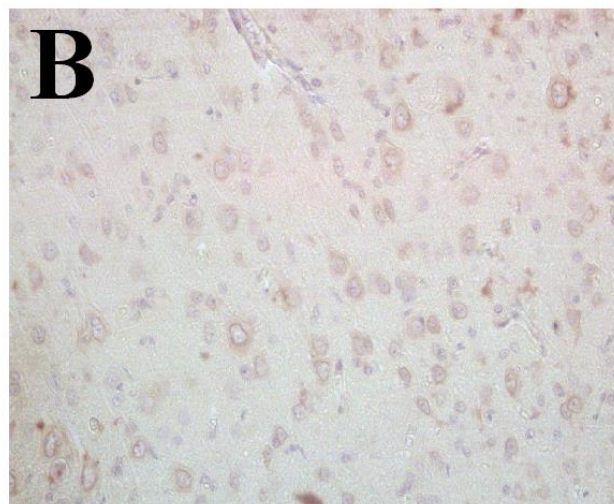
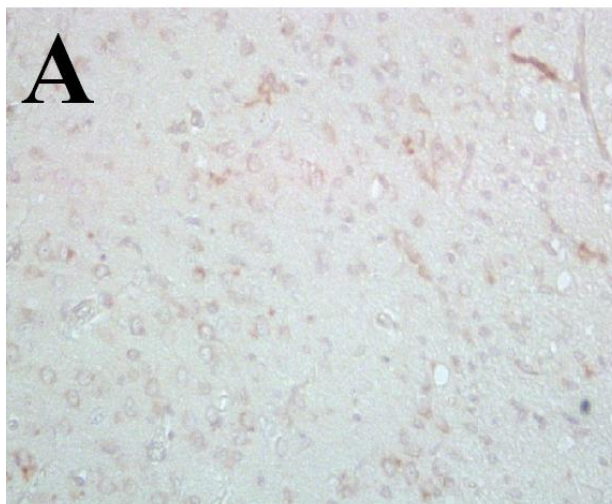
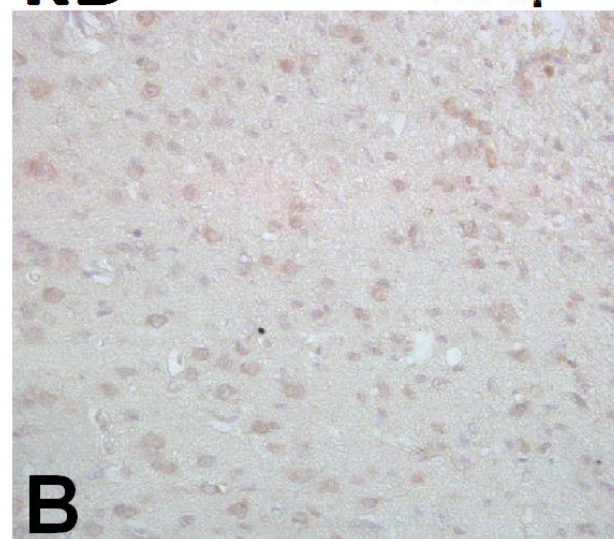
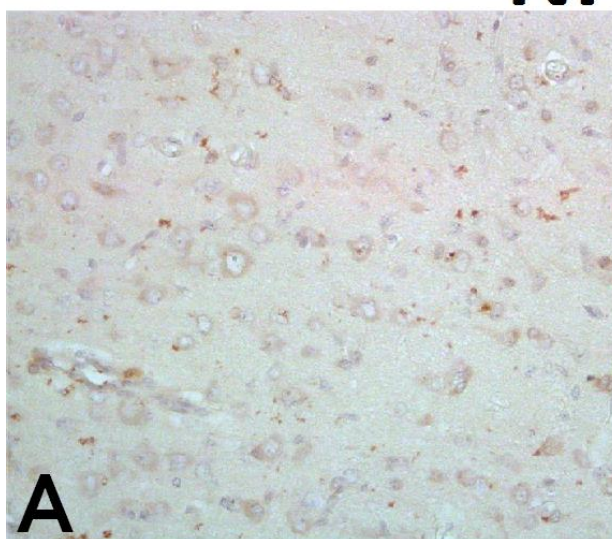
**GRP-78****NF-κB****100μm**

Рисунок 3.5. Околоинсультная область коры головного мозга экспериментальных животных. Увеличение  $\times 400$ . Содержание GRP-78 и NF- $\kappa$ B в цитоплазме нейронов у крыс из группы контроля (А) и у крыс из группы ГиперГ (В).

Уровень содержания белка GRP-78 в цитоплазме нейронов околоинсультной области был максимальным в группе ГиперГ (рис. 3.6), 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 был выше, чем в группе НбГ ( $p < 0,001$ ).

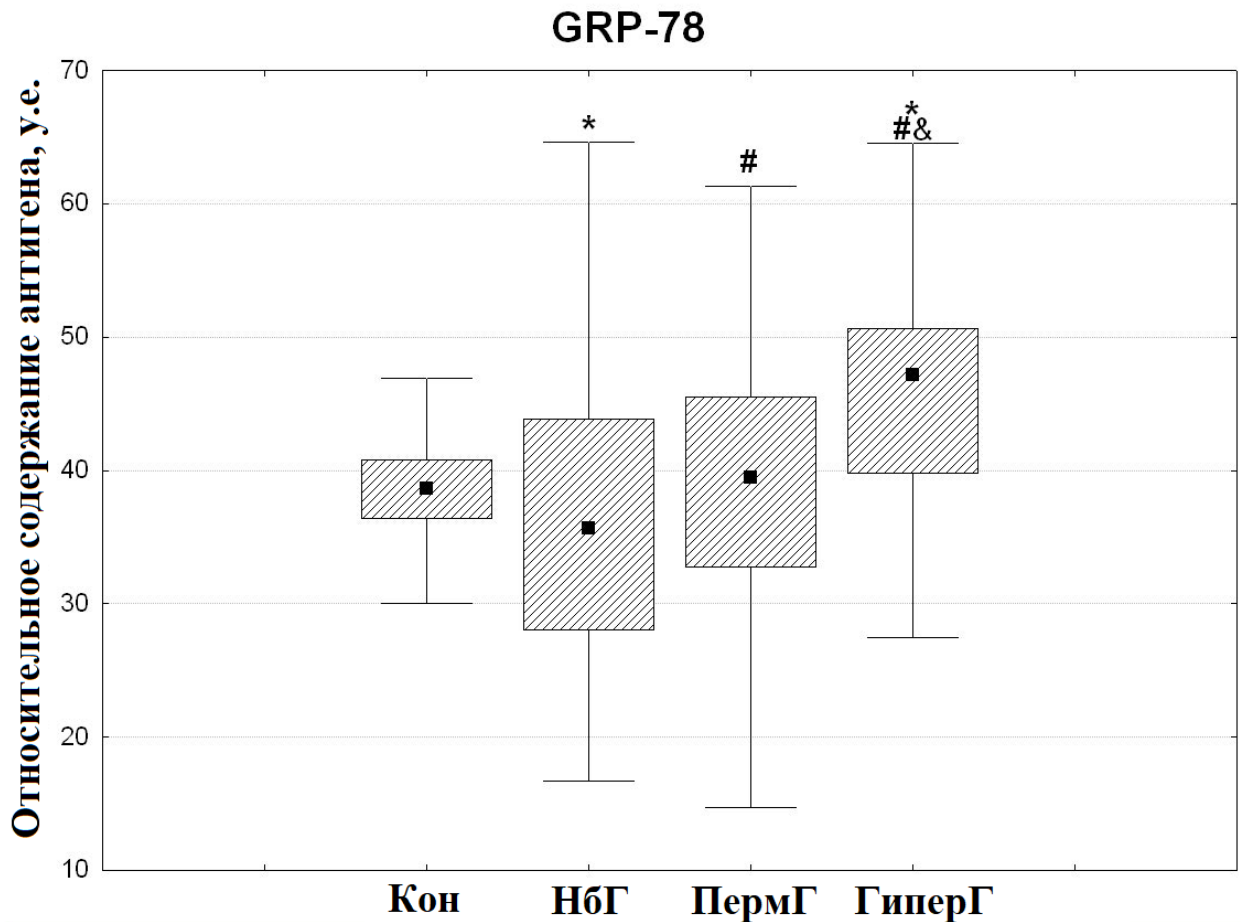


Рисунок 3.6. Содержание шаперона GRP-78 в цитоплазме нейронов околоинсультной области после изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии. Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - различия статистически 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 ( $p < 0,001$ ).

Содержание фактора NF-κB в цитоплазме нейронов околоинсультной области головного мозга было максимальным в группе ГиперГ ( $p < 0,001$ ) (рис. 3.7A). 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. 3.7B). 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.

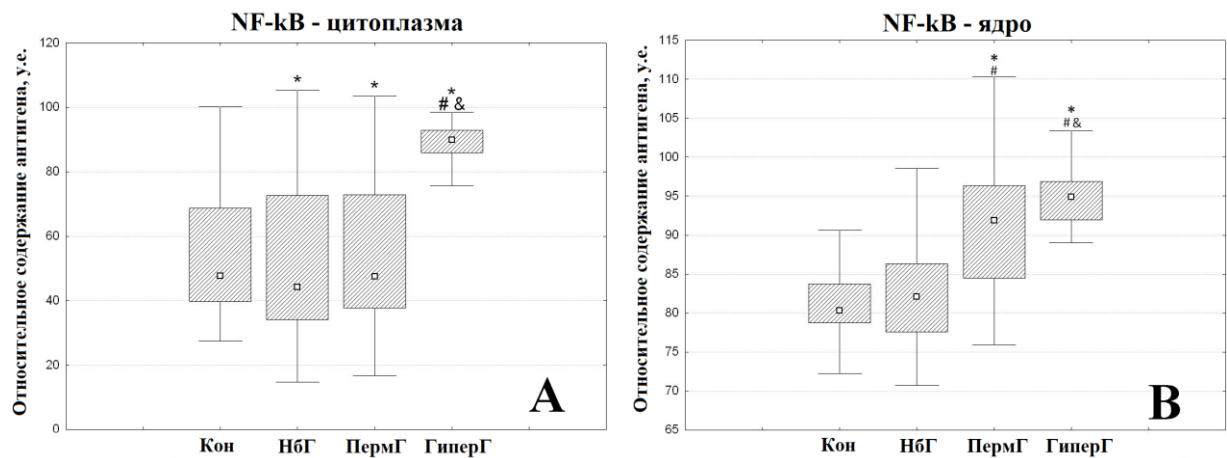


Рисунок 3.7. Содержание транскрипционного фактора NF-κB в цитоплазме (А) и ядре (В) нейронов в околоинсультной области после изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии. Кон – контрольная группа; НБГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая 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 ( $p < 0,001$ );

### 3.2. Ингибирование апоптоза в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов и нейронов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии

#### 3.2.1. Интенсивность апоптоза в околоинсультной области коры головного мозга крыс

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 (Рис. 3.8). Об этом свидетельствует сниженный уровень апоптотических нервных клеток в группе пермиссивной гиперкапнии по сравнению с контрольной группой (в 5 раз), 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 пермиссивной гиперкапнии в 5,8 раз и в 4,3 раза, соответственно.

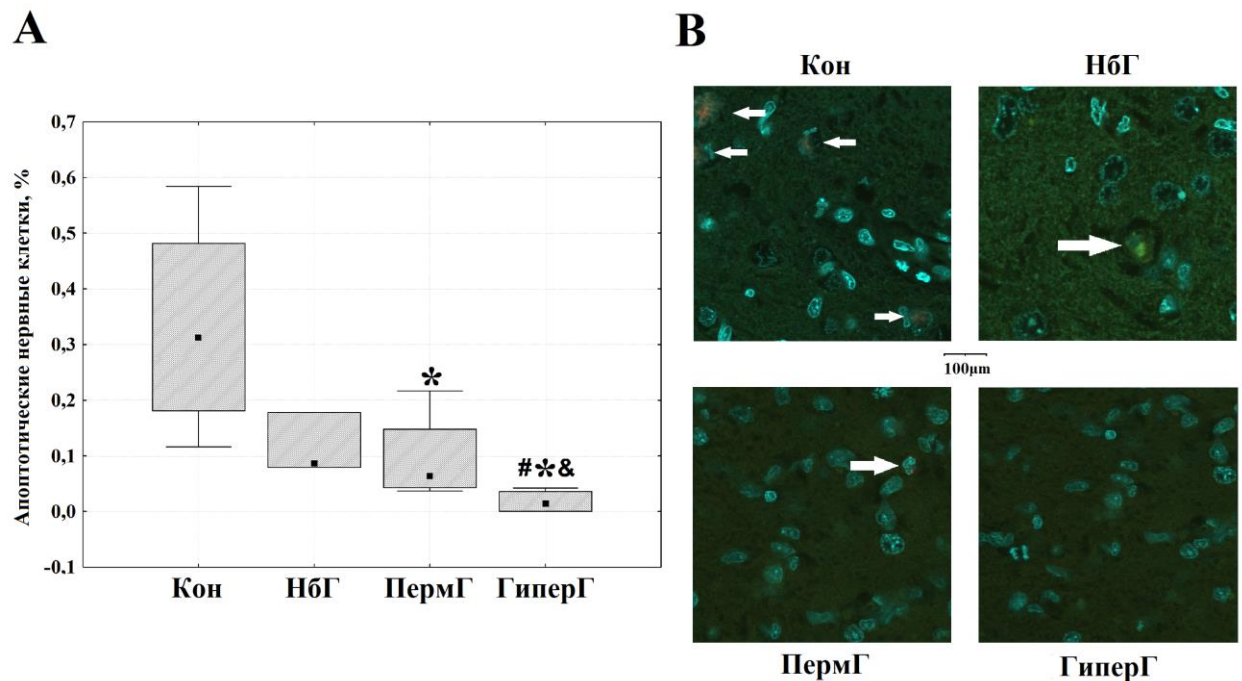


Рисунок 3.8. Относительное содержание апоптотических нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); # - различия статистически значимы по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,05$ ); & - различия статистически значимы по сравнению с группой ПермГ ( $p < 0,05$ ); Микрофотографии срезов коры головного мозга крыс (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; Красный цвет – участки фрагментации ДНК, индуцированные ДНКазами I типа, меченные CR590; Зеленый цвет – участки фрагментации ДНК, индуцированные ДНКазами II типа, меченные FAM.



### 3.2.2. Относительное содержание нервных клеток с маркерами апоптоза околоинсультной области коры головного мозга крыс

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. 3.9).

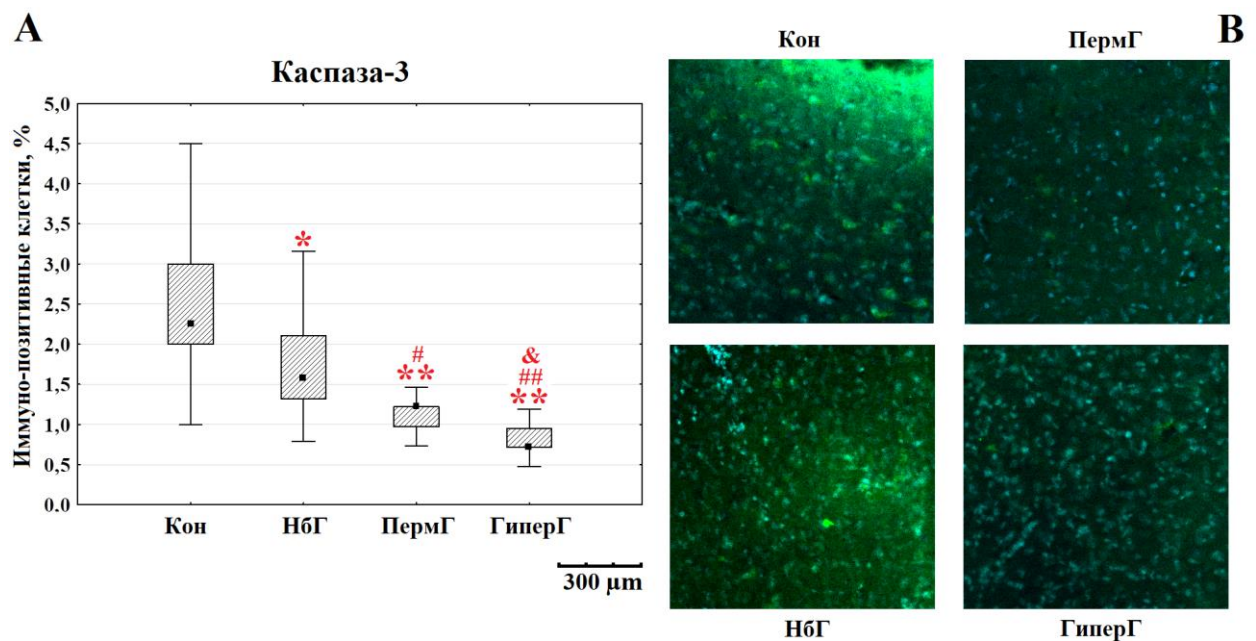


Рисунок 3.9. Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих Каспазу-3 (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – 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 ( $p < 0,05$ ); Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; зеленый

цвет – первичные антитела к каспазе-3, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor488.

При этом процент клеток, содержащих АИФ (ключевой эффектор каспазо-независимого (митохондриального) сигнального пути апоптоза) снижается после воздействия пермиссивной гиперкапнии и при ее сочетании с гипоксией (Рис. 3.10).

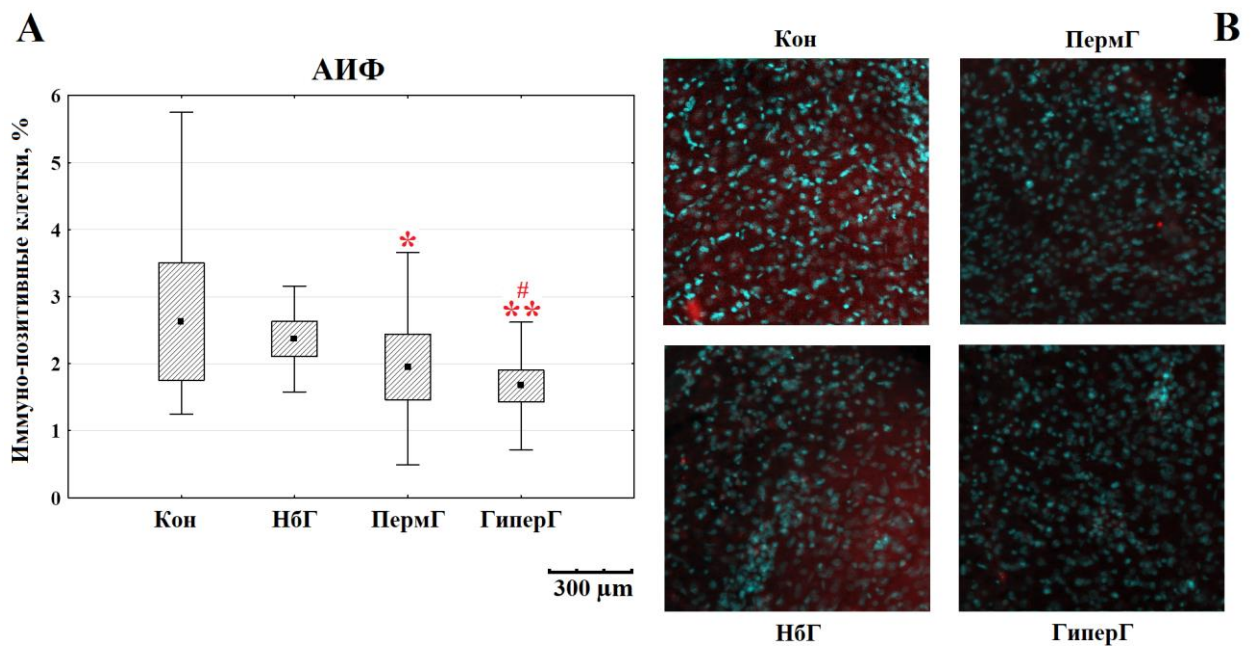


Рисунок 3.10. Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих апоптоз-индуцирующий фактор (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); # – отличия по сравнению с НбГ ( $p < 0,01$ ). Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; красный цвет – первичные антитела к АИФ, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor555.

Аналогичную тенденцию демонстрируют гиперкапнические воздействия и в отношении воздействия на клетки, содержащие Вах - индуктор каспазо-независимого пути апоптоза (рис. 3.11).

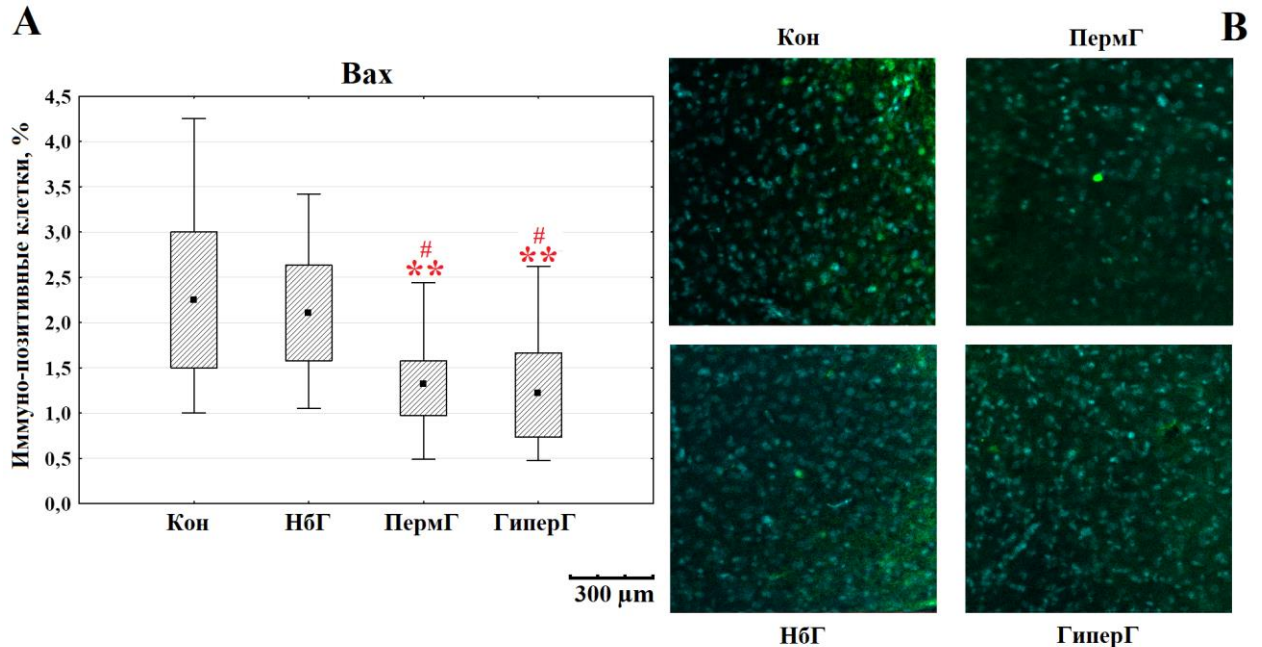


Рисунок 3.11. Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих Вах (А); Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \*\* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); ## – отличия по сравнению с НбГ ( $p < 0,05$ ); Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; зеленый цвет – первичные антитела к Вах, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor488.

Вместе с тем, процент клеток в околоинсультной области, содержащих противоаптоптотический фактор Bcl-2, в равной мере, повышается после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии (Рис. 3.12).



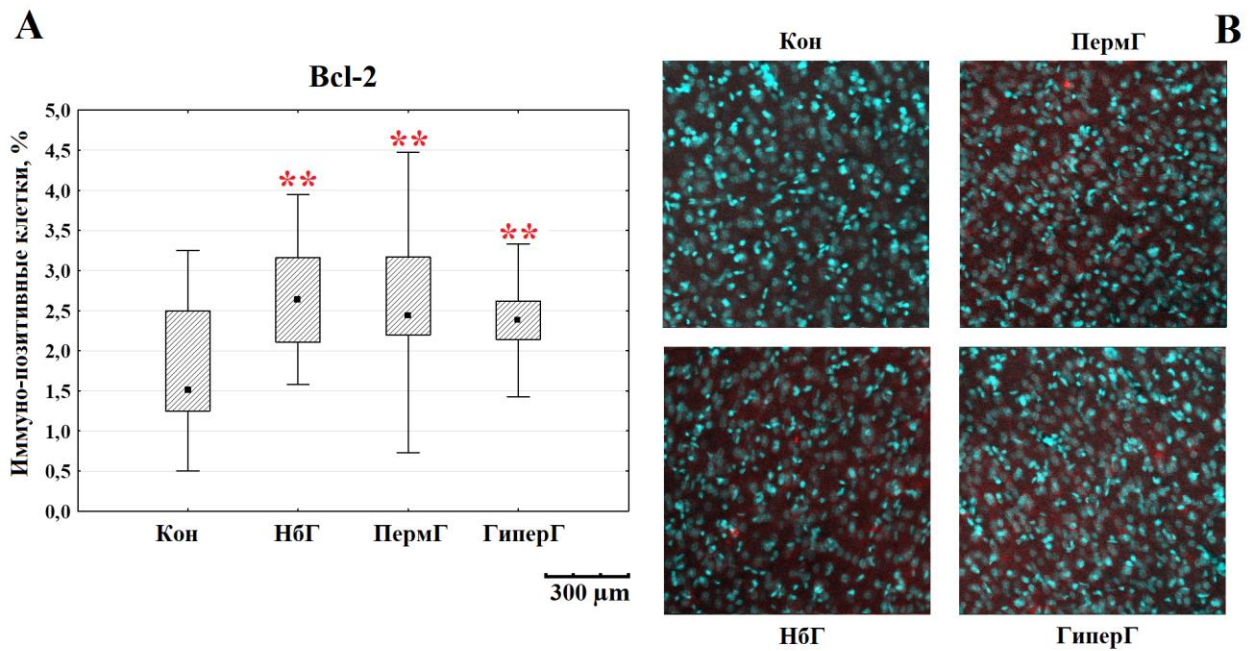


Рисунок 3.12. Относительное содержание иммунопозитивных нервных клеток в околоинсультной области головного мозга крыс, содержащих Bcl-2 (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \*\* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ). Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга крыс (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; красный цвет – первичные антитела к Bcl-2, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour555.

### 3.2.3. Интенсивность апоптоза/некроза в культуре астроцитов и нейронов после респираторных воздействий *in vitro*

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 (Рис. 3.13). Так, у астроцитов без химической гипоксии усиление апоптоза произошло в группах гипоксического воздействия (НбГ24 и НбГ12), группе 24-часовой пермиссивной гиперкапнии (ПермГ24) и в группах интервальной

гиперкапнической гипоксии (ИГГх3 и ИГГх2). При этом 12-часовое воздействие гиперкапнической гипоксии оказало на астроциты апоптоз-ингибирующее влияние, 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, кроме групп сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии (ГиперГ24 и ГиперГ12).

В культуре нейронов наблюдалась сходная динамика в отношении индукции апоптоза у групп гипоксического воздействия (НбГ24 и НбГ12) и группы 24-часовой пермиссивной гиперкапнии (ПермГ24). Однако, наряду с группой 12-часового воздействия гиперкапнической гипоксии ингибирование апоптоза вызывали также респираторные воздействия в группах ПермГ12 и ГиперГ24, 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).

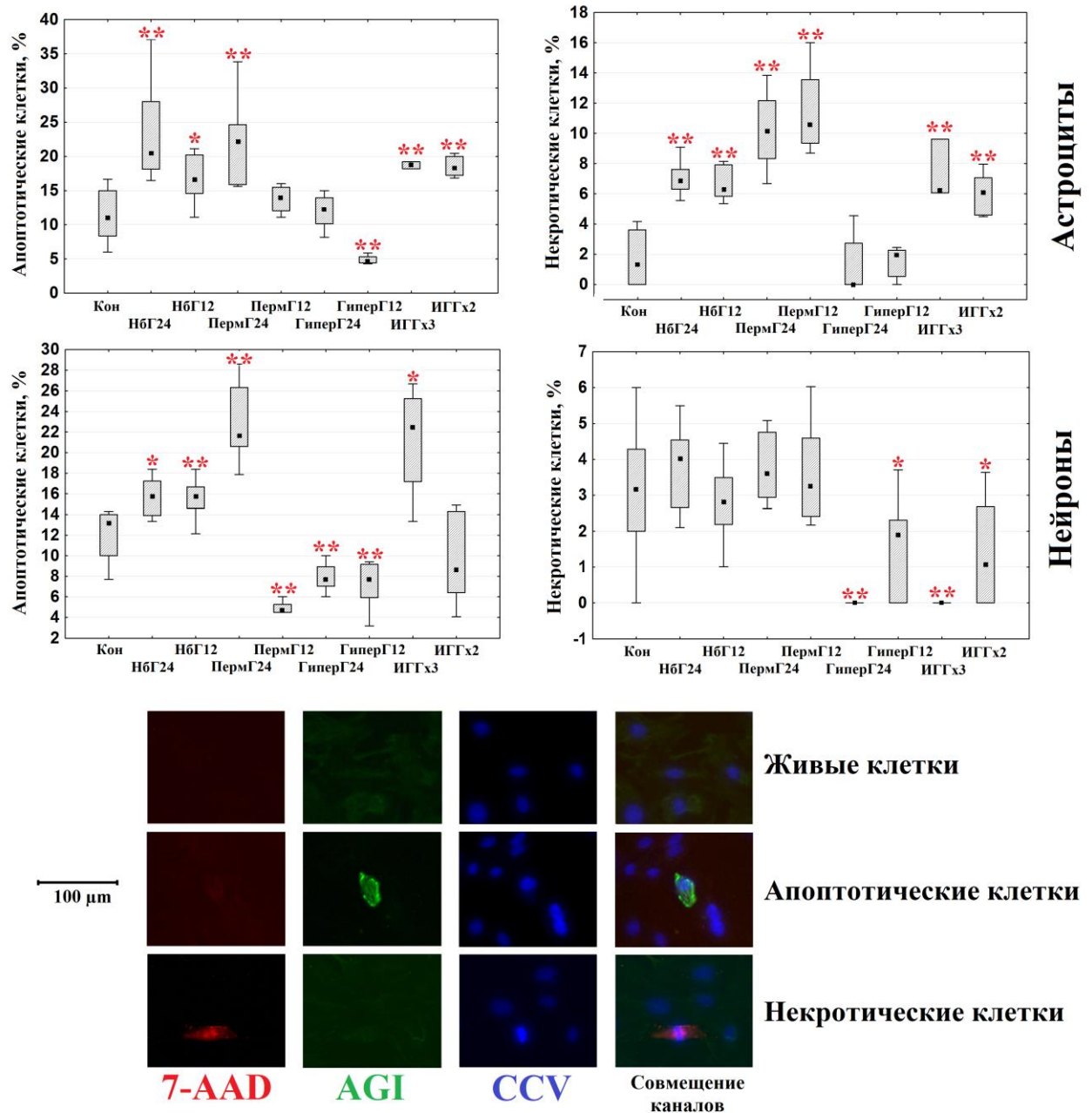


Рисунок 3.13. Относительное содержание нервных клеток с флуоресцентными метками апоптоза/некроза без химической гипоксии. Н6Г24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; Н6Г12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая пермиссивная гиперкапния; 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 при  $p < 0,05$ . \*\* –

отличия по сравнению с контролем при  $p < 0,001$ . В нижней части фигуры представлены примеры изображений, использованные для флуоресцентного анализа: синий цвет - ядра, окрашенные CytoCalcein™ Violet 450 (CCV); зеленый цвет – клетки, окрашенные Aporxin Green Indicator (AGI); красный цвет – клетки, окрашенные 7-аминоактиномицином D (7-AAD).

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 (Рис. 3.14). Например, индукция апоптоза у астроцитов выявлялась после 24-часового воздействия пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии, 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 (ГиперГ12, ИГГх3, ИГГх2). Некроз среди астроцитов после химической гипоксии, как и без нее, был повышенным после 12- и 24-часового воздействия пермиссивной гиперкапнии. 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.

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. 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).

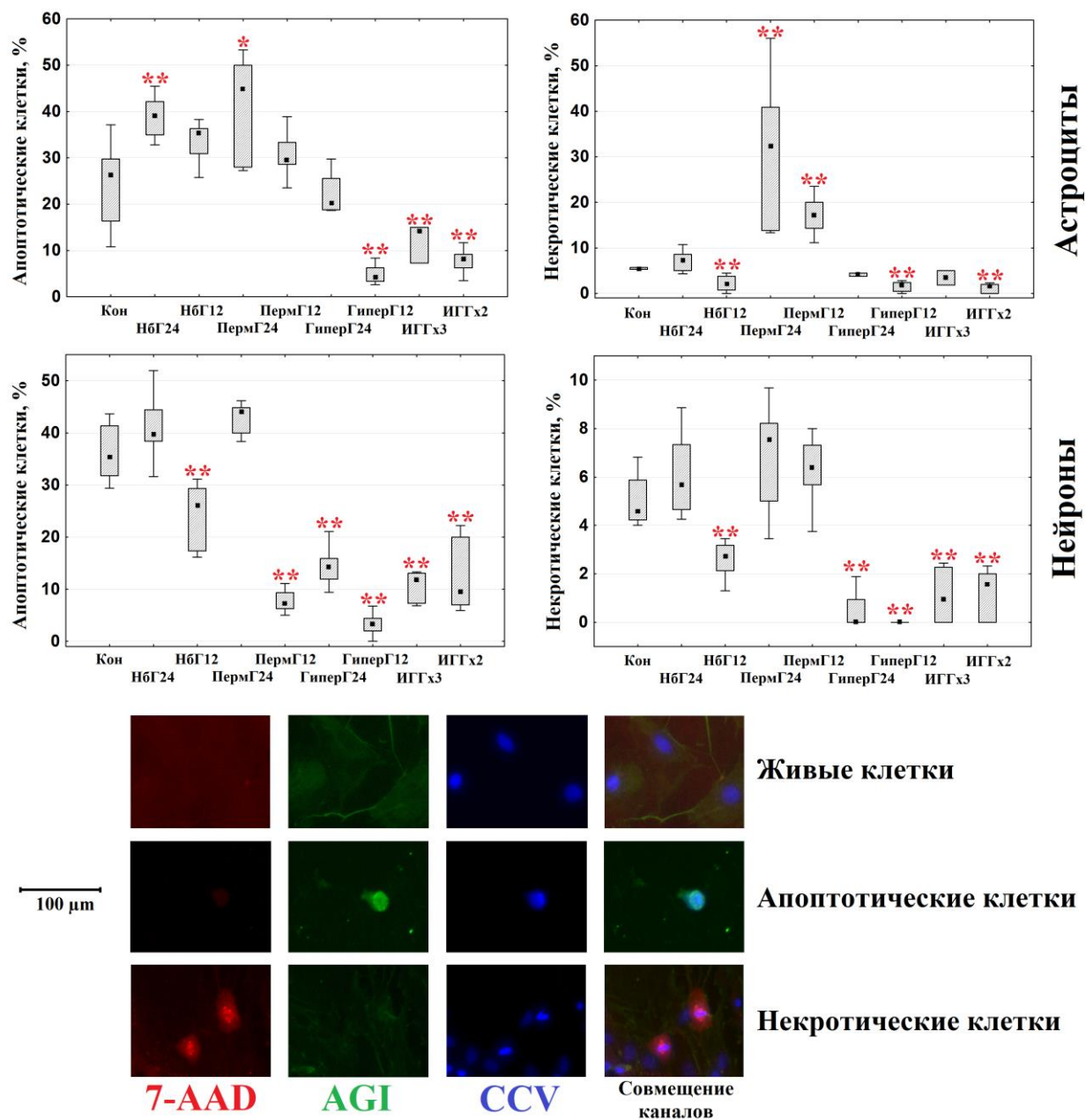


Рисунок 3.14. Относительное содержание нервных клеток с флуоресцентными метками апоптоза/некроза после моделирования химической гипоксии. Н6Г24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; Н6Г12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая пермиссивная 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 ( $p<0,001$ ). В нижней части фигуры представлены примеры изображений, использованные для флуоресцентного анализа: синий цвет - ядра, окрашенные CytoCalcein™ Violet 450 (CCV); зеленый цвет – клетки, окрашенные Aporxin Green Indicator (AGI); красный цвет – клетки, окрашенные 7-аминоактиномицином D (7-AAD).

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 3.1). По этой оценочной шкале эффект, выражавшийся в виде ингибирования апоптоза/некроза, расценивался как +1 балл, а их индукция как -1 балл.

Таблица 3.1. Интегративная оценка влияния гипоксии и гиперкапнии на интенсивность апоптоза/некроза.

		Н6Г 24	Н6Г 12	ПермГ 24	ПермГ 12	ГиперГ 24	ГиперГ 12	ИГГх3	ИГГх2
<b>Без химической гипоксии</b>	Астроциты - апоптоз	↓	↓	↓			↑	↓	↓
	Астроциты - некроз	↓	↓	↓	↓			↓	↓
	Нейроны - апоптоз	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	
	Нейроны - некроз					↑	↑	↑	↑
<b>Итого (без химической гипоксии)</b>		<b>-3</b>	<b>-3</b>	<b>-3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>
<b>После химической гипоксии</b>	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.

#### 3.2.4. Относительное содержание клеток с медиаторами апоптоза в культурах астроцитов и нейронах *in vitro*

Результаты иммуноцитохимического исследования количества клеток в культурах астроцитов/нейронов, содержащих про- и антиапоптотические факторы апоптоза, после сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии 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. 3.15А). При этом воздействие пермиссивной гиперкапнии продолжительностью 12 часов и 3-кратной интермиттирующей гиперкапнической гипоксии, напротив, вызывает снижение относительного содержания клеток с этим медиатором апоптоза. В культуре нейронов не наблюдалось изменения относительного содержания клеток с каспазой-3 после воздействия пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии (Рис. 3.15В), но 24-часовое воздействие гиперкапнической гипоксии и оба режима интермиттирующей гиперкапнической гипоксии увеличивали этот показатель.

У астроцитарных культур 24-часовое воздействие нормобарической гипоксии, пермиссивной гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии вызвало увеличение относительного содержания клеток с апоптоз-индуцирующим фактором (Рис. 3.15А), 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. 3.15В). При этом 12-часовая пермиссивная гиперкапния, 24-часовая, 12-часовая и 2-кратная интермиттирующая гиперкапническая гипоксия, напротив, уменьшали этот процент.



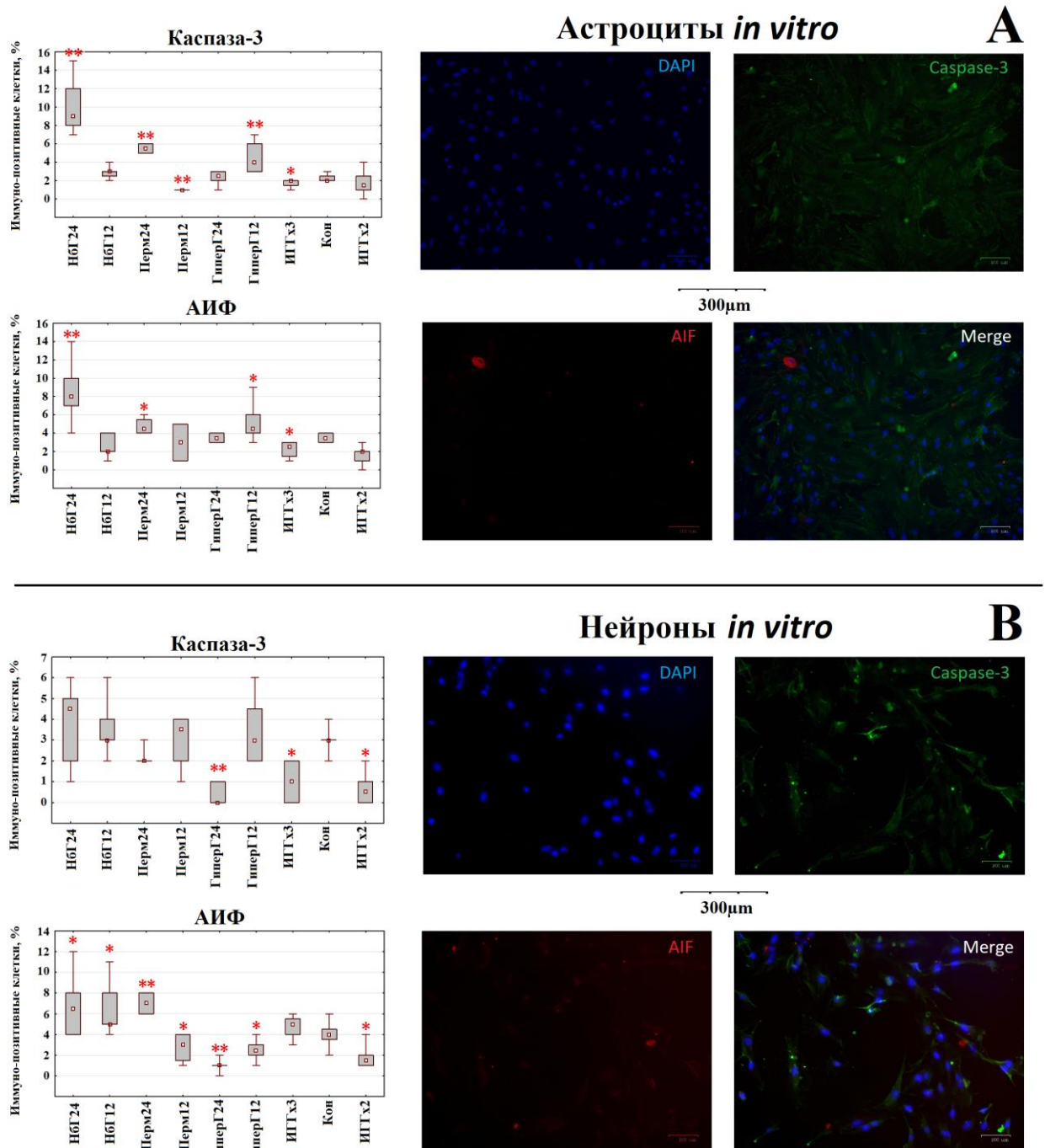


Рисунок 3.15. Относительное содержание иммунопозитивных астроцитов (А) и нейронов (В) с флуоресцентными метками к каспазе-3 и апоптоз-индуцирующему фактору после химической гипоксии. НбГ24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; НбГ12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная 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; \* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; зеленый цвет – первичные антитела к каспазе-3, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour488; красный цвет – первичные антитела к AIF, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour555.

Увеличение относительного содержания клеток с медиатором апоптоза Вах в культуре астроцитов (Рис. 3.16А) 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. 3.16В), 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. 3.16А) 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. 3.16В).

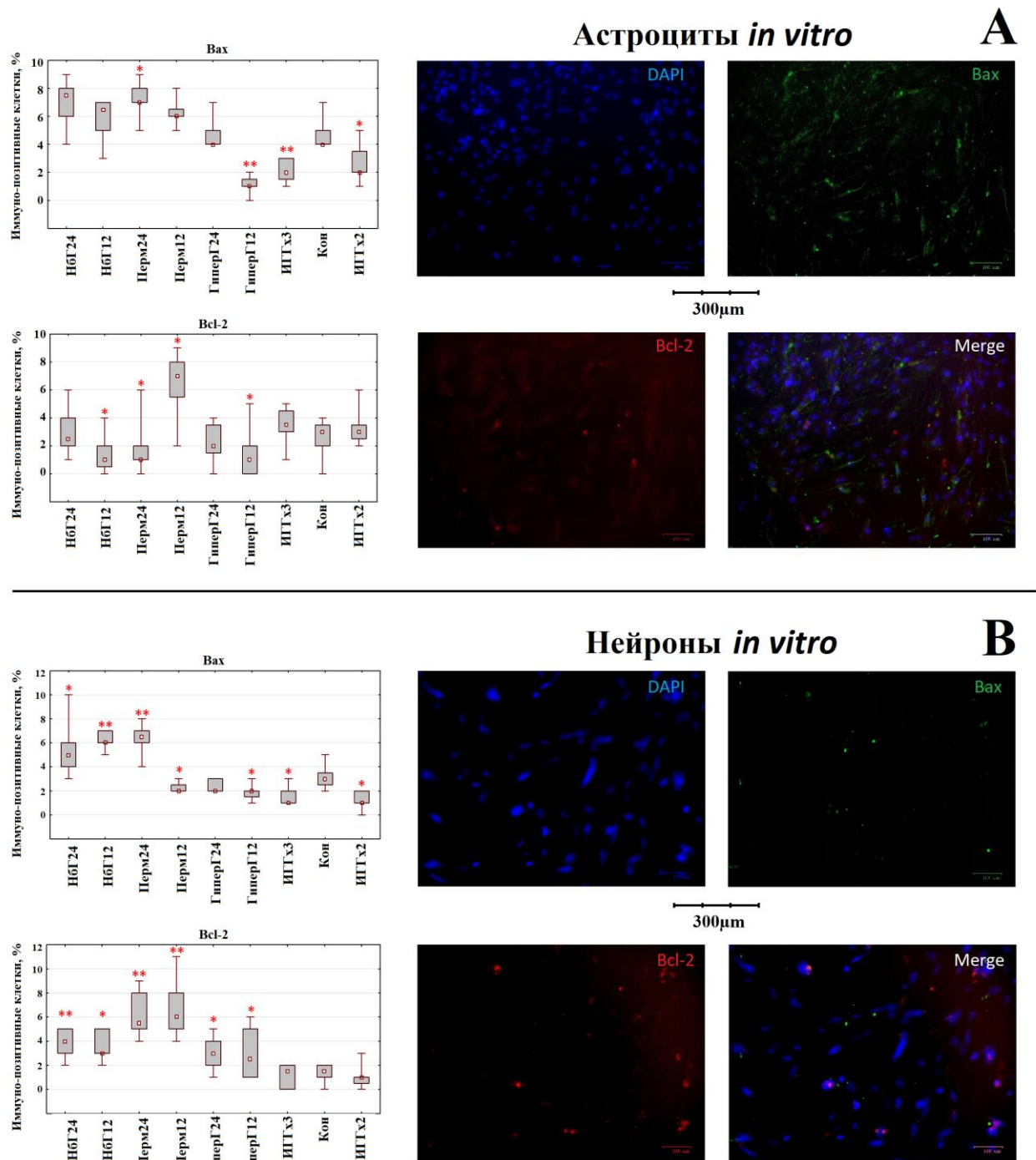


Рисунок 3.16. Относительное содержание иммунопозитивных астроцитов (А) и нейронов (В) с флуоресцентными метками к Bax и Bcl-2 после химической гипоксии. Н6Г24 - 24-часовая нормобарическая гипоксия; Н6Г12 - 12-часовая нормобарическая гипоксия; ПермГ24 - 24-часовая пермиссивная гиперкапния; ПермГ12 - 12-часовая 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 ( $p < 0,01$ ). Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; зеленый цвет – первичные антитела к Вах, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor488; красный цвет – первичные антитела к Bcl-2, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor555.

По аналогии с анализом данных об эффектах влияния гиперкапнии и гипоксии на интенсивность апоптоза и некроза в культурах астроцитов и нейронов, мы адаптировали данные о влиянии этих воздействий на относительное содержание клеток с медиаторами апоптоза под интегративную шкалу оценки (Таблица 3.2). По этой оценочной шкале эффект, выражавшийся в виде уменьшения относительного содержания клеток с проапоптотическими факторами (Каспаза-3, АИФ, Вах), расценивался как +1 балл ( $\uparrow$ ), а их увеличение как -1 балл ( $\downarrow$ ) и, напротив, уменьшение относительного содержания клеток с антиапоптотическим фактором Bcl-2 оценивалось как -1 балл ( $\downarrow$ ), а его увеличение как +1 балл ( $\uparrow$ ).

Таблица 3.2. Интегративная оценка влияния воздействий гипоксии и/или гиперкапнии на относительное содержание клеток с медиаторами апоптоза в культурах астроцитов и нейронов.

	<b>Н6Г 24</b>	<b>Н6Г 12</b>	<b>ПермГ 24</b>	<b>ПермГ 12</b>	<b>ГиперГ 24</b>	<b>ГиперГ 12</b>	<b>ИГГ x3</b>	<b>ИГГ x2</b>
<b>Каспаза-3</b>								
Астроциты	$\uparrow$		$\uparrow$	$\downarrow$		$\uparrow$	$\downarrow$	
Нейроны					$\downarrow$		$\downarrow$	$\downarrow$
<b>АИФ</b>								
Астроциты	$\uparrow$		$\uparrow$		$\uparrow$		$\downarrow$	
Нейроны	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$		$\downarrow$
<b>Вах</b>								
Астроциты			$\uparrow$			$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Нейроны	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\downarrow$		$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
<b>Bcl-2</b>								
Астроциты		$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$		$\downarrow$		

Нейроны	↑	↑	↑	↑	↑	↑		
<b>Интегративная оценка</b>								
Астроциты	-2	-1	-3	+2	-1	-1	+3	+1
Нейроны	-1	-1	-1	+3	+3	+3	+2	+3
<b>ИТОГО:</b>	-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; ИГГх3 - 3-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; ИГГх2 - 2-кратная 12-часовая гиперкапническая гипоксия; Кон - контрольная группа; ↓ - увеличение относительного содержания клеток с проапоптотическими медиаторами (Каспаза-3, АИФ, Вах)/уменьшение относительного содержания клеток с антиапоптотическим медиатором (Bcl-2); ↑ - уменьшение относительного содержания клеток с проапоптотическими медиаторами (Каспаза-3, АИФ, Вах)/увеличение относительного содержания клеток с антиапоптотическим медиатором (Bcl-2).

### **3.3. Содержание HIF-1α в ткани гиппокампа, клеток с HIF-1α в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии**

#### **3.3.1. Газовый состав артериальной крови у крыс во время респираторных воздействий гиперкапнии и/или гипоксии**

Оценка газового состава артериальной крови у крыс во время респираторных воздействий показала, что уровень рН (Рис. 3.17А) в группах, где присутствовал гиперкапнический компонент (ПермГ и ГиперГ) был ниже ( $\approx 7.1$ ), по сравнению с группами НБГ и контроля (около 7.35). 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.

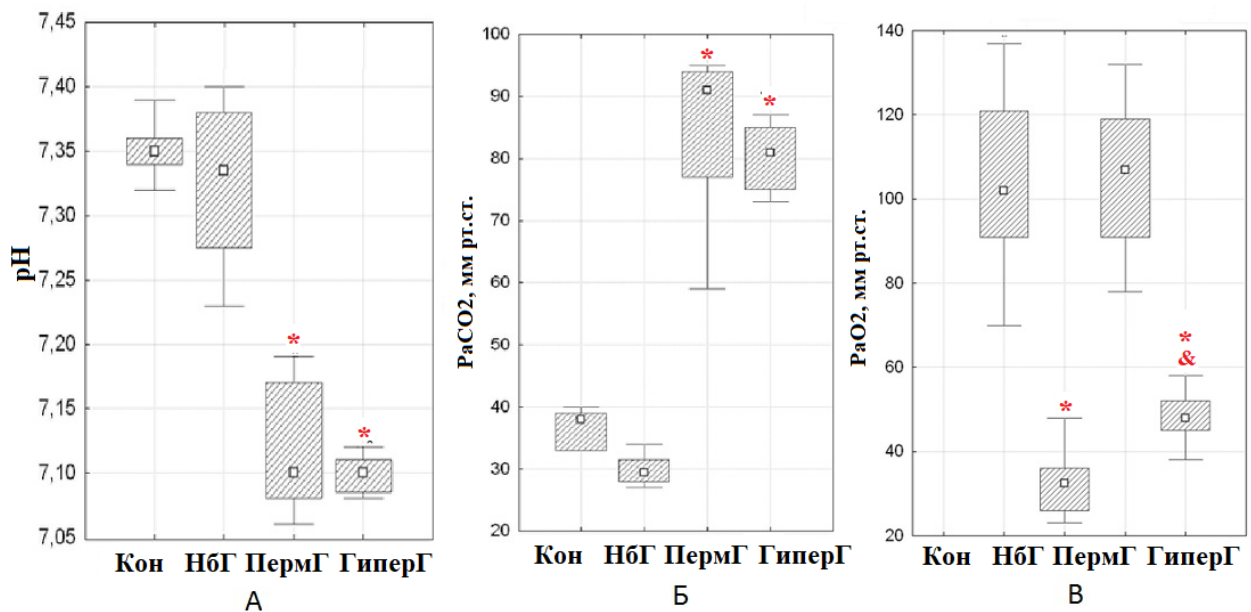


Рисунок 3.17. Показатели pH и газового состава артериальной крови у крыс при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии: pH (А), PaCO<sub>2</sub> (Б) и PaO<sub>2</sub> (В). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); & - различия статистически значимы по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,01$ ).

Напряжение CO<sub>2</sub> в артериальной крови крыс (Рис. 3.17Б) 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.). Эти значения соответствовали уровню «умеренной» пермиссивной гиперкапнии (60 – 100 мм рт. ст.), показавшей максимальный нейропротекторный эффект в работе Тао Т. et al. [2013]. При этом различий в значении напряжения CO<sub>2</sub> между группами ПермГ и ГиперГ не наблюдалось. Уровень CO<sub>2</sub> в артериальной крови крыс контрольной группы находился в пределах справочных нормативов и данных других исследователей [Zhou Q. et al. 2010; Tao T. et al.,

2013]. В группе НБГ значения  $\text{PaCO}_2$  были ниже (30 мм рт. ст.), чем в группе контроля, что, вероятно, обусловлено гипервентиляцией гипоксического генеза. Важно подчеркнуть, что значения  $\text{PaCO}_2$  в группе НБГ были ниже контроля, но оставались в пределах нормокапнии [Fraser D. et al., 2008].

Напряжение кислорода в артериальной крови крыс (Рис. 3.17В) 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). При этом  $\text{PaO}_2$  в крови крыс из группы ГиперГ было значимо больше по сравнению с группой НБГ.

### 3.3.2. Содержание HIF-1 $\alpha$ в гиппокампе крыс после воздействия гипоксии и/или гиперкапнии

Содержание HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе крыс после 7-кратных респираторных воздействий гипоксии и/или гиперкапнии (Рис. 3.18) 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 $\alpha$  в ткани гиппокампа.

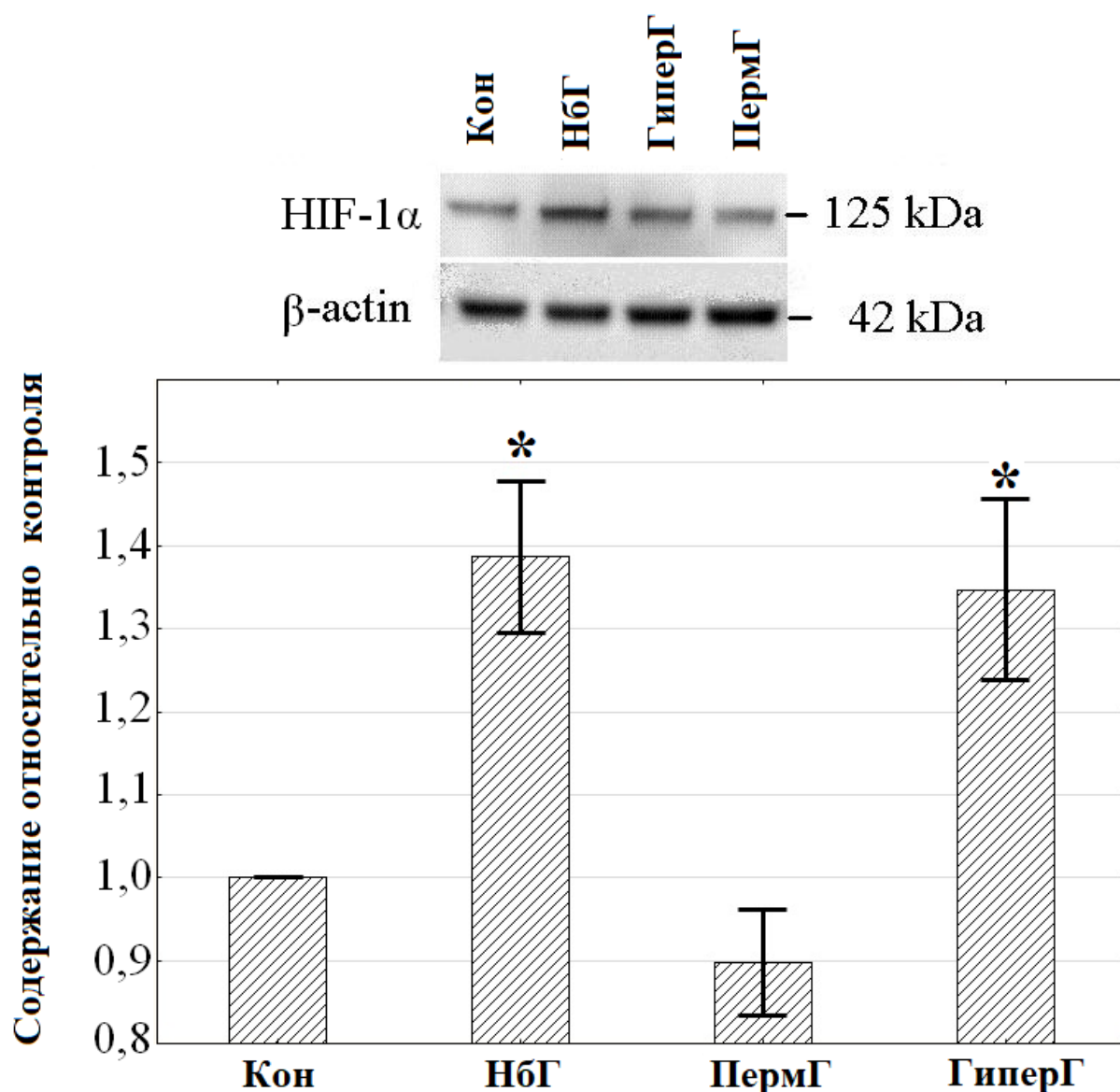


Рисунок 3.18. Содержание HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе крыс после 7-кратных респираторных воздействий гипоксии и/или гиперкапнии, относительно контроля, нормализованное по уровню  $\beta$ -актина. Верхняя панель показывает пример протеиновых полос HIF-1 $\alpha$  и сопутствующих полос  $\beta$ -актина для представленных экспериментальных групп. Нижняя панель включает данные об уровне экспрессии белка по данным денситометрии через 24 часа после последнего респираторного воздействия. Данные представлены в виде среднего значения (M)  $\pm$  среднеквадратичное отклонение ( $\sigma$ ). Кон – контрольная группа; Н6Г – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ )



### 3.3.3. Относительное содержание клеток с HIF-1 $\alpha$ в культурах астроцитов *in vitro* после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии *in vivo*

Относительное содержание клеток с HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  по сравнению с контрольной группой произошло при условиях без химической гипоксии (Рис. 3.19А and С) 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 (Рис. 3.19В and 2D) повышение относительного содержания клеток с HIF-1 $\alpha$ , по отношению к контрольной и другим группам, наблюдалось только в группе ГиперГ ( $p < 0,001$ ).

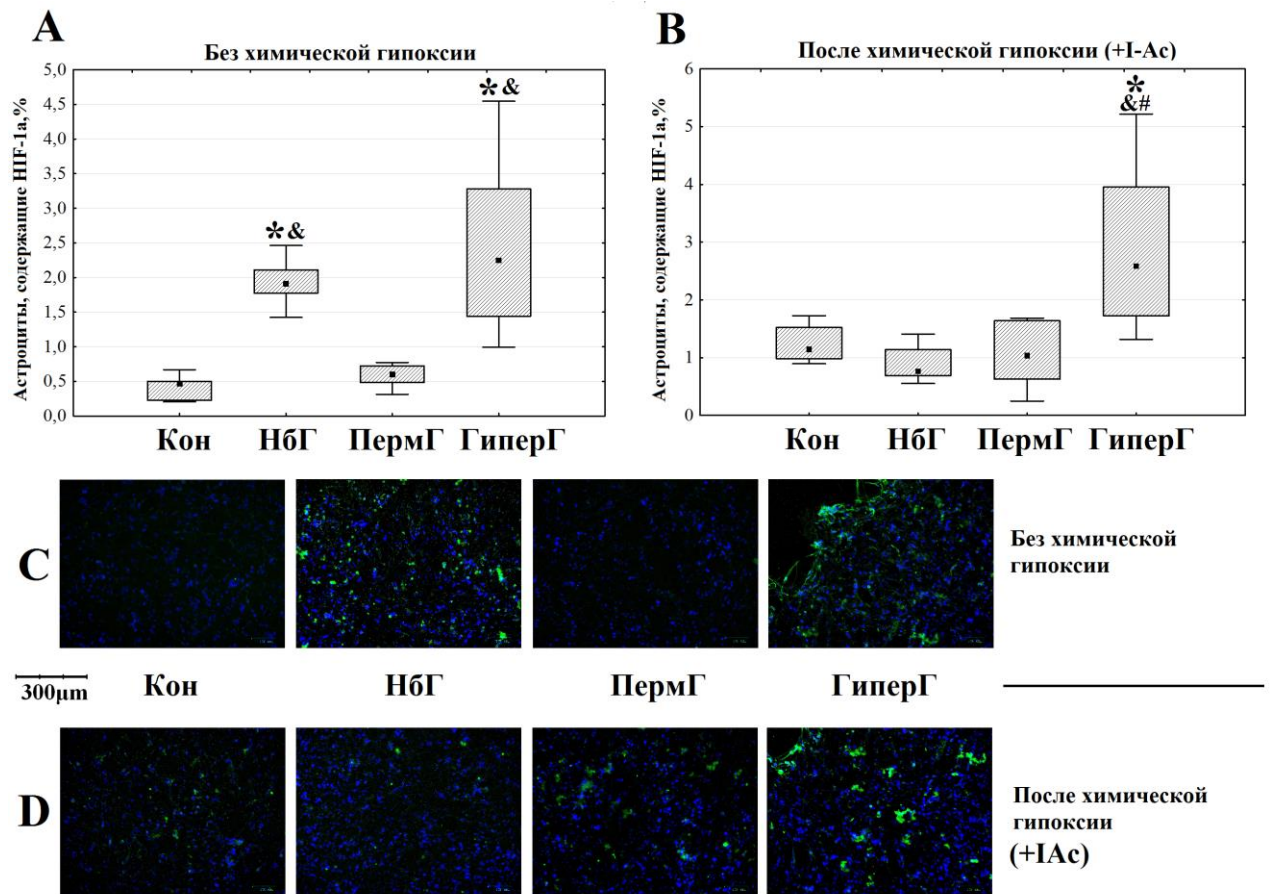


Рисунок 3.19. Относительное содержание клеток с HIF-1α в культурах астроцитов, выделенных из стволовых клеток крыс, подвергнутых респираторным воздействиям *in vivo*: А и В - процент иммунопозитивных клеток по отношению к общему количеству при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии; Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; +I-Ac —добавление йодацетата натрия; # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ); & - отличия по сравнению с группой ПермГ ( $p < 0,001$ ). С и D – клетки с HIF-1α в культурах астроцитов при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии. Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; зеленый цвет – первичные антитела к HIF-1α, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour488.

### 3.3.4. Относительное содержание клеток с HIF-1 $\alpha$ в культурах астроцитов после воздействий гипоксии и гиперкапнической гипоксии *in vitro*

Процент клеток в культурах астроцитов, содержащих HIF-1 $\alpha$  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 (Рис. 3.20А и С), увеличение относительного содержания клеток с HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  по сравнению с группой НБГ ( $p<0,001$ ). При этом после добавления натрия йодоацетата (Рис. 3.20В and D) в группе ГиперГ процент клеток с HIF-1 $\alpha$  не изменялся по сравнению с контролем, но в группе НБГ наблюдалось его существенное снижение ( $p<0,001$ ).

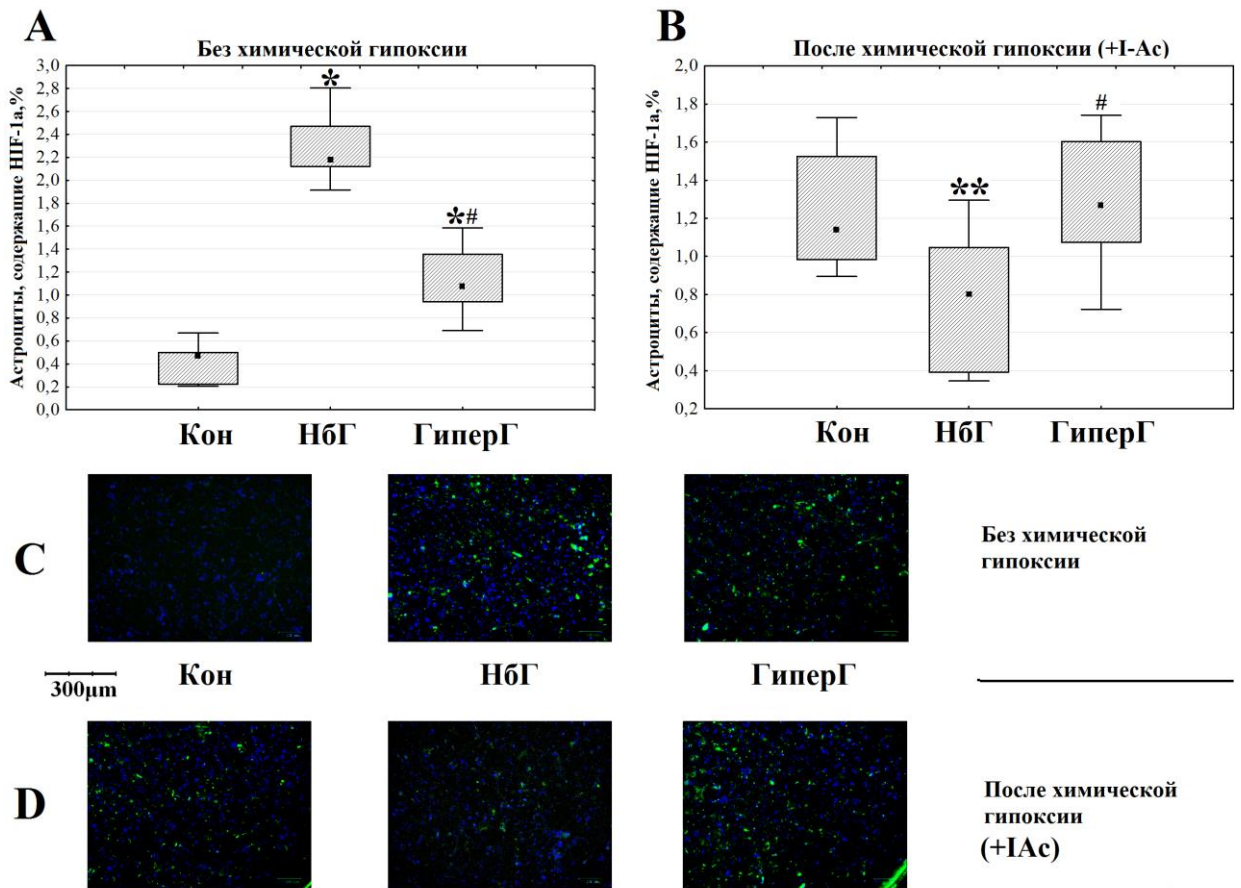


Рисунок 3.20. Относительное содержание клеток с HIF-1α в культурах астроцитов, подвергнутых гипоксии и гиперкапнической гипоксии *in vitro*: А и В - процент иммунопозитивных клеток по отношению к общему количеству при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии; Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; +IAc —добавление йодацетата натрия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ); # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ). С и Д – содержание клеток с HIF-1α в культурах астроцитов при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии. Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; зеленый цвет – первичные антитела к HIF-1α, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor488.

### 3.3.5. Относительное содержание клеток с HIF-1α в околоинсультной области коры головного мозга крыс после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии

Уровень относительного содержания иммунопозитивных клеток с HIF-1 $\alpha$  в околоинсультной области коры головного мозга (Рис. 3.21) 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 HIF-1 $\alpha$  в группе ГиперГ был выше, чем в группе ПермГ ( $p<0,05$ ), но ниже по сравнению с группой НбГ ( $p<0,001$ ).

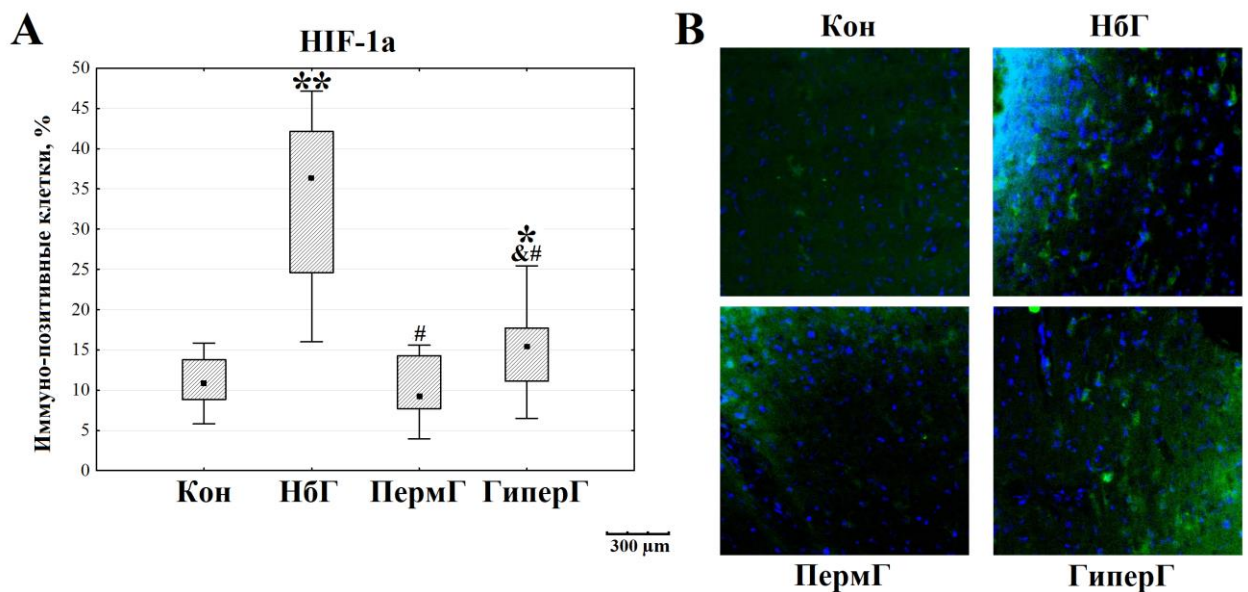


Рисунок 3.21. Относительное содержание клеток с HIF-1 $\alpha$  в околоинсультной области коры головного мозга (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p<0,001$ ); \* - отличия по сравнению с контролем ( $p<0,01$ ); # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p<0,001$ ); & - отличия по сравнению с группой ПермГ ( $p<0,05$ ). Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга (В). Увеличение x250. Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; зеленый цвет – первичные антитела к HIF-1 $\alpha$ , связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour488.

### 3.4. Содержание клеток с A1 рецепторами и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в околоинсультной области головного мозга крыс и в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии

#### 3.4.1. Относительное содержание клеток с A1 рецепторами в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии *in vivo* или *in vitro*

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 (Рис.3.22), отличалось между группами как при росте клеток в условиях без химической гипоксии, так и после моделирования химической гипоксии.

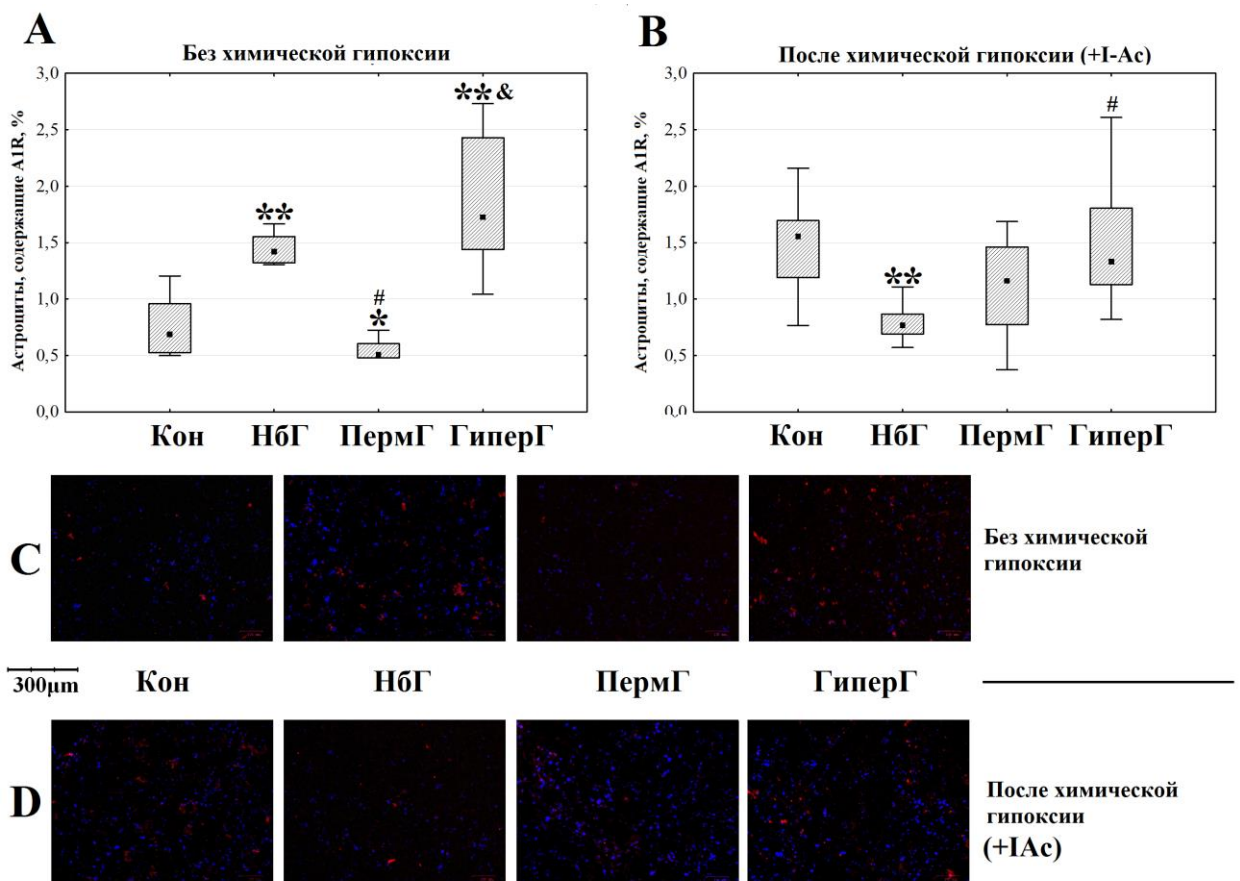


Рисунок 3.22. Относительное содержание клеток с A1 рецепторами в культурах астроцитов, выделенных из стволовых клеток крыс, подвергнутых респираторным воздействиям *in vivo*: А и В - процент иммунопозитивных

клеток по отношению к общему количеству клеток при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии; Кон – контрольная группа; НБГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ) # - отличия по сравнению с группой НБГ ( $p < 0,001$ ); & - отличия по сравнению с группой ПермГ ( $p < 0,001$ ). С и D – клетки культур астроцитов, содержащие A1 рецепторы, при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии. Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; Красный цвет – первичные антитела к A1-аденозиновым рецепторам, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour555.

При этом при условиях без химической гипоксии (Рис. 3.22А) 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 (Рис. 3.22В) 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* (Рис. 3.23) отличался между группами как при росте клеток в условиях без химической гипоксии, так и после моделирования химической гипоксии.



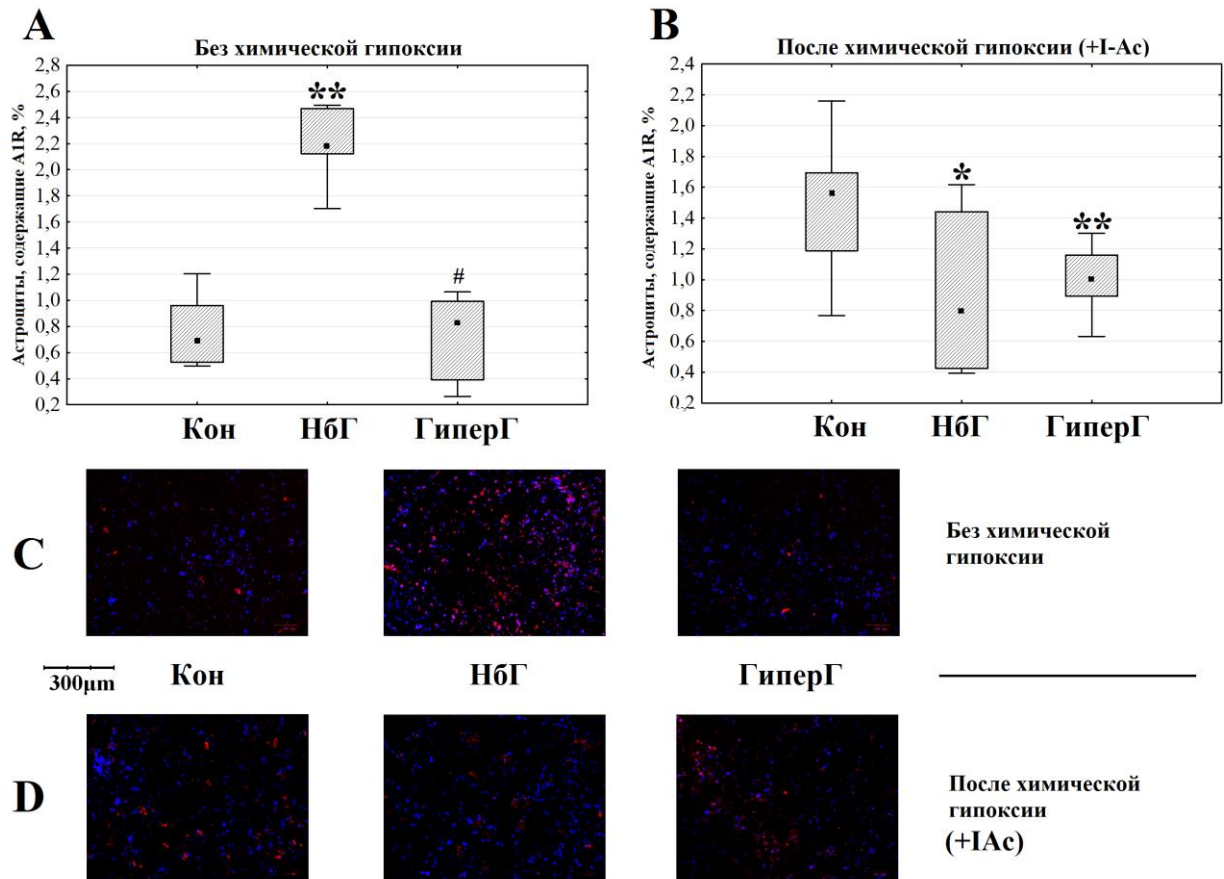


Рисунок 3.23. Относительное содержание A1 рецепторов в астроцитах, подвергнутых гипоксии и гиперкапнической гипоксии *in vitro*: А и В - процент иммунопозитивных клеток по отношению к общему количеству клеток при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии; Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ). С и Д – A1 рецепторы в астроцитах при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии. Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; Красный цвет – первичные антитела к A1-аденозиновым рецепторам, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor555.



Увеличение процента клеток с A1 рецепторами при условиях без химической гипоксии (Рис. 3.23А) обнаружено в группе НбГ, превысив значения группы контроля в 3 раза ( $p<0,001$ ). После моделирования химической гипоксии (Рис. 3.23В) 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.

#### 3.4.2. Относительное содержание клеток с A1 рецепторами в околоинсультной области головного мозга после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии

У группы НбГ процент клеток с A1 рецепторами в околоинсультной области коры головного мозга (Рис. 3.24) 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 ( $p<0,05$ ).

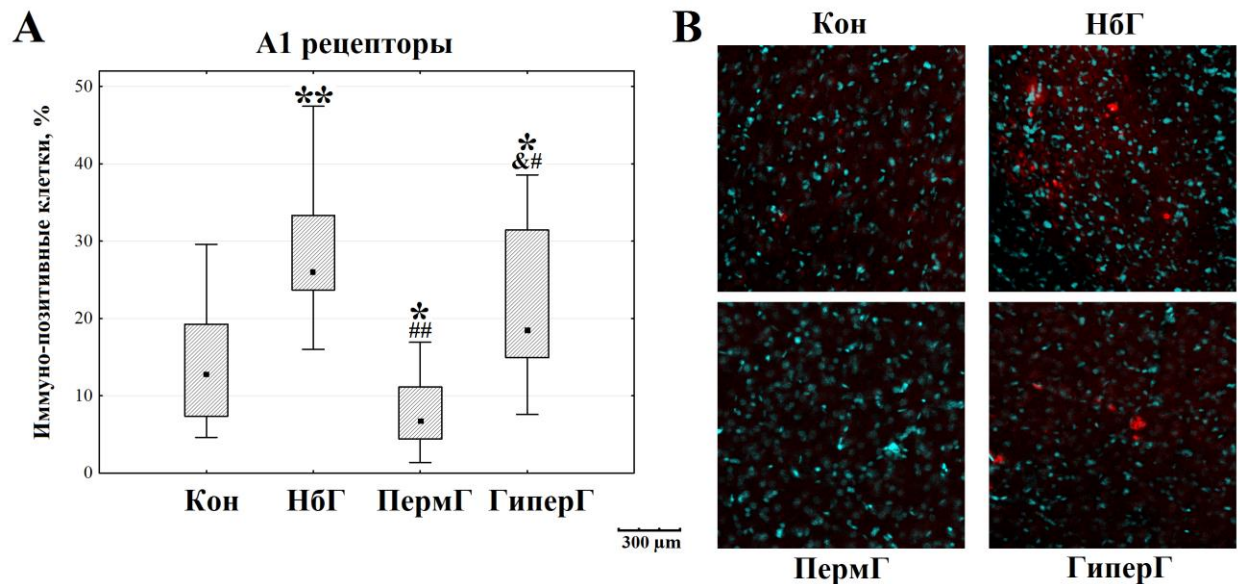


Рисунок 3.24. Относительное содержание клеток с A1 рецепторами в околоинсультной области коры головного мозга (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,05$ ); ## - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ); & - отличия по сравнению с группой ПермГ ( $p < 0,001$ ). Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; красный цвет – первичные антитела к A1-аденозиновым рецепторам, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor555.

#### 3.4.3. Относительное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в культурах астроцитов после воздействий гиперкапнии и/или гипоксии *in vivo* или *in vitro*

Процентное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в культурах астроцитов, выделенных из гиппокампа крыс, подвергнутых при жизни 15-кратному курсу респираторных воздействий гипоксии и/или гиперкапнии (Рис. 3.25А), было повышенным в условиях без химической гипоксии у всех

групп воздействия ( $p < 0,001$ ). При этом в группе ГиперГ процентное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами повысилось почти в 7 раз, в группе ПермГ в 2,5 раза, а в группе НбГ в 1,8 раза.

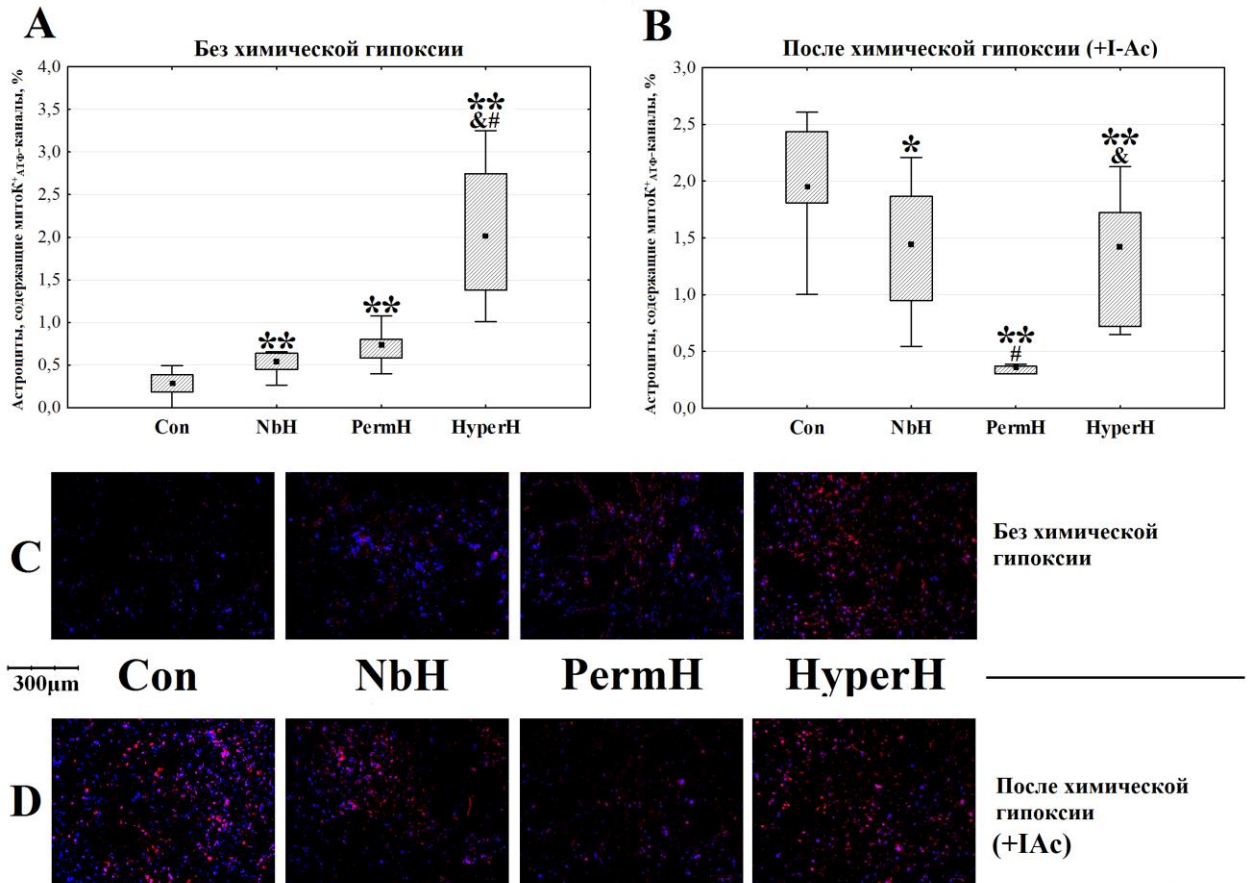


Рисунок 3.25. Относительное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в астроцитах, выделенных из стволовых клеток крыс, подвергнутых респираторным воздействиям *in vivo*: А и В - процент иммунопозитивных клеток по отношению к общему количеству клеток при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии; Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ); & - отличия по сравнению с группой ПермГ ( $p < 0,001$ ). С и Д – клетки с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в культурах астроцитов при условиях без химической гипоксии и после

химической гипоксии. Увеличение  $\times 175$ . Синий цвет – DAPI; красный цвет – первичные антитела к K<sub>ir</sub>6.2, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor555.

Воздействие химической гипоксии (Рис. 3.25B) вызвало снижение процентного содержания клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов в культурах астроцитов после 24 часов воздействия гипоксии или гиперкапнической гипоксии *in vitro* при условиях без химической гипоксии (Рис. 3.26A) увеличилось в группе НбГ в 4,2 раза, а в группе ГиперГ в 3,2 раза ( $p < 0,001$ ), проявляя существенные различия ( $p < 0,05$ ).

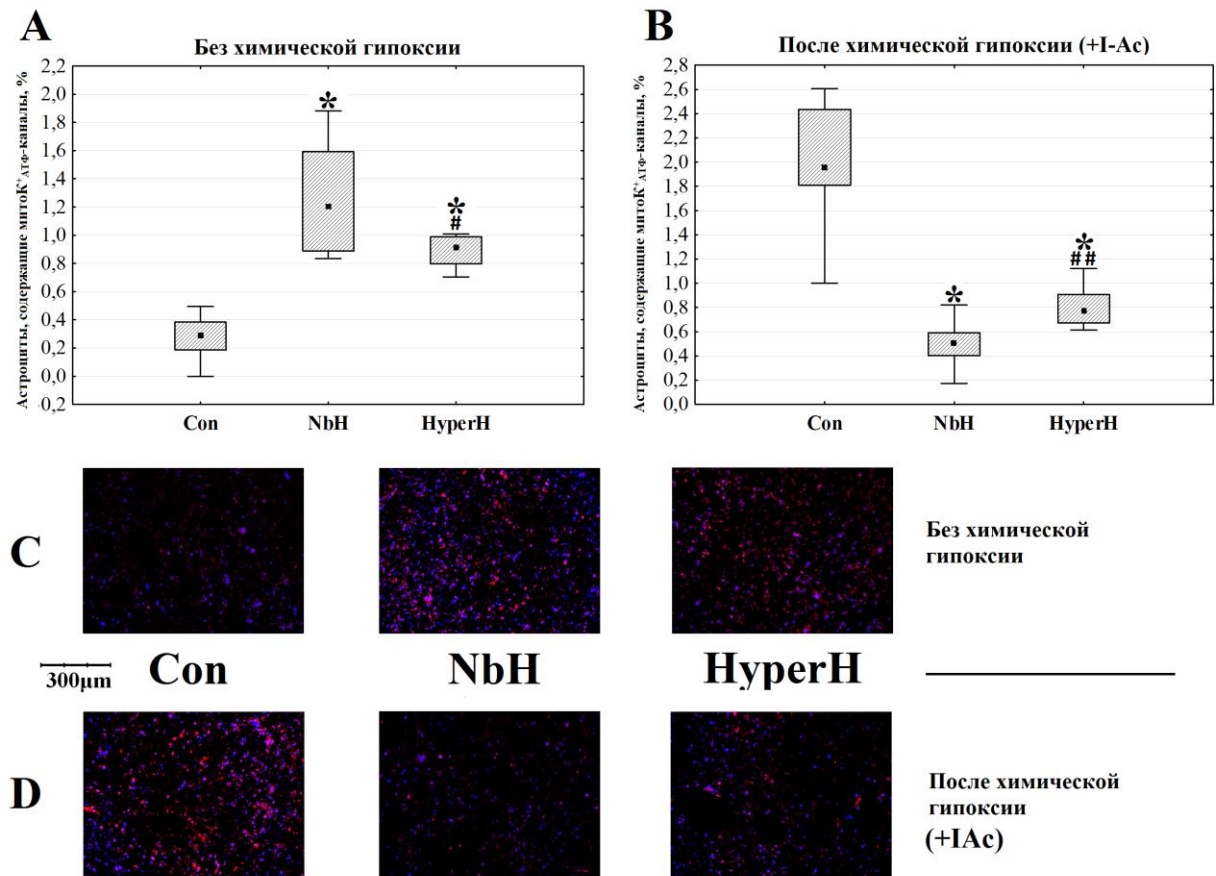


Рисунок 3.26. Относительное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в культурах астроцитов, подвергнутых гипоксии и гиперкапнической гипоксии *in vitro*: А и В - процент иммунопозитивных клеток по отношению к общему количеству клеток при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии; Кон – контрольная группа; НБГ – нормобарическая гипоксия; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); # - отличия по сравнению с группой НБГ ( $p < 0,05$ ); ## - отличия по сравнению с группой НБГ ( $p < 0,001$ ); С и Д – клетки с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами при условиях без химической гипоксии и после химической гипоксии. Увеличение x175. Синий цвет – DAPI; Красный цвет – первичные антитела к K<sub>ir</sub>6.2, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFlour555.

После моделирования химической гипоксии (Рис. 3.26В) у контрольной группы ( $p < 0,001$ ) относительное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-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 ( $p<0,001$ ).

#### 3.4.4. Относительное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в околоинсультной области головного мозга после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии

У крыс из группы НбГ процент клеток, содержащих митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы, в околоинсультной области коры головного мозга (Рис. 3.27) 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.

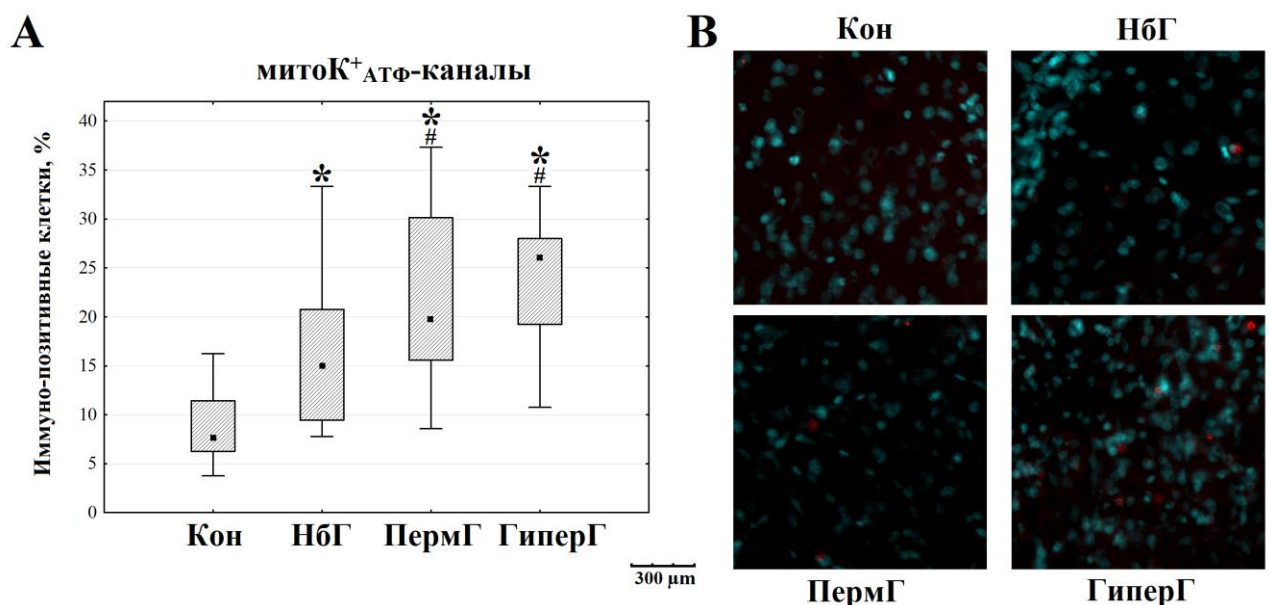


Рисунок 3.27. Относительное содержание клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в околоинсультной области коры головного мозга после воздействия

гиперкапнии и/или гипоксии (А). Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ); # - отличия по сравнению с группой НбГ ( $p < 0,001$ ); Микрофотографии околоинсультной области коры головного мозга (В). Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; красный цвет – первичные антитела к K<sub>ir</sub>6.2, связанные с вторичным антителом, конъюгированным с AlexaFluor555.

Общее представление полученных данных об эффектах воздействия (увеличение / уменьшение) пермиссивной гиперкапнии, нормобарической гипоксии и гиперкапнической гипоксии на относительное содержание клеток с A1 рецепторами и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в культурах астроцитов и околоинсультной области коры головного мозга представлено в Таблице 3.3.

Таблица 3.3. Эффекты воздействия гиперкапнии и/или гипоксии на относительное содержание клеток с A1 рецепторами и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в Блоке III-B.

Экспериментальная серия	ПермГ		НбГ		ГиперГ	
	Норма	Гипоксия/ Ишемия	Норма	Гипоксия/ Ишемия	Норма	Гипоксия/ Ишемия
<b>Клетки с A1 рецепторами</b>						
1. <i>In vivo</i> → <i>in vitro</i>	↓	-	↑	↓	↑	-
2. <i>in vitro</i>			↑	↓	-	↓
3. <i>In vivo</i>		↓		↑		↑
<b>Клетки с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами</b>						
1. <i>In vivo</i> → <i>in vitro</i>	↑	↓	↑	↑	↑	↑
2. <i>in vitro</i>			↑	↓	↑	↓
3. <i>In vivo</i>		↑		↑		↑



Примечание: НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; ↑ - увеличение; ↓ - уменьшение.

### 3.5. Изменение проницаемости ГЭБ после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии

Измерение концентрации Эванса голубого в плазме крови (Рис. 3.28) 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].

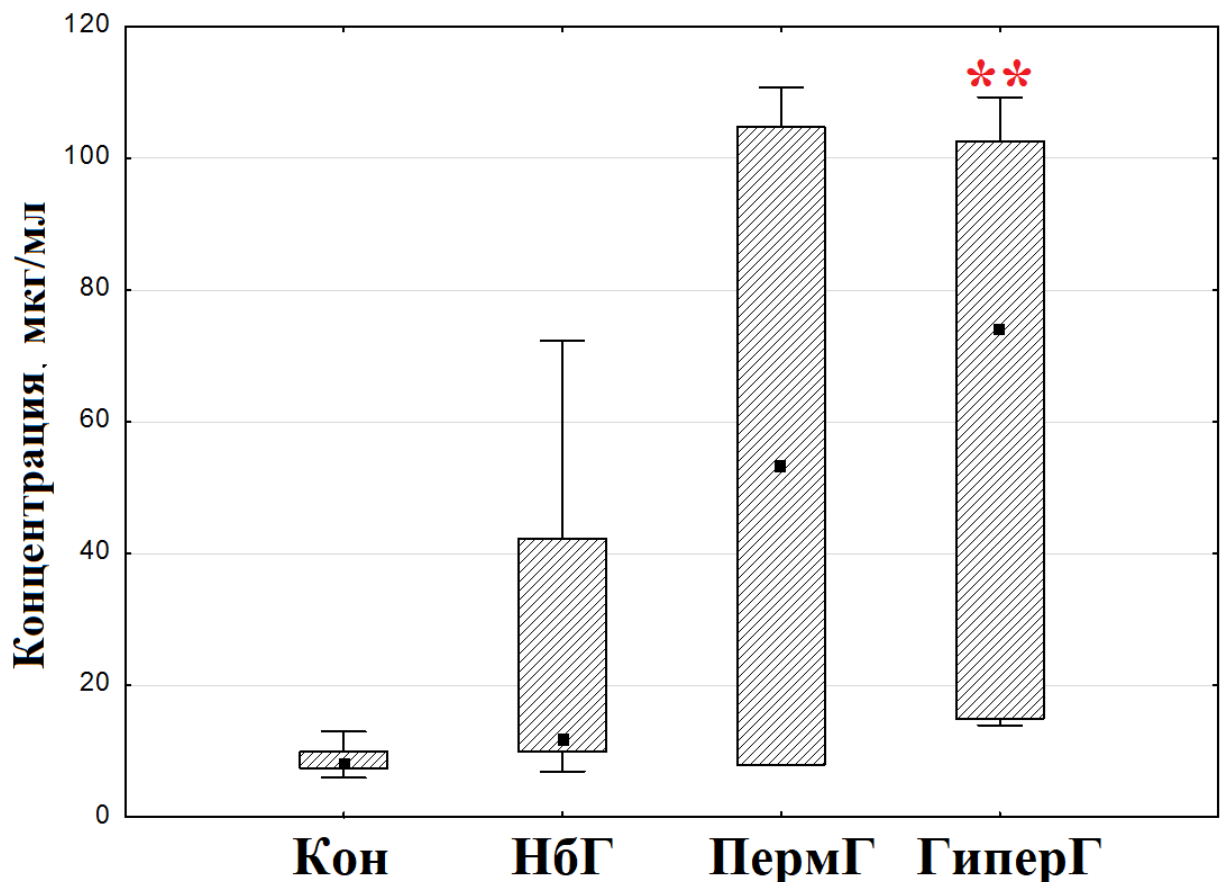


Рисунок 3.28. Концентрация Эванса голубого в плазме крови. Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ –



пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \*\* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ );

Интегративная оценка флуоресценции Эванса голубого в ткани головного мозга продемонстрировала, что увеличение оптической плотности относительно контрольных значений произошло только в группе ГиперГ ( $p < 0,05$ ) и составило 26% (Рис. 3.29).

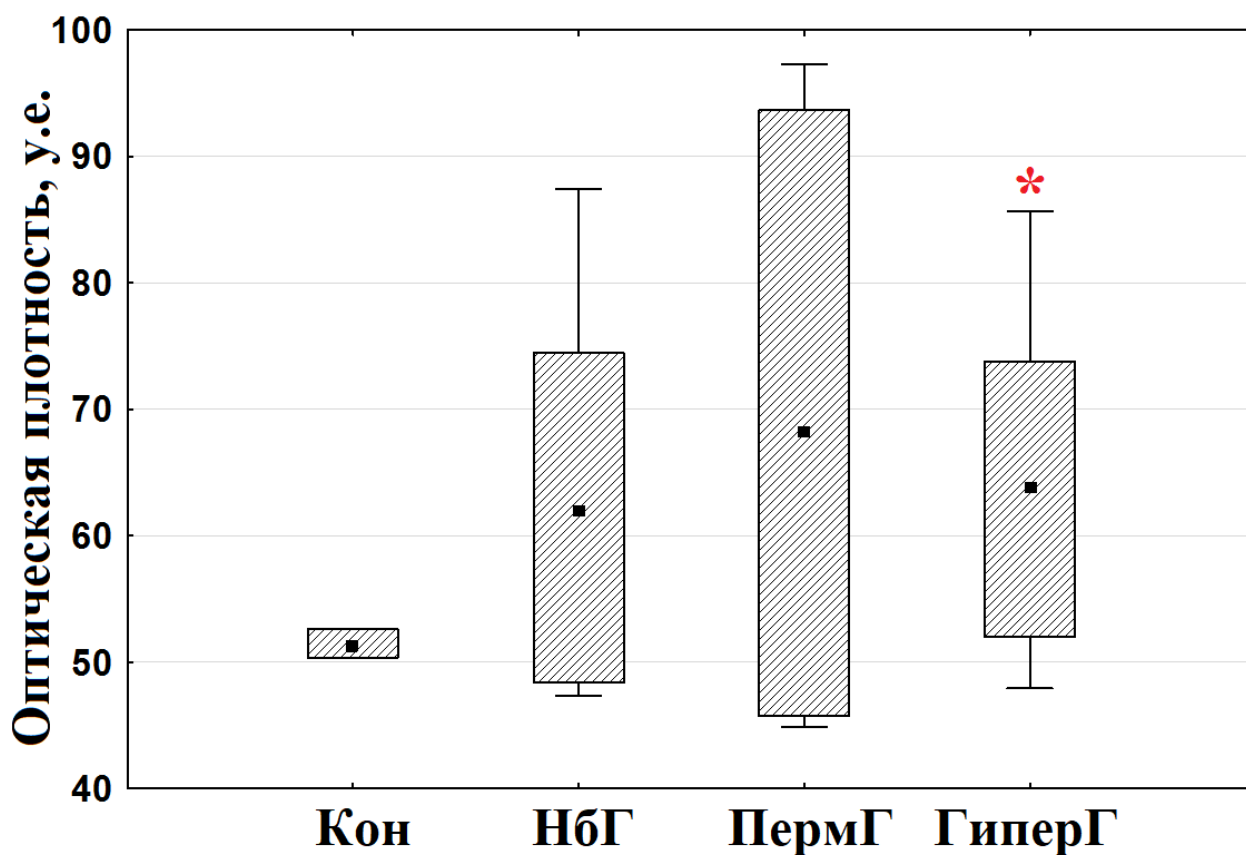


Рисунок 3.29. Оптическая плотность Эванса голубого в ткани мозга. Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* – отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ );

После расчета индекса проницаемости (Рис. 3.30), который более точно характеризует проницаемость/целостность ГЭБ, обнаружилось его существенное снижение в группах, которые подвергались респираторным

воздействиям с присутствием гиперкапнического компонента. Так, в группе ПермГ индекс проницаемости был ниже в 2 раза ( $p<0,05$ ), а в группе ГиперГ почти в 6 раз по сравнению с контрольной группой ( $p<0,001$ ).

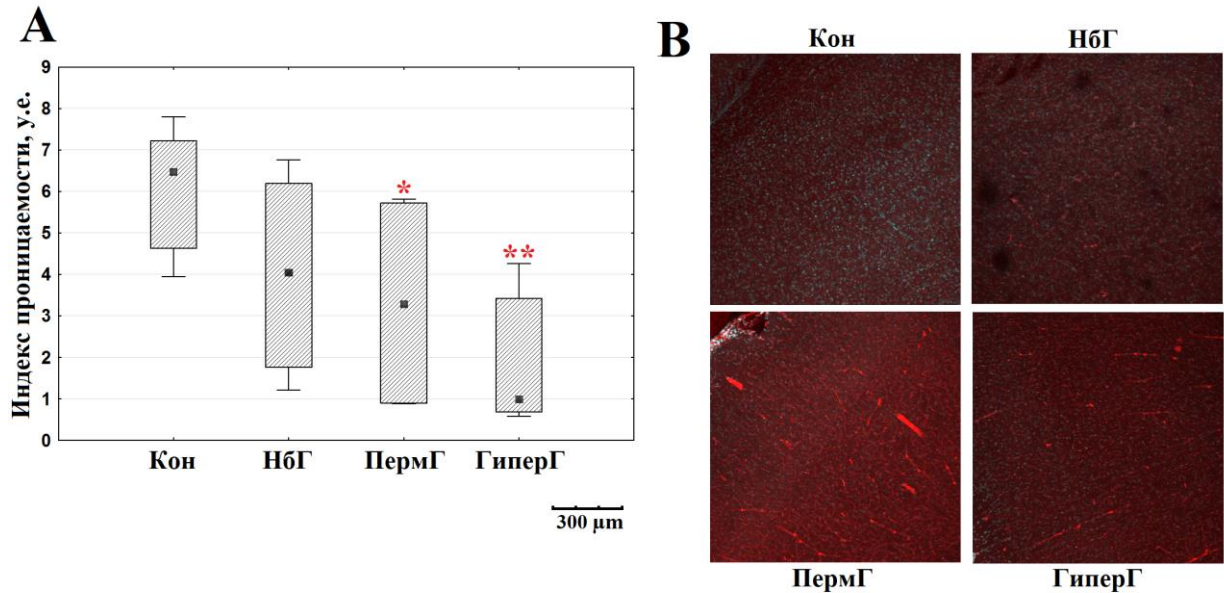


Рисунок 3.30. Проницаемость гематоэнцефалического барьера. (А) Индекс проницаемости ГЭБ для Эванса голубого, выраженный как оптическая плотность красителя в ткани мозга/ концентрация красителя в плазме крови. Кон – контрольная группа; НбГ – нормобарическая гипоксия; ПермГ – пермиссивная гиперкапния; ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ); \*\* - отличия по сравнению с контролем ( $p<0,001$ ). (В) Микрофотографии срезов коры головного мозга крыс. Увеличение  $\times 250$ . Конфокальная микроскопия. Синий цвет – DAPI; красный цвет – флуоресценция Эванса голубого.

## ГЛАВА 4

### РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 4.1. Оптимизация параметров гиперкапнически-гипоксических тренировок для увеличения резистентности к острой гипоксии

В контрольных группах уровень резистентности животных к экстремальной гипоксии в течение эксперимента не изменялся. Также, при оценке исходной резистентности к гипоксии, отсутствовали различия между группами во всех трех экспериментальных сериях. При этом во всех группах гиперкапнически-гипоксических тренировок тренировки приводили к увеличению показателей ВПП и ВЖ по сравнению с контролем и исходным уровнем.

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 (Рис. 4.1). 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 ( $p<0,01$ ).

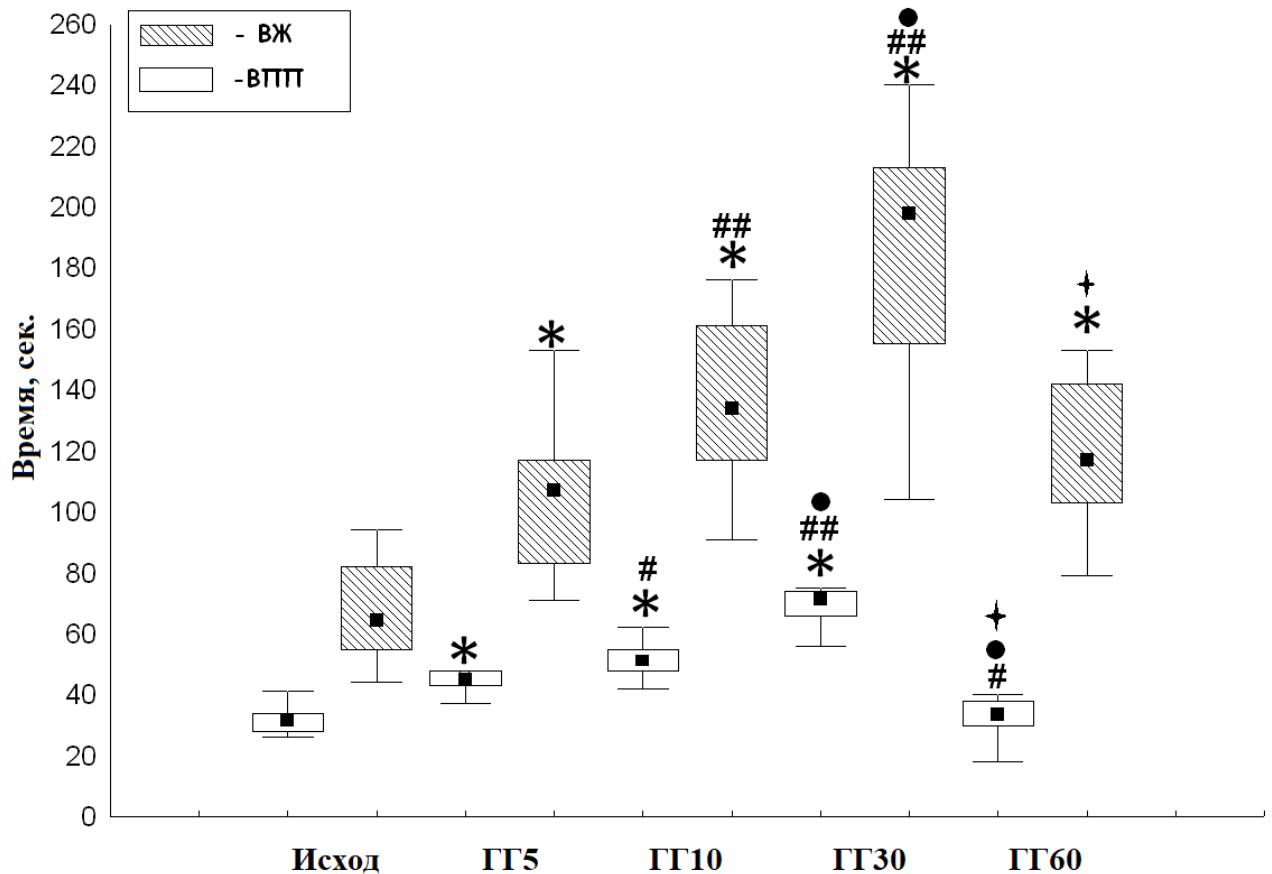


Рисунок 4.1. Зависимость времени потери позы и времени жизни у крыс от продолжительности воздействия. ГГ5 – 5-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ10 – 10-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ30 – 30-минутная гиперкапническая гипоксия; ГГ60 – 60-минутная гиперкапническая гипоксия; ВПП – время потери позы; ВЖ – время жизни; \* – отличия по сравнению с исходным уровнем ( $p < 0,01$ ); # – отличия по сравнению с ГГ5 ( $p < 0,05$ ); ## – отличия по сравнению с ГГ5 ( $p < 0,01$ ); • – отличия по сравнению с ГГ10 ( $p < 0,01$ ); + – отличия по сравнению с 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 ( $p < 0,01$ ) (Рис. 4.2). 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 групп гиперкапнически-гипоксических тренировок во время проведения третьей серии исследования были зарегистрированы в группе ИГГЗД ( $p < 0,01$ ), подвергнутой интервальным гиперкапнически-гипоксическим воздействиям.

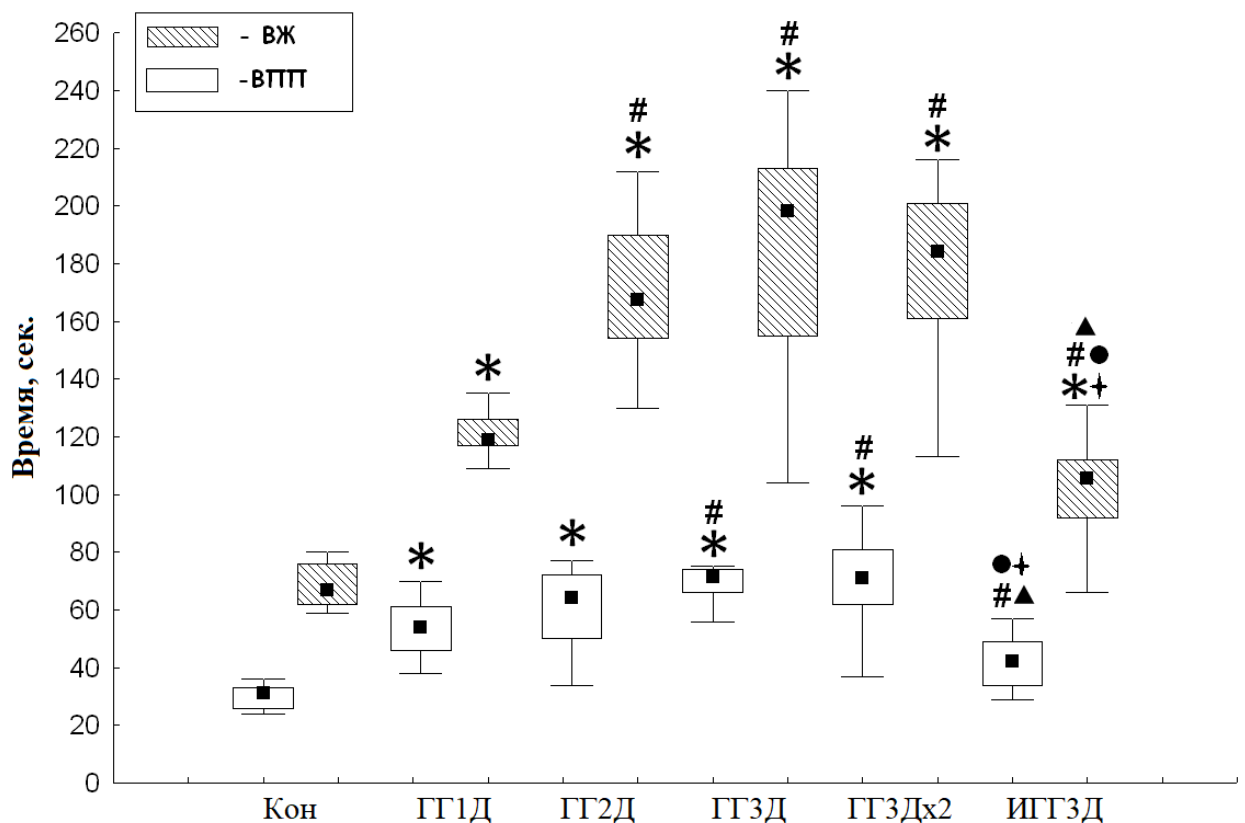


Рисунок 4.2. Зависимость времени потери позы и времени жизни у крыс от кратности воздействий и наличия периода реоксигенации. ГГ1Д - 1-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГ2Д - 2-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГ3Д - 3-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГ3Дx2 - 3-дневная гиперкапническая гипоксия по 2 сеанса в день; ИГГЗД - 3-дневная интервальная гиперкапническая гипоксия; Кон - контроль; ВПП - время потери позы; ВЖ - время жизни; \* - отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ); # - отличия по сравнению с ГГ1Д ( $p < 0,01$ ); • - отличия по сравнению с ГГ2Д ( $p < 0,01$ ); + - отличия по сравнению с ГГ3Д ( $p < 0,01$ ); ▲ - отличия по сравнению с ГГ3Дx2 ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2. Потенцирование защитного эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими средствами

Сравнительный анализ защитной эффективности при комбинировании гиперкапнически-гипокических 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. 4.3). При этом сочетание блокатора карбоангидразы ацетазоламида с воздействиями гиперкапнической гипоксии полностью устраняло нейропротекторный эффект респираторных тренировок ( $p < 0,01$ ).

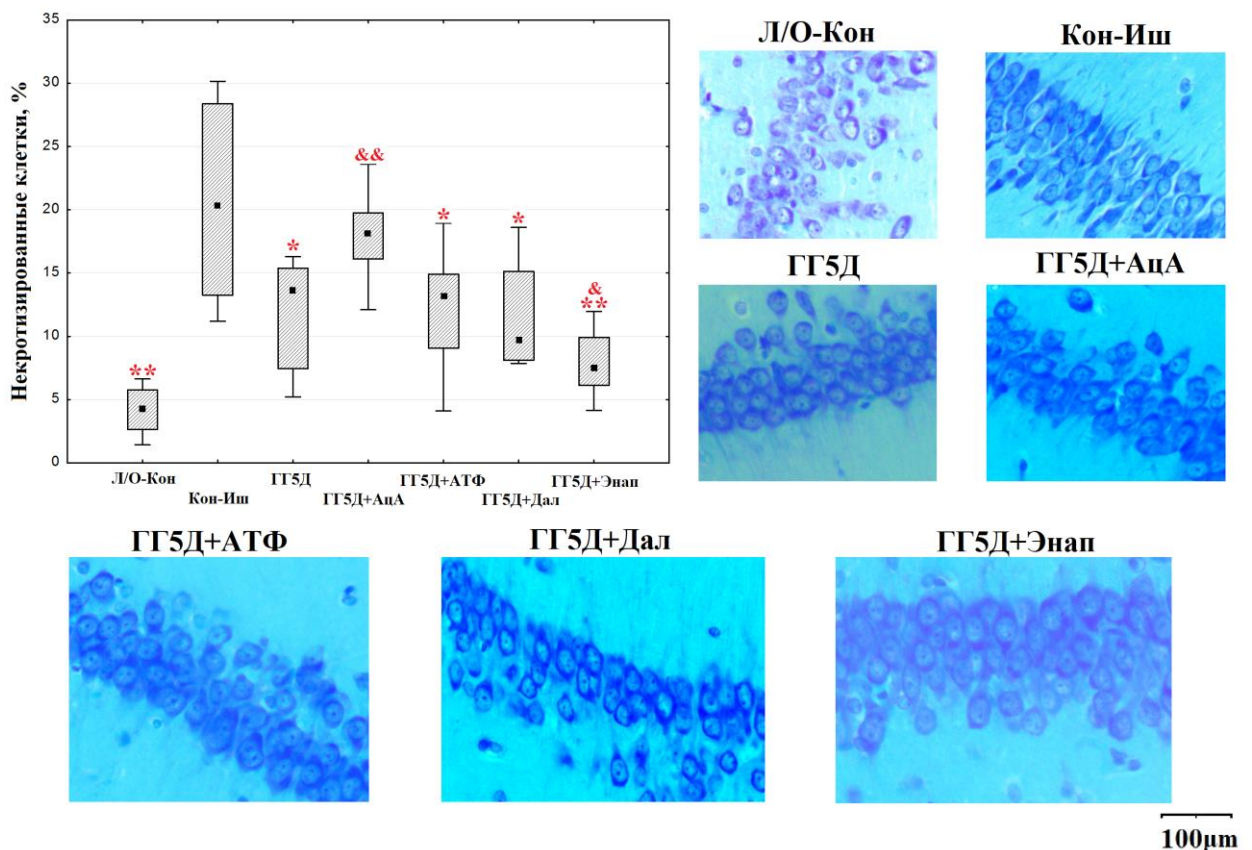


Рисунок 4.3. Доля поврежденных клеток в СА1 регионе гиппокампа после транзиторной ишемии. Увеличение  $\times 400$ . Л/О-Кон – ложно-оперированная

контрольная группа; Кон-Иш – контроль с ишемическим повреждением; ГГ5Д – 5-дневная гиперкапническая гипоксия; ГГ5Д+АТФ – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с аденозин трифосфатадинатриевой солью; ГГ5Д+АцА – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с ацетазоламидом; ГГ5Д+Дал – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с даларгином; ГГ5Д+Энап – 5-дневная гиперкапническая гипоксия с эналаприлом. \* – отличия по сравнению с группой Кон-Иш ( $p<0,05$ ); \*\* – отличия по сравнению с группой Кон-Иш ( $p<0,001$ ); & – отличия по сравнению с группой ГГ5Д ( $p<0,05$ ); && – отличия по сравнению с группой ГГ5Д ( $p<0,01$ ).

### **4.3. Влияние воздействий гиперкапнической гипоксии на интегративные показатели биологического и репродуктивного возраста мышей**

#### **4.3.1. Продолжительность жизни мышей в эксперименте**

Во время исследования мыши в основном умирали в старости, по естественным причинам. Некоторые животные в периоде половой зрелости скоропостижно погибли по причине агрессивного поведения сородичей и борьбе за лидерство. В результате, количество мышей, участвовавших в разных циклах тренировок, отличалось в ходе эксперимента (Таблица 4.1). Показатели массы тела мышей не различались у животных группы гиперкапнически-гипоксических тренировок и контрольной группы в сопоставимые периоды измерений (данные не представлены).

Таблица 4.1. Количество мышей, участвовавших в разных циклах тренировок.

	<b>Номер тренировочного цикла</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>ГиперГ</b>	самцы	10	9	9	8	7	5	4
	самки	8	7	3	3	2	1	0
<b>Кон</b>	самцы	9	9	8	7	3	0	0

	самки	9	7	4	4	1	0	0
--	-------	---	---	---	---	---	---	---

Примечание: ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль.

Максимальное количество полных курсов воздействия гиперкапнической гипоксии, которое было проведено во время исследования, составило 7 тренировочных циклов. Статистический анализ выживаемости мышей (Рис. 4.4) 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.

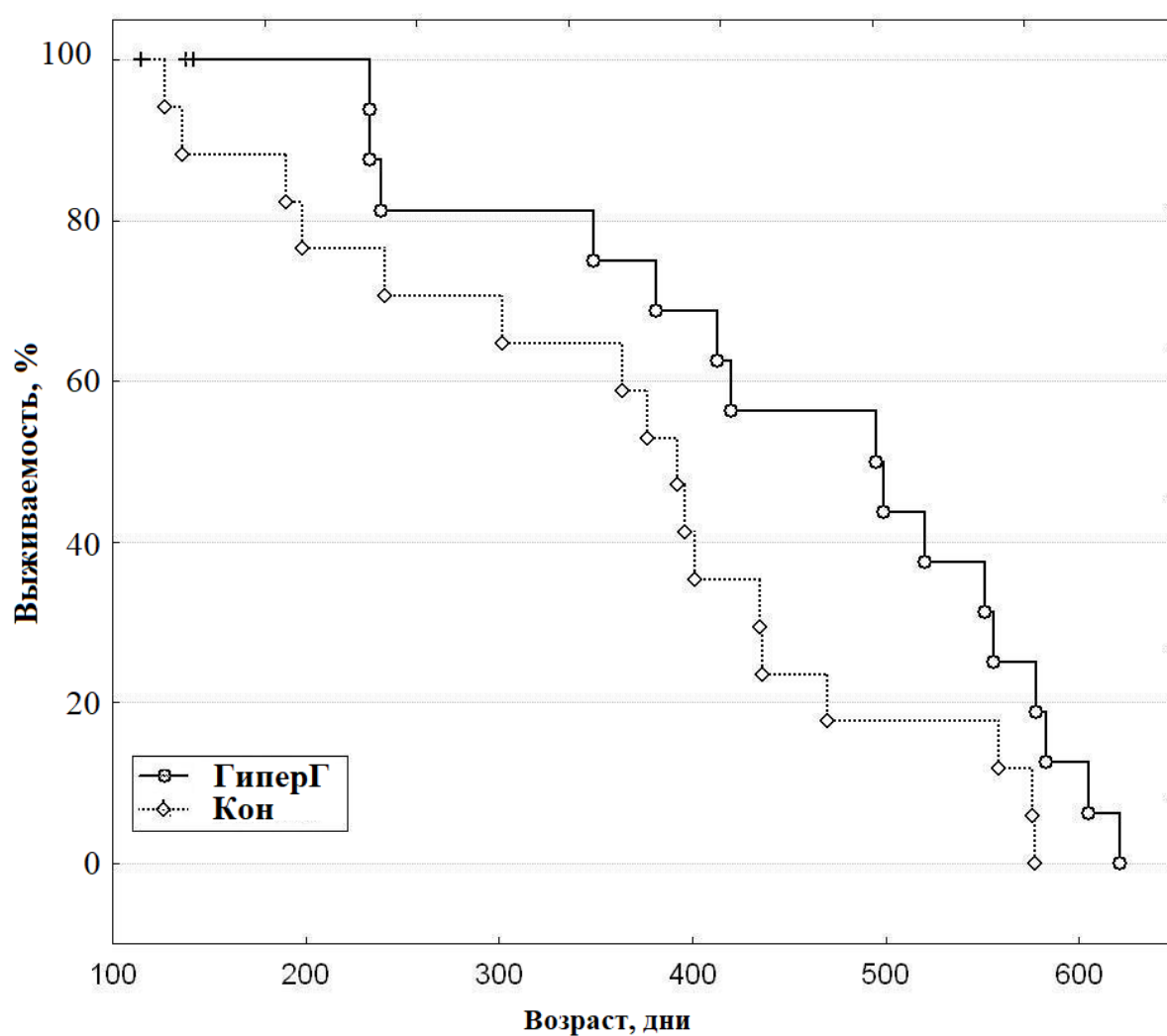




Рисунок 4.4. График выживаемости мышей во время эксперимента (по Каплан-Майер). ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль

#### 4.3.2. Причины смерти и репродуктивная активность мышей

За время проведения эксперимента в контрольной группе было зарегистрировано 2 случая острого нарушения мозгового кровообращения у самок в возрасте 6 месяцев, против одного случая в группе гиперкапнически-гипоксических тренировок (самка в возрасте 12 месяцев). Инсульт устанавливали на основании характерной неврологической симптоматики: одностороннее вращение вокруг продольной и/или поперечной оси тела, односторонняя спастичность мышц и птоз верхнего века. Причина смерти была подтверждена результатами некропсии.

В контрольной группе было зарегистрировано 6 случаев возникновения спонтанных опухолей молочных желез у самок (Рис. 4.5), характерных для мышей в половозрелом возрасте и, как правило, являющихся В-клеточной лимфомой [Anisimov V.N. et al., 2007]. Подобная опухоль впервые была зарегистрирована у самки из контрольной группы в возрасте 10 месяцев. При этом в группе гиперкапнически-гипоксических тренировок был выявлен только 1 случай образования опухоли - у самки в возрасте 13 месяцев. Патогистологический диагноз у мышей, имеющих опухоли, не устанавливался по причине отсутствия необходимости в этих данных, т.к. это выходило за область интересов данного эксперимента. Однако, факт существенного различия в количестве опухолей у животных из разных групп нельзя было оставить без внимания.



Рисунок 4.5. Самки мышей из контрольной группы со спонтанными опухолями.

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. et al., 2008]. После первого цикла тренировок средняя рождаемость была выше в группе мышей, подвергаемых респираторным тренировкам с гиперкапнической гипоксией ( $p < 0,05$ ) (Рис. 4.6А). 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.

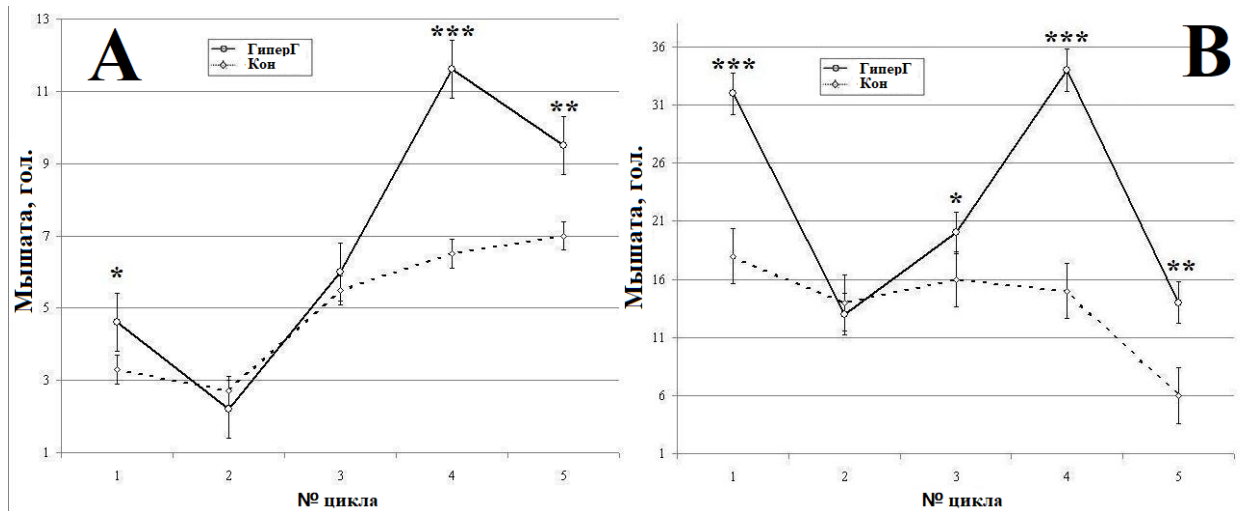


Рисунок 4.6. Рождаемость потомства во время эксперимента, выраженная в среднем количестве рожденных мышат на одну самку (А). Динамика выживаемости потомства, рожденного у мышей во время проведения эксперимента (В). ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль; \* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ); \*\* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,01$ ); \*\*\* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ).

Показатели выживаемости мышат, доживших до возраста 28 дней, показали сходную тенденцию с показателями рождаемости (Рис. 4.6В). 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.

#### 4.3.3. Мышечная сила и физическая утомляемость мышей

Исходные показатели мышечной силы и физической утомляемости не различались между группами (Рис. 4.7 и 4.8). 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 ( $p<0,01$ ).

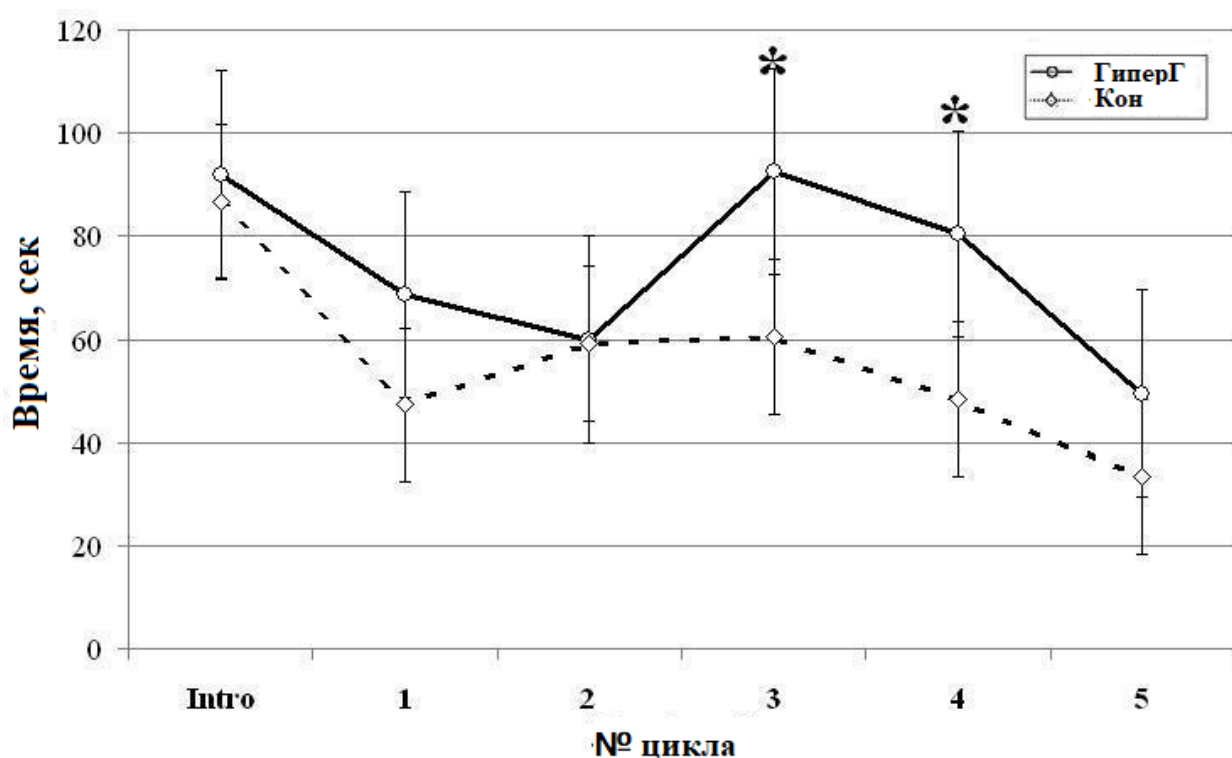


Рисунок 4.7. Динамика среднего времени удерживания на подвешенной струне. ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль; \* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p<0,01$ ).

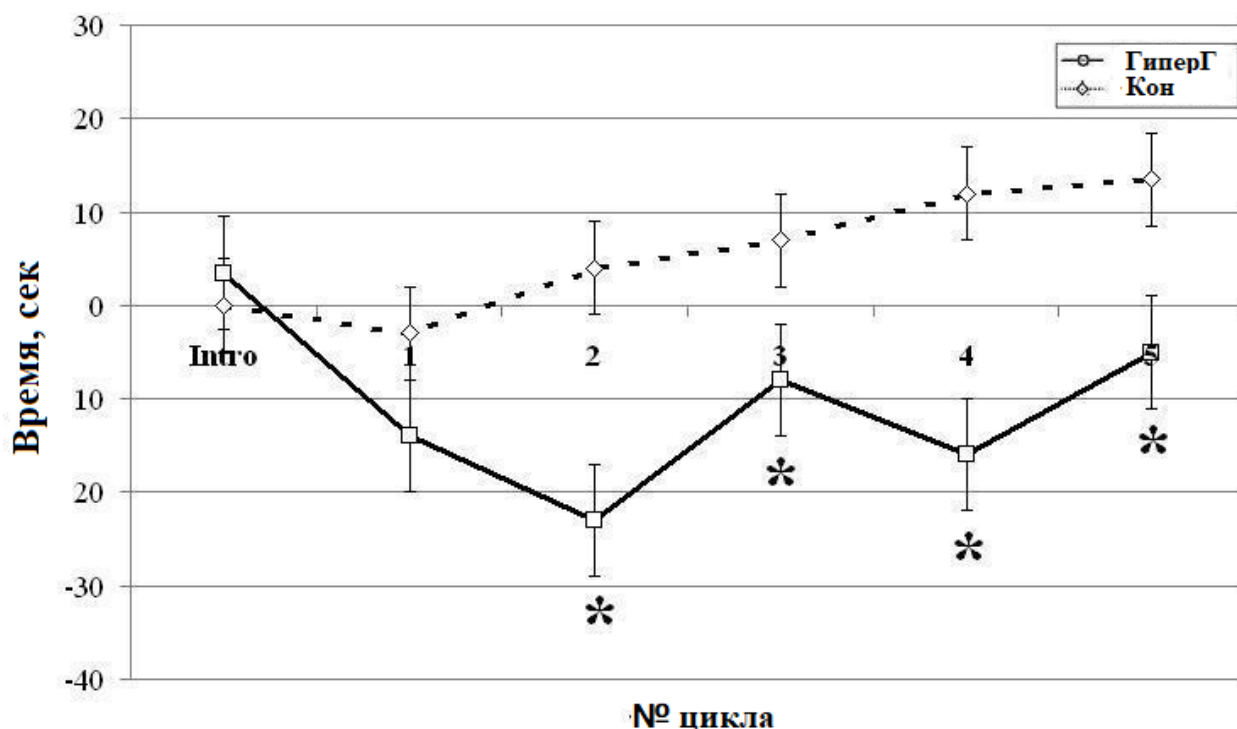


Рисунок 4.8. Динамика времени восстановления мышечной силы в виде разницы между продолжительностью первой и второй попытками удержания на струне. ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль; \* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,01$ ).

#### 4.3.4. «Открытое поле» и «Темно-светлая камера»

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» (Рис. 4.9) 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.

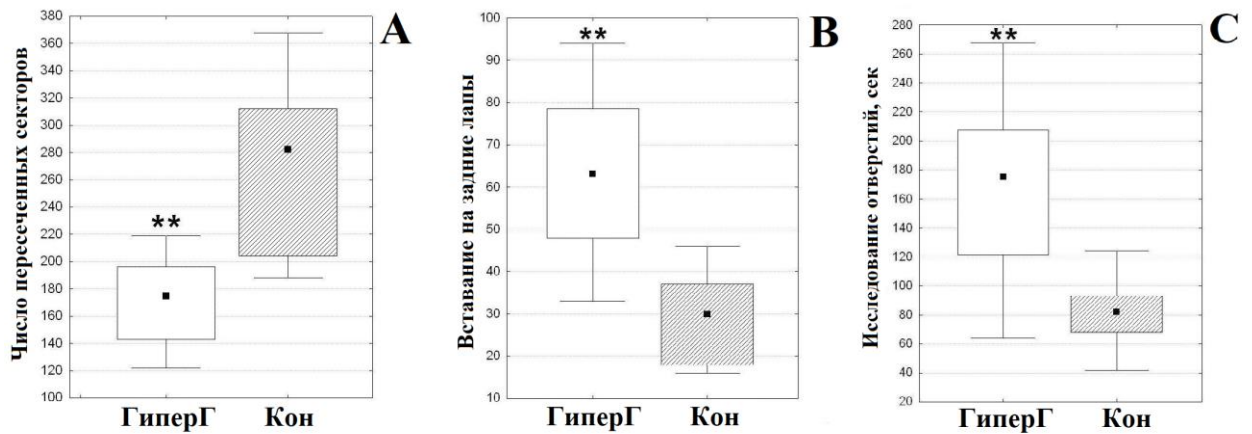


Рисунок 4.9. Результаты поведенческого тестирования на установке «Открытое поле»: Горизонтальная двигательная активность (А); Вертикальная двигательная активность (В); Исследование «норок» (С); ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль; \*\* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,01$ ).

Исследование мышей в тесте «Темно-светлая камера» (Рис. 4.10) 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  $\Delta t$  больше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля.

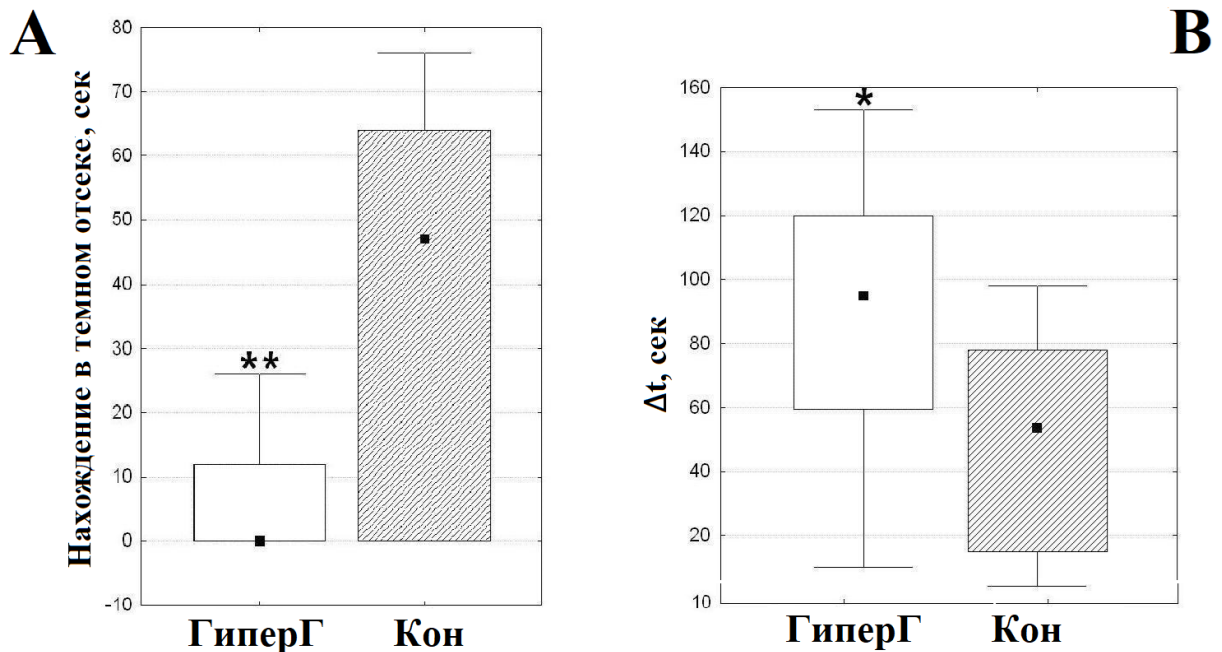


Рисунок 4.10. Результаты поведенческого тестирования на установке «Темно-светлая камера»: Время пребывания в темной камере (А); Разница между временем пребывания животного в затемненном отделении до выработки условного рефлекса пассивного избегания и при его формировании (В); ГиперГ – гиперкапническая гипоксия; Кон – контроль; \* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ); \*\* - отличия по сравнению с группой контроля ( $p < 0,01$ ).

#### 4.4. Функциональное состояние нервной системы у пациентов с детским церебральным параличом после курса гиперкапнически-гипоксических тренировок

##### 4.4.1. Рандомизация и состав групп исследования.

В общей сложности 74 пациента со спастической формой детского церебрального паралича было приглашено для участия в исследовании. Из них, 19 пациентов были исключены, так как не соответствовали критериям включения или соответствовали критериям исключения. В процессе наблюдения еще 13 пациентов выбыли из эксперимента по причине возникновения инфекционных заболеваний респираторного тракта (4 из группы плацебо и 3 из группы воздействия гиперкапнической гипоксией) и

по причине негативного восприятия респираторных воздействий (2 из группы плацебо и 4 из группы воздействия гиперкапнической гипоксией). Все этапы исследования прошло 20 пациентов из группы плацебо (А) и 22 пациента из группы воздействия гиперкапнической гипоксией (В). Анализ результатов рандомизации показывает, что группы А и В значимо не различались по всем параметрам (Таблица 4.2).

Таблица 4.2. Рандомизация пациентов в группы «А» и «В» перед началом проведения курса гиперкапнических воздействий.

	Пол		Возраст, лет		Баллы по GMFM-66	
	А	В	А	В	А	В
М	8	13	M±SD		M±SD	
Ж	12	9				
Σ	20	22	4,6±1,7	5,1±1,4	73±20,3	70,2±18,5
<i>p</i>	0,30		0,30		0,70	

Категория/ уровень	GMFCS		CFCS		MACS		GMFM-66	
	А	В	А	В	А	В	А	В
1	7	4	9	9	7	8	8	7
2	5	7	8	11	10	9	5	10
3	8	11	-	-	-	2	7	3
4	-	-	-	-	-	-	-	2
Не учитывались	-	-	3	2	3	3	-	-
<b>уровень <i>p</i></b>	<b>0,61</b>		<b>0,68</b>		<b>0,80</b>		<b>0,73</b>	

Примечание: Данные по неврологическим шкалам представлены в виде количества пациентов, относящихся к той или иной категории/уровню.

#### 4.4.2. Неврологический статус.

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 (Таблица 4.3), что указывает на успешную рандомизацию. В динамике прохождения курса



лечения, 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 лечения. После проведения тренировок так же не было выявлено достоверных различий в неврологическом статусе у пациентов из групп А и В.

Таблица 4.3. Результаты оценки неврологического статуса по шкале GMFM-66.

	Группа А (N=20)		Группа Б (N=22)	
	До тренировок	После тренировок	До тренировок	После тренировок
<b>Баллы GMFM-66</b>	72,3±20,3	75,6±19,9*	67,4±18,5	70,5±18,1*

Примечание: Данные представлены в виде среднего (М) и среднеквадратичного отклонения (σ). Группа А – плацебо-контроль; Группа Б – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; \* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p<0,001$ ).

#### 4.4.3. Показатели электроэнцефалограммы.

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 ( $p<0,05$ ) (Таблица 4.4). Эти данные могут свидетельствовать о позитивном влиянии стандартного лечения на биоэлектрическую активность мозга (БЭА).

Таблица 4.4. Показатели ритмов мозговой активности на электроэнцефалограмме.

	ГРУППА А (N=20)					
	Выраженность, %		Частота, Гц		Амплитуда, мкВ	
<b>Ритмы</b>	До тренировки	После тренировки	До тренировки	После тренировки	До тренировки	После тренировки

<b>альфа</b>	55 [48; 58]	55 [45; 60]	7,5 [7,25; 8]	8* [7,5; 8,25]	50 [45; 60]	50 [47,5; 50]
<b>бета</b>	25 [20; 30]	27,5 [20; 30]	25 [25; 25]	25 [25; 25]	10 [10; 10]	10 [10; 10]
<b>тета</b>	20 [15; 35]	17,5 [15; 32,5]	5,5 [5,5; 5,5]	5,5 [5,25; 5,5]	40 [35; 42,5]	40 [35; 32,5]
<b>ГРУППА В (N=22)</b>						
	<b>Выраженность, %</b>		<b>Частота, Гц</b>		<b>Амплитуда, мкВ</b>	
<b>Ритмы</b>	До трениро вки	После трениров ки	До трениро вки	После трениров ки	До трениров ки	После трениров ки
<b>альфа</b>	50 [50; 60]	50 [40; 60]	8 [7; 8,5]	7,5 [7; 8]	50 [40; 60]	50 [40; 55]
<b>бета</b>	22,5 [20; 30]	27,5 [20; 30]	25 [25; 25]	25 [25; 25]	10 [10; 10]	10 [10; 10]
<b>тета</b>	22,5 [10; 30]	27,5 [10; 40]	5,5 [5,5; 5,5]	5,5 [5,5; 5,5]	35 [30; 45]	35 [30; 45]

Примечание: Данные представлены в виде медианы, P25 и P75. Группа А – плацебо-контроль; Группа Б – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; \* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ ).

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» ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4.5), что свидетельствует о позитивном влиянии стандартного лечения на БЭА. В группе воздействия гиперкапнической гипоксией значимых изменений при регистрации патологических феноменов не наблюдалось.

Таблица 4.5. Результаты нейрофизиологического исследования пациентов на наличие патологических феноменов.

	<b>Группа А (N=20)</b>		<b>Группа В (N=22)</b>	
	До тренировок	После тренировок	До тренировок	После тренировок

Периодическое замедление	0%	0%	0%	0%
Эпилептиформная активность	20%	20%	23%	23%
Билатерально-синхронные вспышки (дисфункция срединных структур)	15%	5%	4,5%	13,6%
Общее замедление корковой ритмики	25%	15%*	41%	41%
Отставание ЭЭГ от возрастной нормы	40%	25%*	32%	32%

Примечание: Данные представлены в процентах от общего количества пациентов в группе. Группа А – плацебо-контроль; Группа Б – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; \* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ );

#### 4.4.4. Эндогенные вызванные потенциалы.

В обеих группах в динамике лечения произошло увеличение амплитуды пиков N2 и P3 эндогенных вызванных потенциалов (ВП) в сочетании со снижением их латентности (Таблица 4.6). 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 4.6. Показатели когнитивных эндогенных вызванных потенциалов (методика P300).

	ГРУППА А (N=20)		ГРУППА В (N=22)	
	До тренировок	После тренировок	До тренировок	После тренировок

<b>А N2, мкВ</b>	1,92 [1,34;3,23]	3,375** [3,16;6,71]	2,97 [2,03;3,9]	3,85** [2,85;7,22]
<b>ЛП N2, мс</b>	213 [200;226]	206** [200;217,5]	209,5 [203;223]	206,5* [200;217]
<b>А P3, мкВ</b>	6,38 [4,48;10,23]	10,55** [8,55;13,2]	5,95 [5,3;10,3]	10,38** [6,3;13,5]
<b>ЛП P3, мс</b>	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 Б – 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 ( $p<0,05$ ).

#### 4.4.5. Магнитная стимуляция.

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 (Таблица 4.7). В группе воздействия гиперкапнической гипоксией наблюдалось более значительное уменьшение этих показателей.

Таблица 4.7. Показатели уровня межосевой асимметрии при магнитной стимуляции пирамидного тракта с определением порогов возбудимости.

	Группа А (N=20)		Группа В (N=22)	
	Справа	Слева	Справа	Слева

<b>ВЦМП-С</b>	0 [-0,3; 3]	0,2 [-0,1; 2]	1 [0; 4]	1,85 [0; 5,4]
<b>ВА-С</b>	0 [0; 0,2]	0 [0; 0,2]	0 [-0,1; 0,4]	0 [-0,1; 0,4]
<b>ВЦМП-S</b>	0 [-4; 1]	0 [-10,1; 1]	0,5 [0; 3]	0,4 [0; 3]
<b>ВА-S</b>	0 [0,01; 0]	0 [-0,1; 0]	0# [0; 0,2]	0# [0; 0,2]
<b>ПВ 1</b>	0 [0; 11,5]	0 [-2,5; 8,5]	7 [0; 20]	7,5# [0; 23]
<b>ПВ 2</b>	0 [0; 0]	0 [-10; 0]	0 [0; 5]	0 [-2; 0]

Примечание: Данные представлены в виде медианы, P25 и P75 от разницы значений каждого показателя до и после курса тренировок. Группа А – плацебо-контроль; Группа Б – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; ВЦМП-С - время центрального моторного проведения от моторной зоны коры головного мозга до аксонов корешков CVI-CVII; ВЦМП-S – то же до корешков SI-SII; ВА-С - величина асимметрии для ВЦМП-С; ВА-S – то же для ВЦМП-S; ПВ 1 – порог возбудимости при стимуляции в первой точке, необходимый для появления ответа с *m. flexor digiti minimi brevis*; ПВ 2 - то же при стимуляции в первой точке, необходимый для появления ответа с *m. flexor hallucis brevis*; # - отличия статистически значимы между группами ( $p < 0,05$ ).

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 (Таблица 4.8). 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.

Таблица 4.8. Показатели магнитной стимуляции пирамидного тракта с определением порогов возбудимости.

	<b>ГРУППА А (N=20)</b>			
	<b>СПРАВА</b>		<b>СЛЕВА</b>	
	До тренировок	После тренировок	До тренировок	После тренировок
<b>ВЦМП-С, мс</b>	10,2 [0; 14,1]	9,7 [7; 12,6]	10,35 [0; 12]	9,2 [7,4; 11,1]
<b>ВА-С, мс</b>	0,2 [0; 0,8]	0,15 [0; 0,4]	0,2 [0; 0,8]	0,15 [0; 0,4]
<b>ВЦМП-S, мс</b>	13,8 [0; 22,6]	19,1 [10,2; 22,3]	14 [0; 22]	19 [10,1; 22,3]
<b>ВА-S, мс</b>	0 [0; 0,2]	0,05 [0; 0,3]	0 [0; 0,2]	0,1 [0; 0,3]
<b>ПВ 1, Т</b>	85 [0; 100]	71 [60; 87]	77,5 [0; 100]	80 [60; 83]
<b>ПВ 2, Т</b>	0 [0; 100]	80 [0; 100]	0 [0; 100]	90 [0; 100]
	<b>ГРУППА В (N=22)</b>			
	<b>СПРАВА</b>		<b>СЛЕВА</b>	
	До тренировок	После тренировок	До тренировок	После тренировок
<b>ВЦМП-С, мс</b>	11,4 [7,8; 15,6]	9,2* [7,2; 11,4]	12,1 [9; 13,4]	9,55** [7,5; 11,0]
<b>ВА-С, мс</b>	0,3 [0; 2,0]	0,2 [0; 1,4]	0,3 [0; 2,0]	0,2 [0; 1,0]
<b>ВЦМП-S, мс</b>	20 [13; 24,7]	20 [16,3; 21,8]	20,7 [13,1; 24,2]	20,3* [13,9; 22]
<b>ВА-S, мс</b>	0,2 [0; 0,7]	0,2 [0; 1,3]	0,2 [0; 0,7]	0,2 [0; 1,3]
<b>ПВ 1, Т</b>	85,5 [75; 100]	70*** [60; 85]	84 [75; 100]	72,5** [60; 80]
<b>ПВ 2, Т</b>	86 [0; 95]	86 [50; 100]	86 [0; 95]	86 [0; 100]

Примечание: Данные представлены в виде медианы, P25 и P75. Группа А – плацебо-контроль; Группа Б – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; ВЦМП-С - время центрального моторного проведения от

моторной зоны коры головного мозга до аксонов корешков CVI-CVII; ВЦМП-S – то же до корешков SI-SII; BA-C - величина асимметрии для ВЦМП-C; BA-S – то же для ВЦМП-S; ПВ 1 – порог возбудимости при стимуляции в первой точке, необходимый для появления ответа с *m. flexor digiti minimi brevis*; ПВ 2 - то же при стимуляции в первой точке, необходимый для появления ответа с *m. flexor hallucis brevis*; \* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p<0,05$ ); \*\* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p<0,01$ ); \*\*\* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p<0,001$ ).

#### 4.4.6. Реактивность на гиперкапнически-гипоксическое воздействие

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 (Таблица 4.9.). 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 ( $p<0,05$ ).

Таблица 4.9. Распределение пациентов по типам стратегии адаптации к гиперкапнической гипоксии.

Группа	Первичное тестирование реакции на гиперкапническую гипоксию*			Повторное тестирование реакции на гиперкапническую гипоксию*		
	Тип «гипервентиляция»	Тип «гомеостаз»	Тип «избегание»	Тип «гипервентиляция»	Тип «гомеостаз»	Тип «избегание»
А	28%	39%	33%	44%	22%	33%
В	62%	33%	5%	29%*	57%*	14%

Примечание: Данные представлены в виде процентного отношения к общему количеству пациентов в группе. Группа А – плацебо-контроль; Группа Б – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; \* - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p<0,05$ ).



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 ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4.10). Это свидетельствует о более успешной адаптации детей после респираторных тренировок. Из таблицы следует, что 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».

Таблица 4.10. Распределение пациентов по достижению целевых значений гиперкапнии во время первичного и повторного тестирования реакции на гиперкапнически-гипоксическое воздействие.

Группа	Достижение целевого $F_{et}CO_2$ во время первичного тестирования реакции	Достижение целевого $F_{et}CO_2$ во время повторного тестирования реакции	Пациенты, перешедшие на неблагоприятный тип стратегии адаптации или сохранившие его	Пациенты, изменившие тип стратегии адаптации с неблагоприятного на благоприятный	Пациенты, сохранившие благоприятный тип стратегии адаптации
А	44%	39%	78%	11%	11%
В	38%	71% <sup>#</sup>	43%***	38%*	19%

Примечание: Группа А – плацебо-контроль; Группа В – группа тренировок гиперкапнической гипоксией; # - отличия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ ); \*\*\* - отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ); \* - отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 5

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первый блок экспериментальных серий выполнен двумя частями, первая из которых была посвящена исследованию синтетической активности нервных клеток в околоинсультной области крыс и динамике клеточного индекса у сокультур астроцитов/нейронов. Результаты, полученные в этой части, показали доминирующее влияние гиперкапнии на активацию синтетической активности в нервных клетках при фокальном ишемическом повреждении головного мозга (Рисунок 5.1). Об этом свидетельствует увеличение среднего количества ядрышковых организаторов в нервных клетках, являющееся следствием повышенного синтеза рибосомальной РНК на ядрышкообразующих хромосомах [Husain N. et al., 1997], что приводит к усилению синтеза нейромедиаторов в нейронах, структурных белков и нейротрофических факторов в клетках глии [Зуев В.А. и др., 2000]. Этот процесс играет важную роль в механизме нейропротекции при ишемическом повреждении нервной ткани, так как увеличение синтетической функции у микроглиальных клеток позволяет снизить последствия трофических нарушений, а повышенная экспрессия нейромедиаторов имеет высокое репаративное значение для нейронов, находящихся в фазе паранекроза и некробиоза [Obrenovitch T.P., 2008].

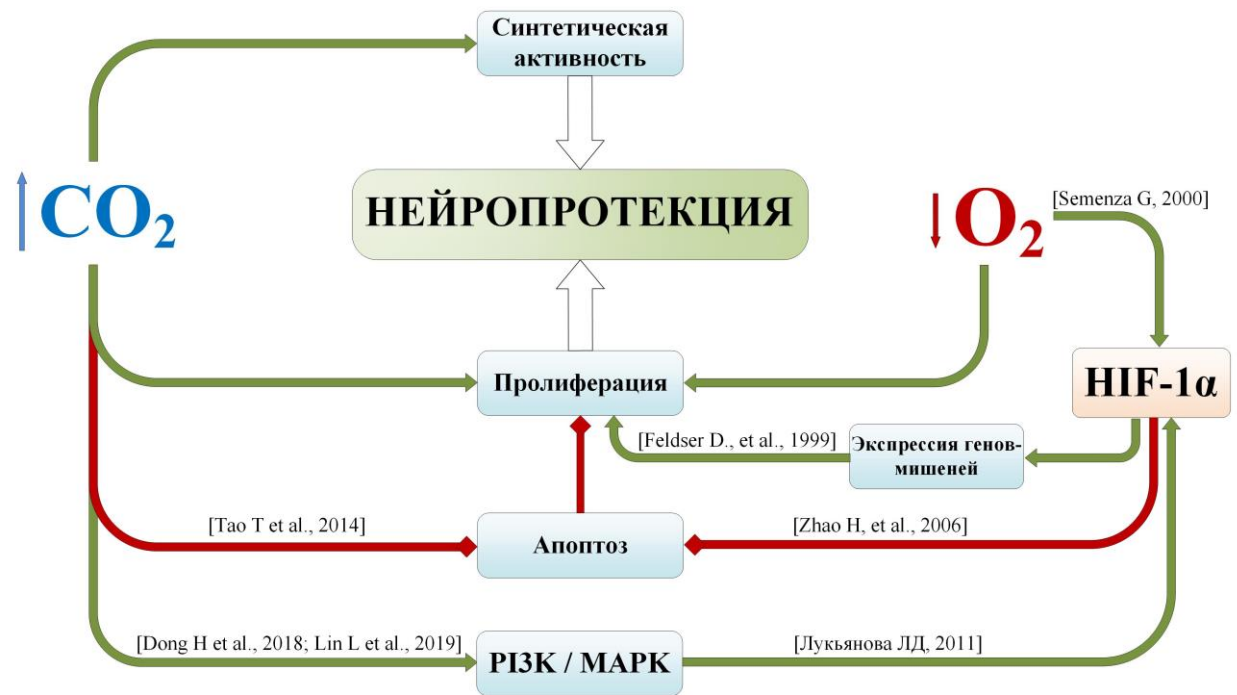


Рисунок 5.1. Воздействие пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии на сигнальные пути, повышающие синтетическую активность нервных клеток в околоинсультной области. Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

Из литературных данных известно, что нормобарическая гипоксия вызывает активацию синтетической и пролиферативной активности в клетках. В исследованиях, где это было продемонстрировано ранее [Антонова О.А. и др., 2007; Антонова Л.В. и др., 2014], использовались более выраженные уровни гипоксии (57 - 71 мм рт.ст.), а время сенаса воздействия было намного дольше (1-6 часов), чем в нашем эксперименте. При этом мы отдавали себе отчет, что положительного эффекта при менее интенсивном режиме воздействия в группе нормобарической гипоксии могло не произойти. Однако, выбор в пользу более низкого уровня гипоксии был связан с тем, что такие параметры показали высокую эффективность в сочетании с пермиссивной гиперкапнией для профилактики экспериментальной ишемии у крыс [Tregub P. et al., 2015].

Результаты оценки клеточного индекса у астроцитов и нейронов после сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и/или гипоксии, полученные на модели *in vitro*, позволяют утверждать, что химическая гипоксия оказывает угнетающее влияние на активность интактных клеток только первые 12 ч наблюдения. При этом гипоксическое воздействие оказывает стимулирующий эффект на клеточную активность, которая оставалась повышенной на протяжении всего периода наблюдения. При этом острая химическая гипоксия не повлияла на динамику клеточного индекса у групп клеток, подвергнутых нормобарической гипоксии *in vivo*, до выделения в культуру, что свидетельствует о её протективной эффективности. Эти эффекты могут быть связаны со стимулирующим влиянием интермиттирующей гипоксии на функционирование сигнальных путей активации транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ , который аккумулируется в ответ на химическую гипоксию *in vitro* и запускает антиапоптотические механизмы в клетках [Yeom C.J. et al., 2016; Li S.J. et al., 2017], часто сочетаясь со многими онкогенными гиперпролиферативными состояниями [Pezzuto A. et al., 2018; Vaupel P. and Mayer A., 2007].

Кроме того, данные, полученные на астроцитарно-нейрональных сокультурах, демонстрируют, что пермиссивная гиперкапния отсрочено повышает клеточную активность с формированием длительного латентного периода, что также свидетельствует о протективном потенциале CO<sub>2</sub>. Указанные процессы могут быть обусловлены ингибирующим влиянием углекислоты на апоптоз в нервных клетках [Zhou Q. et al., 2010; Tao T. et al., 2013, 2014], а также следствием активации систем MAPK и PI3K в микроглии с последующим повышением синтеза HIF-1 $\alpha$  по кислород-независимому пути [Лукьянова Л.Д., 2011; Dong H.P. et al., 2018; Lin L.T. et al., 2019].

Результаты по динамике клеточного индекса на базе биоимпедансного метода в планшетах xCELLigence RTCA, полученные в данной серии, можно косвенно интерпретировать в качестве показателя уровня жизнеспособности и пролиферации клеток. Подобный опыт в отношении клеточных культур

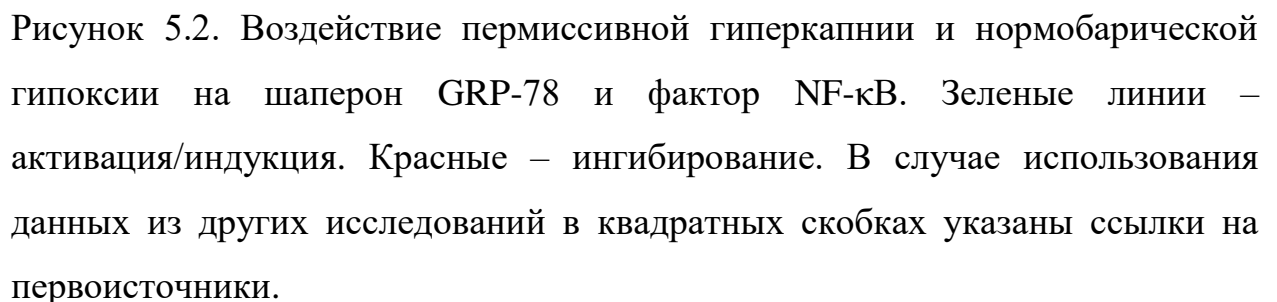
активно используется другими исследователями [Gheorghiu M., 2020]. Например, хорошая корреляция была обнаружена между показаниями метода xCELLigence RTCA и результатами обычных анализов клеточной пролиферации с экспрессией генов в эксперименте на культуре теноцитов человека и их реакции на различные стимулы, в т.ч. фармакологические [Chiu C.H. et al., 2017, 2019]. Однако, на силу клеточной адгезии, кроме пролиферации, определенно влияет множество факторов, включая тип клеток, их жизнеспособность, рост, миграция и распространение. В связи с этим, однозначная трактовка результатов RTCA-мониторинга клеточного индекса как доминирующего показателя одного из этих факторов имеет существенные ограничения, хотя и может использоваться в зависимости от контекста результатов [Yan G. et al., 2018; Gheorghiu M., 2020].

Важно отметить, что отрицательные значения клеточного индекса в группе воздействия гиперкапнической гипоксии на протяжении всего периода наблюдения после смены питательной среды целесообразно трактовать как тотальную гибель/потерю клеток, произошедшую по причине неопределённых морфофункциональных или адгезионных факторов. В пользу этого утверждения также свидетельствуют высокие темпы прироста клеточного индекса в группе сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии, наблюдаемые до момента частичной смены среды и моделирования химической гипоксии. В связи с указанными ограничениями в интерпретации данных, целесообразно воздержаться от выводов, касающихся угнетения пролиферативной клеточной активности при сочетанном воздействии пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии.

Таким образом, можно утверждать, что в механизме нейропротекции при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии важную роль играет процесс повышения клеточной активности и синтетической функции в нервных клетках, а гиперкапнический компонент имеет в нем определяющее значение.

По данным второй части первого блока, где исследовалась околоинсульная область на предмет активации адаптивной ветви ответа ЭПР, было установлено, что экспрессия шаперона GRP-78 была наименьшей в группе воздействия нормобарической гипоксии, что свидетельствует о выраженных нарушениях клеточного метаболизма и дезактивации адаптогенного потенциала нейронов, приводящих к дисфункции ЭПР. Возможно, данный факт обусловлен тем, что после 15-кратного курса гипоксических воздействий адаптогенные механизмы в ЭПР могли быть исчерпаны.

При этом содержание GRP-78 после воздействия гиперкапнической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии было выше, чем после воздействия гипоксии. Это может свидетельствовать о том, что гиперкапния в сочетании с гипоксией оказывает выраженное влияние на активацию шаперона GRP-78, а углекислота в этом процессе имеет доминирующее влияние (Рисунок 5.2). Сходная тенденция была отмечена нами при исследовании HSP-70 в сыворотке крови крыс [Беспалов А.Г. и др., 2014]. Следует отметить, что GRP-78 локализуется на мембране гранулярного ЭПР, имеет адаптивную функцию в клетках и играет ключевую роль в антиапоптозном эффекте при формировании внутриклеточного стресса, участвуя в рефолдинге белков [Dickhout J.G. and Krepinsky J.C., 2009].



После изолированных воздействий гипоксии и гиперкапнии экспрессия NF-κB в околоинсульной области также оказалась интенсивнее, чем в контроле. Это может быть связано как с одинаковой активностью гиперкапнии и гипоксии в отношении стимуляции этого фактора, так и с

переходом активной формы NF-κB из цитоплазмы в ядро. Данные о том, что воздействие умеренной интермиттирующей гипоксии вызывает активацию NF-κB в гиппокампе и неокортексе, чем способствует формированию толерантности к ишемии/гипоксии [Чурилова А.В. и др., 2009; Churilova A.V. et al., 2010; Samoilov M. et al., 2014], подтверждают результаты текущей серии, полученные в отношении нормобарической гипоксии.

Содержание NF-κB в цитоплазме нервных клеток было максимальным после сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии. Уровень нуклеарной экспрессии NF-κB был также наиболее выражен при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии. В группе воздействия пермиссивной гиперкапнии экспрессия оказалась менее интенсивной, но существенной по отношению к уровню контроля и нормобарической гипоксии. Это может свидетельствовать о том, что переход этого фактора в ядро не успел произойти при воздействии гипоксии, а при воздействии гиперкапнии, напротив, наблюдалось повышение цитоплазматической экспрессии NF-κB в сочетании с увеличением его нуклеарной концентрации, что может свидетельствовать о переходе активированного фактора внутрь ядра. Принимая во внимание этот факт, можно объяснить наибольшую цитоплазматическую и ядерную экспрессию фактора NF-κB в группе гиперкапнической гипоксии тем, что при сочетанном воздействии происходит суммирование эффектов, обуславливающее впоследствии наиболее выраженную нейропротекцию. С другой стороны, у гипоксии и гиперкапнии могут существовать разные пути для активации фактора NF-κB.

Таким образом, в отношении активации адаптивной ветви ЭПР можно заключить, что сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии максимально увеличивает экспрессию шаперона GRP-78 и фактора NF-κB. При этом гиперкапнический компонент при сочетанном воздействии с гипоксией является доминирующим в сигнальном пути активации GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB.



В рамках второго экспериментального блока проводилось исследование механизма нейропротекции, реализуемого через сигнальные пути ингибирования апоптоза, на моделях *in vivo* и *in vitro*. При этом оценка интенсивности апоптоза в околоинсультной области проводилась для срезов головного мозга методом ApopTag® ISOL, являющимся более точным и достоверным, по сравнению с распространенным методом TUNEL. Результаты оценки показали, что пермиссивная гиперкапния, в т.ч. при сочетании с гипоксией, оказывает ингибирующий эффект на апоптоз в околоинсультной области головного мозга крыс. Сходные данные в отношении пермиссивной гиперкапнии были получены двумя научными группами из Харбина - Zhou Q. и др. [2010] и Тао Т. и др. [2013; 2014], которые показали эффективность умеренной гиперкапнии для торможения апоптоза при ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга.

В следующей экспериментальной серии изучалось содержание клеток с индукторами апоптоза в околоинсультной области головного мозга крыс после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии (каспаза-3, АИФ, Вах, Bcl-2). Активная форма каспазы-3 – основная эффекторная каспаза в цитоплазме клетки, запускающая апоптоз. Ее активация может происходить как по «внутреннему» митохондриальному пути, так и по «внешнему» пути метаболизма через рецепторы смерти [Ferrer E. et al., 2003; Krantic S. et al., 2005]. Флавопротеин АИФ, высвобождающийся из межмембранного пространства митохондрий, действует по независимому от каспаз пути. Он попадает в клеточное ядро и вызывает конденсацию хроматина и активирует эндонуклеазы, которые участвуют во фрагментации ДНК [Candé C. et al., 2002]. Вах, в свою очередь, в комплексе с порином образует во внешней мембране митохондрий канал, по которому в цитоплазму высвобождаются цитохром С и АИФ, а Bcl-2 прямо или косвенно предотвращает этот процесс [Mohan S. et al., 2012; Vucicevic K. et al., 2016]. Известно, что в околоинсультной области первые 24 часа после ишемии происходит сверхэкспрессия и про- и антиапоптотических белков, поэтому выживание

отдельных клеток в этой области определяется балансом между ними [Uzdensky A.B., 2019]. При этом ингибирование апоптоза в клетках околоинсультной области считается одним из потенциальных подходов для противоинсультной терапии.

Оценка содержания клеток с проапоптотическими факторами (каспаза-3, АИФ и Вах) в клетках околоинсультной области головного мозга крыс показала, что они снижаются после воздействия пермиссивной гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии. Уровень клеток с противоапоптотическим фактором Bcl-2 повышался после всех режимов респираторных воздействий. Эти данные сопоставимы с результатами, полученными Тао Т. и др. [2013; 2014] в отношении пермиссивной гиперкапнии. По их информации умеренная гиперкапния ингибирует каспазу-3 и Цитохром С в цитозоле, а также снижает уровень Вах и повышает уровень Bcl-2 в митохондриях. Такие эффекты гиперкапнии, оказываемые преимущественно на митохондриальный апоптотический путь, могут быть обусловлены ее антиоксидантными эффектами [Barth A. et al., 1998; Zhao Z.S. et al., 1998; Goss S.P. et al., 1999; Zakynthinos S. et al., 2007], а также стабилизацией соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН и буферным эффектом бикарбоната на Ca<sup>2+</sup> [Obrenovitch T.P., 2008; Brini M. et al., 2014]. Апоптоз-ингибирующее влияние нормобарической гипоксии может быть связано с активацией системы PI3K [Zhao H. et al., 2006; Лукьянова Л.Д., 2011] и антиапоптотическим эффектом транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  [Li L. et al., 2007; Liu B.N. et al., 2014].

Интегративная оценка интенсивности апоптоза/некроза в культурах астроцитов и нейронов после различных режимов респираторных воздействий на моделях *in vitro* во второй серии демонстрирует, что наибольшей протекторной эффективностью обладают сочетанные воздействия гиперкапнии и гипоксии, проявляя отчетливую зависимость от длительности и количества экспозиций. Причем, непрерывные воздействия превышают по эффективности интервальные, а 12-часовое воздействие эффективнее, чем 24-часовое. Так же 2-циклового интервальный режим

эффективнее, чем 3-цикловой. Вместе с тем, 12-часовые воздействия пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии не вызывают сдвиг суммарного вектора апоптоз/некротического соотношения в какую-либо сторону, а 24-часовые, напротив, оказывают отрицательное влияние на клеточный цикл астроцитов и нейронов, как в физиологических условиях, так и при химической гипоксии. Примечательно, что 12-часовое воздействие нормобарической гипоксии и интервальной гиперкапнической гипоксии оказывают отрицательное влияние на культуры астроцитов и нейронов при условиях без химической гипоксии, а в условиях после химической гипоксии они же демонстрируют нейропротекторный эффект. Это может быть связано с возникновением выраженного субповреждающего стимула у этих режимов, который вызывает гибель части астроцитов и нейронов, наименее устойчивых к гипоксии, и формирует максимальную толерантность к ишемии у оставшегося клеточного пула. Также можно заметить, что количество апоптотических клеток после воздействия пермиссивной гиперкапнии различаются в моделях *in vitro* и *in vivo*. Так, в околоинсультной области интенсивность апоптоза снижается после воздействия пермиссивной гиперкапнии, а воздействие этого фактора на культуры астроцитов и нейронов не оказывает подобного эффекта. Это может быть связано как с отсутствием элемента нейроглиального взаимодействия между клетками в чистых культурах нейронов и астроцитов, так и с избыточным стрессовым эффектом длительных экспозиций. Кроме того, прямое отождествление направлений эффектов ограничено между разными моделями, по причине использования разных режимов воздействия: курсовые интермиттирующие сеансы у крыс *in vivo* и непрерывные длительные экспозиции у клеток *in vitro*.

В отличие от апоптоза, являющегося в высокой степени скоординированным процессом, подлежащим сложной регуляции, некроз расценивается как нерегулируемый процесс, происходящий всякий раз, когда повреждение клеток превосходит их репаративную способность. Тем не

менее, некоторые исследования предполагают, что клетки могут некротизироваться вследствие воздействия умеренного стресса, который не вызывает их непоправимых повреждений [Proskuryakov S.Y. et al., 2003]. Кроме того, многие молекулярно-клеточные системы, такие как рецепторы смерти, киназные каскады и митохондриальные элементы задействованы как в механизме апоптоза, так и в процессе некроза [D'Arcy M.S., 2019]. В рамках данного контекста важно подчеркнуть, что сверхэкспрессия HSP-70 в культивированных астроцитах, вызванная либо ретровирусной трансфекцией, либо фармакологической стимуляцией, сокращает спровоцированный кислородно-глюкозным голоданием некроз [Xu L. et al., 1997, 2003]. Подобное антинекротическое действие шаперона HSP-70 может быть связано с его влиянием на внутреннюю передачу сигналов при апоптозе, обратный поток в митохондриях, так как HSP-70 способен ингибировать JNK-связанные стадии некротического пути метаболизма, индуцированного кратковременным лишением энергии H9c2 в миогенных клетках [Gabai V.L. et al., 2000; Yaglom J.A. et al., 2003]. Вместе с тем, важно отметить, что сочетанное воздействие гиперкапнии и гипоксии, вызывает повышение концентрации HSP-70 в плазме крови у крыс после воздействия гиперкапнической гипоксии, главным образом, за счет гипоксического компонента [Беспалов А.Г. и др., 2014]. Это может объяснить снижение интенсивности некротических процессов после воздействия этих факторов в условиях *in vitro*.

Оценка относительного содержания клеток с проапоптотическими (каспаза-3, Вах и АИФ) и антиапоптотическим (bcl-2) факторами в культурах астроцитов и нейронов после моделирования химической гипоксии *in vitro*, выполненная в третьей экспериментальной серии, продемонстрировала результаты, сопоставимые с теми, которые мы получили во второй серии. Выраженный эффект ингибирования сигнальных путей апоптоза также наблюдался после режимов воздействия, сочетавших пермиссивную гиперкапнию и нормобарическую гипоксию, причем, при их интервальном

воздействии, положительный эффект отмечался и у культур астроцитов и у культур нейронов, а при непрерывном – только у культуры нейронов. Однако, в отличие от второй серии, 12-часовое воздействие пермиссивной гиперкапнии вызвало выраженное снижение процента клеток с проапоптотическими медиаторами и увеличило процент клеток, содержащих Bcl-2 во всех культурах клеток, а 12-часовая нормобарическая гипоксия вызвала противоположный эффект. Эти факты могут свидетельствовать в пользу того, что интервальные (интермиттирующие) режимы умеренной гиперкапнии и гипоксии оказывают более выраженный нейропротекторный эффект, воздействуя не только на нейроны, но и на глиальные клетки, что позволяет достигнуть высокой толерантности к ишемии [Tao et al., 2014; Rybnikova E. and Samoilov M., 2015].

В качестве модели острой гипоксии *in vitro* мы выбрали метод добавления йодоацетата-натрия к культуре астроцитов или нейронов [Gutmann B. et al., 2002] и формирования у клеток состояния, аналогичного глюкозно-кислородной депривации. Данный экспериментальный метод представляется уместным, так как был апробирован на модели нервных клеток *in vitro* и сходен по патогенезу с острой гипоксией/ишемией, что позволяет трактовать все наши результаты с точки зрения вероятного потенциала для нейропротекции.

Следует отдельно указать, что несмотря на то, что эффект ингибирования апоптоза отождествляется с отсутствием активности каспазы-3, некоторые данные предполагают, что феномен прекондиционирования может способствовать выживаемости нейронов и сохранению целостности ДНК в ишемизированном головном мозге, даже в сочетании с активацией каспазы-3 [McLaughlin B. et al., 2003]. Авторы объясняют этот факт тем, что некоторые стадии активации каспазы-3 необходимы для максимального развития толерантности к ишемии. В текущем исследовании повышенный процент клеток с каспазой-3 наблюдался, в частности, в культуре астроцитов после 12-часового воздействия гиперкапнической гипоксии, наряду с

уменьшением относительного содержания клеток с Вах и Bcl-2. При этом аналогичный режим воздействия показал выраженный антиапоптотический эффект в культуре нейронов, что дает основание полагать возможное наличие вышеуказанного механизма.

Важно также отметить, что проведенная серия исследований, имеет определенные ограничения, связанные с использованием только иммуногистохимического и иммуноцитохимического методов, при отсутствии подтверждения полученных данных о содержании медиаторов апоптоза в тканях и культурах клеток методом Вестерн-блот анализа и анализа экспрессии генов методом количественной ПЦР. В связи с этим, полученные результаты необходимо рассматривать достаточно осторожно, а детальное понимание механизма воздействия гиперкапнии и гипоксии на каспазо-зависимый и каспазо-независимый сигнальный путь апоптоза требует дальнейшего изучения. Особенно это касается перспектив использования комбинации гиперкапнически-гипоксических тренировок с веществами, модулирующими апоптоз, выступающими потенциальными онкогенами.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что гиперкапническое воздействие как самостоятельно, так и при сочетании с гипоксией вызывает снижение содержания клеток с проапоптотическими медиаторами и увеличение клеток с антиапоптотическим медиатором. Это можно считать частью механизма ингибирования апоптоза и повышения толерантности головного мозга к повреждающей гипоксии/ишемии. Гипоксический компонент при сочетанном воздействии с гиперкапнией также вносит в этот нейропротекторный механизм определенный положительный вклад, главным образом, за счет косвенных путей (Рисунок 5.3).

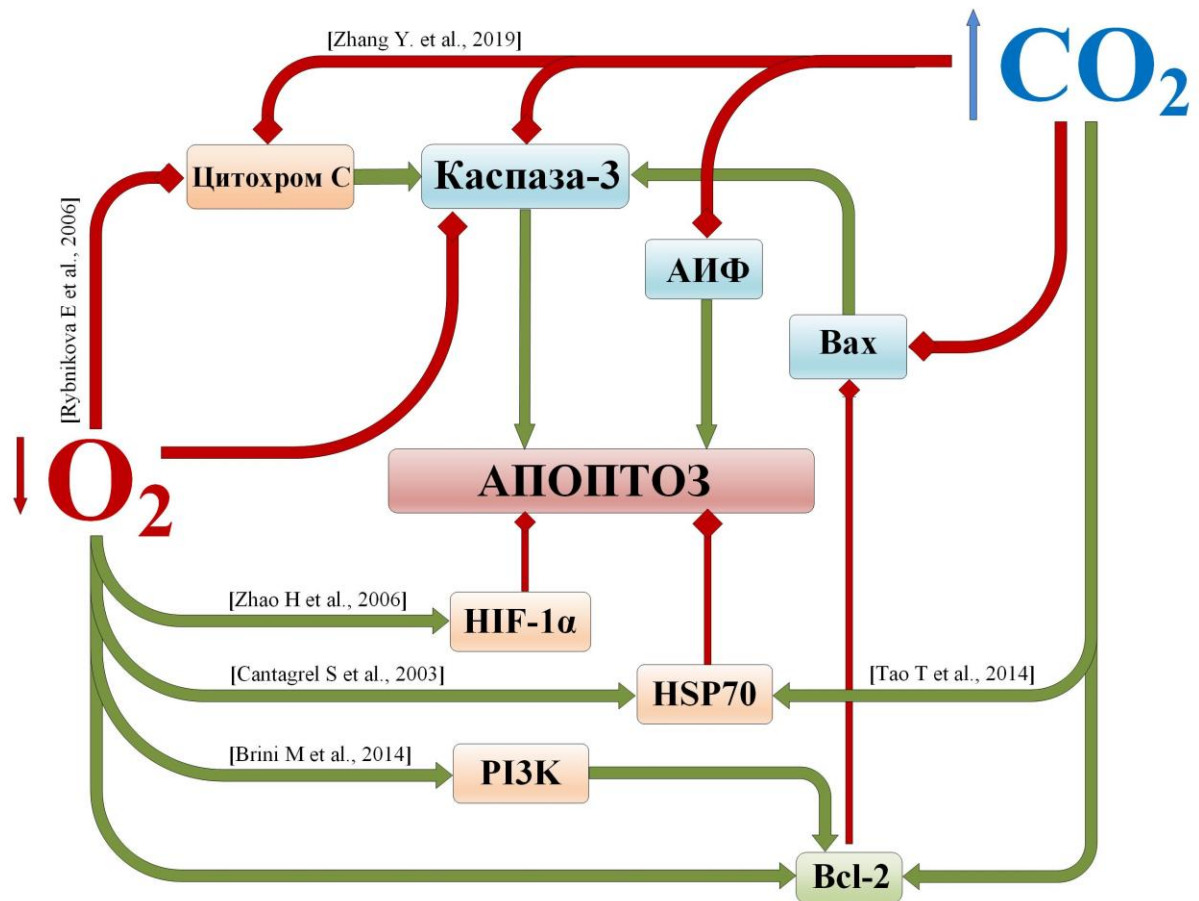


Рисунок 5.3. Воздействие пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии на основные медиаторы сигнальных путей апоптоза. Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация/индукция. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

Третий блок экспериментальных серий выполнен двумя частями, первая из которых была посвящена исследованию влияния изолированного и сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии на транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$ , а также их влиянию на кислотно-щелочное равновесие и газовый состав артериальной крови. Данные о последних двух показателях указывают на то, что гиперкапния препятствует снижению парциального напряжения кислорода в артериальной крови. Механизм этого антигипоксического эффекта может быть связан с одновременной стимуляцией  $CO_2$  легочной вентиляции и легочной перфузии. Стимуляция

углекислым газом легочной вентиляции хорошо известна и подтверждается в нашем исследовании снижением у крыс  $\text{PaCO}_2$  при нормобарической гипоксии. В работе Chuang I.C. и соавторов [2010] показано, что стимулирующий эффект на легочную перфузию экзогенной гиперкапнической гипоксии обусловлен  $\text{CO}_2$ -индуцированной легочной вазодилатацией. Сходную, с представленной в нашей работе, динамику увеличения парциального давления кислорода в артериальной крови при повышении концентрации  $\text{CO}_2$  во вдыхаемом воздухе наблюдали в своем эксперименте Zhao Q. и соавторы [2010].

Основные результаты этого блока исследования показывают, что изолированная гиперкапния не вызвала каких-либо изменений в уровнях HIF-1 $\alpha$ , а гиперкапническая гипоксия приводила к повышению содержания HIF-1 $\alpha$  в тканях гиппокампа, клеток с HIF-1 $\alpha$  в культурах астроцитов *in vitro* и околоинсультной области коры головного мозга крыс. При этом после химической гипоксии содержание клеток с HIF-1 $\alpha$  в культуре астроцитов было увеличено в образцах от группы крыс, подверженных воздействиям гиперкапнической гипоксии *in vivo*, по сравнению с крысами, подвергавшимися воздействию только гипоксии, что предполагает потенцирующий эффект гиперкапнии. Аналогичным образом, после химической гипоксии содержание клеток с HIF-1 $\alpha$  было повышено в культуре астроцитов, подвергнутых воздействию гиперкапнической гипоксии *in vitro*, по сравнению с астроцитами, подвергнутыми воздействию только гипоксии, что предполагает потенцирующий эффект гиперкапнии. Напротив, содержание клеток с HIF-1 $\alpha$  в околоинсультной области коры головного мозга было снижено у крыс, подвергнутых воздействию гиперкапнической гипоксии, по сравнению с крысами, подвергнутым только воздействию гипоксии.

Результаты, описанные в разделе 3.3.2, демонстрируют, что присутствие гиперкапнического компонента не влияет на содержание HIF-1 $\alpha$  в тканях гиппокампа при воздействии интермиттирующей гипоксии. При



этом измеренный уровень HIF-1 $\alpha$  после воздействия нормобарической гипоксии сопоставим с результатами Gu G.J. и соавторы [2008], которые обнаружили повышение относительного уровня белковой экспрессии этого фактора в 1,5 раза через 24 часа после завершения 5-кратного воздействия гипобарической гипоксии (по 2 часа в день). Кроме того, важно подчеркнуть, что гиппокамп перед началом анализа не подвергался повреждающей ишемии/гипоксии, а повышение уровня HIF-1 $\alpha$  корректно воспринимать только как адаптационный ответ клеток на гипоксический стимул [Martí N.H. et al., 2000].

Экспериментальные данные, полученные с использованием клеточных моделей *in vitro*, показывают ряд важных результатов. Например, обнаружилось, что количество астроцитов с HIF-1 $\alpha$  после их выделения в культуру оказалось повышенным в тех случаях, когда до культивирования крысы подвергались воздействиям интермиттирующей гипоксии. При этом количество клеток с HIF-1 $\alpha$  в культуре астроцитов также не зависело от наличия гиперкапнии. Эти данные подтверждают отсутствие прямого влияния CO<sub>2</sub> на механизм аккумуляции HIF-1 $\alpha$  в клетках головного мозга при умеренном дефиците кислорода. Кроме того, это показывает, что интермиттирующая гипоксия на генном уровне влияет на эпигенетическую регуляцию активности HIF-1 $\alpha$  в нервных клетках, поддерживая его повышенный уровень даже в условиях культивирования. Это может быть связано как с классическим механизмом ингибирования пролил-гидроксилаз [Huang L.E., et al. 1998; Lando D. et al., 2003] в астроцитах, так и с альтернативным сигнальным путем активации HIF-1 $\alpha$  системами MAPK и PI3K [Лукьянова Л.Д., 2019] в условиях дифференцировки клеток-предшественников.

В то же время, культуры астроцитов, которые в течение 24 часов подвергались гиперкапнии и/или гипоксии только в условиях *in vitro*, проявили отчетливую зависимость в контексте отношения количества клеток с HIF-1 $\alpha$  и парциального давления CO<sub>2</sub>. Так, повышение концентрации CO<sub>2</sub> с

5 до 7,5% в сочетании с дефицитом кислорода вызывало снижение процента клеток с HIF-1 $\alpha$  в два раза в культуре астроцитов. Это можно связать с отсутствием факторов организменного и органного уровня или с более высокой резистентностью астроцитов к гипоксии [Kwasiborski P.J., 2012], сформированной в результате потенцирующего действия гиперкапнии, на что указывают данные от культур после добавления йодоацетата-натрия.

Оценка количества клеток с HIF-1 $\alpha$  в культурах астроцитов, при моделировании *in vitro* состояния повреждающей гипоксии, вызванной добавлением йодоацетата-натрия, демонстрирует потенцирующий эффект гиперкапнии при сочетании с гипоксией. Это наблюдается как для астроцитов, выделенных в культуру после воздействия гиперкапнической гипоксии *in vivo*, так и для астроцитов, подвергнутых эквивалентному воздействию *in vitro*. При этом выраженное снижение количества клеток с HIF-1 $\alpha$  в условиях химической гипоксии после изолированного воздействия гипоксии, вероятно, связано с дефицитом его аккумуляции [Kallio P.J. et al., 1999] и последующим снижением резистентности к гипоксии [Maxwell P.H. et al., 1999]

Данные факты позволяют полагать, что гиперкапнический компонент при сочетании с гипоксией модулирует сигнальный механизм активации HIF-1 в условиях повреждающей гипоксии/ишемии. Вероятно, подобный механизм направлен на стимуляцию адаптационного клеточного потенциала и увеличение толерантности нервной ткани к ишемии/гипоксии, посредством протекции от излишнего накопления HIF-1 $\alpha$  в ответ на умеренную гипоксию [Zhong H. et al. 1999].

Моделирование фокального ишемического повреждения коры головного мозга с последующей оценкой количества клеток с HIF-1 $\alpha$  в околоинсультной области повторило тенденцию аналогичную предыдущим результатам, показав, что гиперкапния не влияет на транскрипционный фактор при изолированном воздействии и снижает количество клеток с HIF-1 $\alpha$  при сочетании с гипоксией. Данный факт, в контексте большего

потенциала гиперкапнической гипоксии при формировании толерантности к ишемии, также можно рассматривать в качестве реализации предохранительного механизма от чрезмерной активации HIF-1 (Рисунок 5.4).



Рисунок 5.4. Сигнальные пути влияния пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии на транскрипционный фактор HIF-1α. Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация/индукция. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

Нельзя достоверно утверждать за счет какого сигнального механизма происходит влияние CO<sub>2</sub> на процесс накопления/активации HIF-1. Однако, можно предположить, что такими механизмами могут быть: ингибирование в условиях ацидоза пролил-гидроксилаз и аккумуляция HIF-1α [Lando D. et al., 2003]; активация систем MAPK и PI3K в пролиферирующих клетках микроглии с повышением синтеза HIF-1α [Лукьянова Л.Д., 2019]; модуляция активности шаперон-опосредованной лизосомальной аутофагии [Ferreira J.V. et al. 2015; Hubbi M.E. et al. 2014].

Как известно, высокое содержание HIF-1 $\alpha$  провоцирует 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], часто сочетаясь с многими онкогенными состояниями [Vaupel P. and Mayer A., 2007; Pezzuto A. and Carico E., 2018]. В связи с этим, надпороговое повышение уровня HIF-1 $\alpha$  может рассматриваться как неблагоприятный фактор в патогенезе острого ишемического повреждения.

Важно отметить, что существуют работы, в которых сделаны противоположные выводы о влиянии гиперкапнии на механизм активации HIF-1. Так, в экспериментальном исследовании Selfridge A.C. и др. [2016] гиперкапния подавляла стабильность белка HIF и экспрессию его гена-мишени *in vivo* и *in vitro*, что ассоциировалось с прямым снижением внутриклеточного pH. А в исследовании Raeis V.B. и др. [2010] выявлено отсутствие корреляции между повышением экспрессии HIF-1 $\alpha$  и уровнем CO<sub>2</sub> после 24-часовой экспозиции кардиомиоцитов в условиях гиперкапнической гипоксии *in vitro*.

Несмотря на то, что часть результатов, полученных в текущем исследовании, также косвенно свидетельствует об угнетающем влиянии гиперкапнического компонента на уровень HIF-1 $\alpha$ , данные, полученные в эксперименте с моделированием химической гипоксии, показывают протекторный потенциал углекислоты при сочетании с воздействием интермиттирующей гипоксии. Кроме того, в упомянутых выше работах супрессия белка HIF-1 была обнаружена при использовании модели с высоким уровнем гиперкапнии (FetCO<sub>2</sub>=10%) в сочетании с длительной экспозицией воздействия *in vivo* (4-6 часов), что могло спровоцировать эффект противоположный тому, который вызывает умеренная гиперкапния. В то же время, данные по кардиомиоцитам нельзя полностью экстраполировать на нервные клетки, ввиду большой разницы механизмов нейро- и кардиопротекции [Maslov L.N. et al. 2009].

Важной предпосылкой для проведения второй части третьего экспериментального блока стало то, что в последние десятилетия большое внимание уделяется нейропротекторному эффекту ишемического/гипоксического воздействия в режиме preconditionирования [Sharp F.R. et al., 2004; Obrenovitch T.P., 2008; Zhao Y.D. et al., 2012]. Однако, клиническое применение этих методов имеет существенные ограничения [Лукьянова Л.Д., 2019; Rybnikova E. et al., 2022]. В то же время изучение сигнальных путей preconditionирования является важным для понимания молекулярных механизмов нейропротекции и разработки новых средств профилактики/лечения патологии ЦНС.

Ишемическое/гипоксическое preconditionирование и интермиттирующая гипоксия влияют на сходные сигнальные пути, но с разной интенсивностью [Sharp F.R. et al., 2004; Rybnikova E. and Samoilov M., 2015], что позволяет транспонировать гипотезы об их нейропротекторных эффектах. По классической модели preconditionирования механизм нейропротекции состоит из каскада событий: высвобождение аденозина, стимуляция A1 рецепторов и открытие чувствительных к сульфонил-мочевине АТФ-зависимых K<sup>+</sup>-каналов [Heurteaux C. et al. 1995; Kulinskiĭ V.I. et al. 2006; Wang L. et al., 2011]. По данным Yellon D.M. and Downey J.M. [2003] активация A1 рецепторов воспроизводит эффект preconditionирования и повышает толерантность клеток миокарда к ишемии. Также, активация АТФ-зависимых K<sup>+</sup>-каналов в головном мозге вызывает эффект аналогичный ишемическому preconditionированию [Mayanagi K. et al. 2007].

Установлено, что ишемическое и гипоксическое preconditionирование увеличивает уровень аденозина и активирует A1 рецепторы, что приводит к повышению толерантности головного мозга к ишемии [Heurteaux C. et al., 1995; Obrenovitch T.P., 2008; Cao T. et al., 2019]. При этом Liu C. et al. [2011] доказали, что активация A1 рецепторов снижает хемочувствительность дыхательных нейронов к повышению уровня CO<sub>2</sub>, но

не к снижению уровня  $O_2$ . Это позволяет предположить антагонизм этих рецепторов и пермиссивной гиперкапнии.

Результаты, полученные на клеточных моделях *in vitro* (раздел 3.4.1), показывают ряд важных фактов. Так, был обнаружен стимулирующий эффект интермиттирующей гипоксии, но не гиперкапнии, на относительное содержание клеток с A1 рецепторами в астроцитах после их выделения в культуру. Это свидетельствует об отсутствии прямого влияния  $CO_2$  на эти рецепторы при сочетании с гипоксическим воздействием. Кроме того, это показывает, что интермиттирующая гипоксия оказывает влияние на эпигенетическую регуляцию уровня A1 рецепторов в астроцитах даже после их культивирования. Это можно объяснить эффектами транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ , который усиливает активность аденозиновых рецепторов [Howell N.J. and Tennant D., 2014] или с влиянием гипоксии на G-протеины, которые сопряжены с этими рецепторами [Jacobson K.A. and Gao Z.G., 2006].

Оценка процентного содержания клеток с A1 рецепторами в культуре астроцитов после химической гипоксии *in vitro* демонстрирует протекторный эффект сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии. Этот эффект заключается в стабилизации процентного содержания клеток с A1 рецепторами по отношению к контролю. Он наблюдался как у культур астроцитов, выделенных от крыс, подвергнутых воздействию гиперкапнической гипоксии *in vivo*, так и у культур астроцитов, подвергнутых эквивалентному воздействию *in vitro*. При этом снижение процентного содержания клеток с A1 рецепторами у культуры астроцитов после воздействия нормобарической гипоксии, обнаруженное после химической гипоксии, может указывать на уменьшение их адаптационного потенциала [Obrenovitch T.P., 2008].

Важно отметить, что гиппокампальные A1 рецепторы в основном локализованы в нейронах, в частности в синапсах [Tetzlaff W. et al., 1987; Rebola N. et al., 2003]. Однако, астроциты были основным объектом изучения в исследованиях *in vitro* по той причине, что нас интересовали общие

закономерности адаптационного ответа нервной ткани на горметические стимулы, которыми были интермиттирующая гипоксия и гиперкапния. Разумно предположить, что результаты, полученные в отношении A1 рецепторов, которые в меньшей степени характерны для астроцитов, будут справедливы и в отношении нейронов [Björklund O. et al., 2008; Liu Z. and Chopp M., 2016]. Это подтверждается результатами из раздела 3.4.2, где оценка плотности рецепторов в нейронах околоинсультной области соответствовала тенденции, описанной в разделе 3.4.1. Кроме того, было важным провести исследование относительного содержания клеток с A1 рецепторами и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами на одном типе культур, чтобы корректно интерпретировать результаты экспериментов.

Функционирование K<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов зависит от редокс-состояния активных групп белков-каналов, а окислительно-восстановительные агенты модулируют их активность [Garlid K.D., Beavis A.D., 1986]. В условиях гипоксии и ишемии наблюдается увеличение концентрации активных форм кислорода [Mironova G.D. et al., 2010], изменение соотношений GSH/GSSG и НАД<sup>+</sup>/НАДН, которые приводят к модификации тиоловых групп цистеинов в мембранных структурах [Obrenovitch T.P., 2008]. При этом повышение внутриклеточного уровня свободных кислородных радикалов приводит к выраженной активации митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов [Zhang D. et al., 2001]. Этому также способствует усиление синтеза NO<sup>o</sup> с образованием пероксинитрита [Dahlem Y. et al., 2004; Lacza Z. et al., 2003; Sasaki N. et al., 2000] и последующей активации протеинкиназы C [Krenz M. et al., 2002]. Кроме того, существуют данные о том, что селективная активация митохондриальных АТФ-зависимых каналов K<sup>+</sup>-каналов в астроцитах индуцирует отсроченное прекондиционирование [Rajapakse N. et al., 2003] и увеличивает поглощение глутамата в культуре, что может обеспечивать дополнительное защитное преимущество [Sun X.L. et al., 2008].

Оценка процентного содержания клеток с митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналами в культурах астроцитов (раздел 3.4.3) после воздействия *in vivo*

нормобарической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии показывает возможность их регулирования посредством эпигенетических механизмов. Это может быть обусловлено  $O_2$ -дефицитным оксидативным стрессом [Mironova G.D. et al., 2010] и активацией протеинкиназы C, вызванной увеличением концентрации  $CO_2$ /бикарбоната и повышения внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [Obrenovitch T.P., 2008]. Кроме того, воздействие на астроциты йодоацетата-натрия демонстрирует стабилизирующее влияние гиперкапнии на регуляцию процента клеток, содержащих мито $K^+_{ATP}$ -каналы. Этот эффект заключается в поддержании количества таких клеток после воздействия гиперкапнической гипоксии на уровне контрольной группы, что можно интерпретировать как показатель толерантности к ишемии/гипоксии [Obrenovitch T.P., 2008]. Это может быть связано с антиоксидантными эффектами углекислоты [Barth A. et al., 1998; Zhao Z.S. et al., 1998; Goss S.P. et al., 1999; Zakynthinos S. et al., 2007] и последующим ограничением оксидативного стресса у астроцитов.

Моделирование фокального ишемического инсульта у крыс выявило тенденции аналогичные результатам *in vitro*. Обнаружилось, что пермиссивная гиперкапния уменьшает процент клеток с A1 рецепторами в околоинсультной области головного мозга крыс и также снижает его при сочетании с нормобарической гипоксией. В то же время пермиссивная гиперкапния повышает относительное содержание клеток с мито $K^+_{ATP}$ -каналами как при обособленном воздействии, так и при сочетании с нормобарической гипоксией (Рисунок 5.3). Данные факты, в контексте более высокого нейроротекторного потенциала гиперкапнической гипоксии, можно рассматривать в качестве элементов защитного механизма от избыточной индукции аденозинового сигнального звена с акцентом на конечном эффекторе прекоондиционирования - мито $K^+_{ATP}$ -каналах [Heurteaux C. et al., 1995; Obrenovitch T.P., 2008]. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные о том, что пролонгированная активация



аденозиновых A1-рецепторов может иметь отрицательную роль в патогенезе неврологических расстройств [Stockwell J. et al., 2017].



Рисунок 5.5. Участие A1 рецепторов и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов в молекулярных механизмах нейропротекторной эффективности гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии. Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация/индукция. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники

Эти результаты подтверждают, что использование блокаторов A1 рецепторов и митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов перед воздействием гиперкапнической гипоксии исключает формирование толерантности головного мозга к острому дефициту кислорода [Трегуб П.П. и др., 2014]. При этом блокада аденозиновых рецепторов не оказывала влияния на нейропротекторную эффективность пермиссивной гиперкапнии, в отличие от нормобарической гипоксии. В то же время блокада митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов оказывала ингибирующее влияние на процесс формирования резистентности к острой гипоксии как в отношении пермиссивной гиперкапнии, так и в отношении нормобарической гипоксии. Также, в работе Lindauer U. и др. [2003], было

показано, что воздействие гиперкапнии стимулирует  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые и АТФ-зависимые калиевые каналы в сосудах головного мозга.

Регуляция уровня  $\text{A1}$  рецепторов и мито $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -каналов влияет на многие клеточные функции и является прикладной точкой для разработки методов профилактики и лечения гипоксических/ишемических повреждений ЦНС. Перспективным в этом отношении выглядит комбинирование гиперкапнически-гипоксических респираторных воздействий с фармакологическими модуляторами этих сигнальных механизмов (2-хлораденозин, диазоксид) [Li B. and Roth S., 1999; Sun J. et al., 2012]. При этом максимально эффективной может быть комбинация таких модуляторов с воздействиями гиперкапнической гипоксии и фармакологическими средствами, влияющими на другие адаптогенные сигнальные пути [Baillieul S. et al., 2017]. Это подтверждается сведениями об увеличении нейропротекторной эффективности гипоксических воздействий в комбинации с ингибитором NOS [Malyshev I.Y. et al., 1999], а также усилении кардиопротекторного эффекта при комбинировании гипоксического preconditionирования с активаторами опиодных рецепторов [Maslov L.N. et al., 2009].

Четвертый блок экспериментов, ориентированный на оценку проницаемости ГЭБ после воздействия гиперкапнии и/или гипоксии, показал стимулирующий эффект гиперкапнического компонента на поддержание концентрации красителя Эванса голубого в плазме крови на повышенном уровне даже спустя 24 часа после его внутрибрюшинного введения, в то время как показатели группы нормобарической гипоксии практически не отличались от контрольных значений. При этом оптическая плотность красителя, измеренная в ткани головного мозга, также была повышенной у крыс из группы гиперкапнической гипоксии. Данные факты, вероятно, связаны со стимуляцией ангиогенеза при гиперкапнически-гипоксических тренировках [Беспалов А.Г. и др., 2014], а также с влиянием  $\text{CO}_2$  и ацидоза на сужение резистивных артериол периферических органов и дилатацию

артериол миокарда и мозга [Куликов В.П. и др., 2017]. На этом фоне, умеренное повышение содержания красителя в ткани мозга в группе гиперкапнической гипоксии более объективно рассматривать в контексте индекса проницаемости ГЭБ, который учитывает содержание красителя и в плазме крови и в головном мозге.

Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что снижение проницаемости ГЭБ является одним из вероятных механизмов формирования толерантности головного мозга к ишемии после интермиттирующего воздействия гиперкапнии (в т.ч. при ее сочетании с гипоксией). В пользу нейропротекторной эффективности этого механизма также выступают результаты, которые демонстрируют положительное влияние 3-часовой пермиссивной гиперкапнии (80 и 100 ммHg) на целостность ГЭБ при травматическом повреждении головного мозга [Yang W. et al., 2019].

Вероятными сигнальными путями снижения проницаемости ГЭБ после интермиттирующего воздействия гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии могут выступать усиление пролиферации эндотелиальных клеток [Carmeliet P. et al., 1998] супрессия аквапорина-4 и ингибирование апоптоза [Yang W. et al., 2016]. Ингибирование апоптоза при воздействии гиперкапнии также наблюдалось в отношении клеток околоинсультной области и культур астроцитов и нейронов.

Снижение проницаемости ГЭБ в результате гипоксического preconditionирования в дальнейшем, как правило, оказывает защитный эффект на его целостность в условиях ишемического повреждения [Obrenovitch T.P., 2008]. Ряд авторов связывает это с модуляцией белков плотных соединений сфингозинкиназой-2 [Wacker B.K. et al., 2012], окклюдина и ZO-1 [Yang W., et al., 2016]. Вместе с этим, известно, что гипоксическое preconditionирование ингибирует адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам [Zhou S.G. et al., 2003], а повышение уровня HIF-1 $\alpha$  стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов ГЭБ [Кувачева Н.В. и др., 2016].

Эти факторы также должны благоприятно способствовать функционированию ГЭБ в условиях ишемии.

Важно отметить, что, имеются и данные относительно отрицательного влияния гипоксического preconditionирования на целостность ГЭБ. Так, Chi O.Z. и др. продемонстрировали, что гипоксическое preconditionирование усиливает разрушение ГЭБ посредством VEGF-сигнального пути, что предполагает возможность усугубления отека мозга при церебральной ишемии [2017]. Однако, авторы в указанной работе концентрировались на кратковременных (1 час) вазогенных эффектах гипоксического preconditionирования и их влияния на проницаемость ГЭБ, отождествляя их с характеристиками его целостности.

Учитывая, что сочетанное воздействие интермиттирующей гиперкапнии и гипоксии сформировало наименьший уровень проницаемости ГЭБ, можно предположить, что оба этих компонента оказывают влияние на этот нейропротекторный механизм, активируя разные сигнальные пути.

Структура ГЭБ в условиях гипоксического/ишемического повреждения находится под регуляторным влиянием целого ряда молекулярно-клеточных систем [Салмина А.Б. и др., 2021]: эпигенетическая регуляция клеточного метаболизма и нейровоспаления транскрипционными факторами; трофические и мембранные факторы, поддерживающие структурную целостность и ограниченную проницаемость; нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение. При этом на все эти системы, в той или иной степени, может оказывать влияние сочетанное воздействие гиперкапнии и гипоксии, формируя нейропротекторный эффект (Рисунок 5.6).

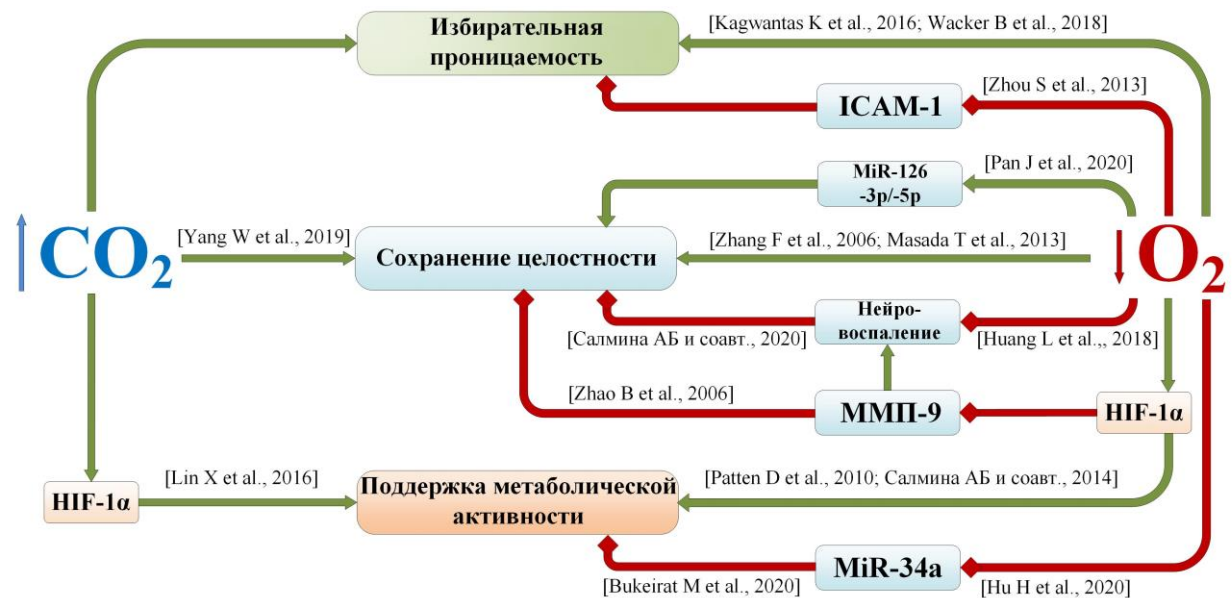


Рисунок 5.6. Воздействие пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии на сигнальные пути, регулирующие в структурную целостность ГЭБ, его ограниченную проницаемость и метаболическую активность. Красные линии – ингибирование; Зеленые линии – активация/индукция. В случае использования данных из других исследований в квадратных скобках указаны ссылки на первоисточники.

Обнаруженный нами эффект сочетанного воздействия умеренных доз гипоксии и гиперкапнии можно рассматривать с точки зрения парадигмы гормезиса [Leak R.K. et al. 2018]. Главным основанием для этого является тот факт, что как дефицит кислорода и углекислого газа, так и их избыток в организме вызывает серьезные повреждения. Поэтому, положительные эффекты, обнаруженные у интермиттирующих воздействий умеренных доз гипоксии и гиперкапнии, будут актуальны только в отношении определенного терапевтического диапазона концентраций газов, продолжительности сеансов и периодичности курсов. Также, важно подчеркнуть, что в отношении гиперкапнии и гипоксии уже сформулирована гипотеза, отражающая возможность их использования в качестве горметического стимула [Pruimboom L. and Muskiet F.A.J., 2018].

Следующий (пятый) блок исследования позволил выделить эффективные параметры режима гиперкапнически-гипоксического воздействия. Так, в контрольных группах уровень резистентности животных к экстремальной гипоксии в течение эксперимента не изменялся. Также, при оценке исходной резистентности к гипоксии, отсутствовали различия между группами во всех трех экспериментальных сериях. При этом во всех группах гиперкапнически-гипоксических тренировок курсы воздействия приводили к увеличению интегративных показателей адаптации по сравнению с контрольным и исходным уровнем. Способность дольше сохранять нормальную позу и двигательную активность в условиях критически низкой концентрации кислорода свидетельствует об увеличении устойчивости головного мозга и организма в целом к гипоксии, а увеличение времени жизни - об увеличении способности животного к максимальной мобилизации витальных функций организма в сублетальный период [Лукьянова Л.Д. и др., 2009].

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%, по сравнению с исходным уровнем. В группе 10-минутных воздействий резистентность к гипоксии возросла практически в 2 раза, однако максимальные значения определяемых параметров (увеличение почти в 3 раза относительно исхода) было зафиксировано в группе животных, подвергнутых 30-минутному воздействию. Животные в группе 60-минутных тренировок показали самое низкое значение параметра ВПП среди групп гиперкапнически-гипоксических тренировок, в то время как ВЖ было ниже только по сравнению с группой 30-минутных тренировок. Снижение эффективности более продолжительных тренировок по сравнению с более короткими может свидетельствовать о возникновении «срыва» адаптации в результате длительного энергодефицита [Althausen S. et al., 2001].

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. При этом 2-кратное воздействие в течение суток не имело преимуществ перед 1-кратным воздействием. Это свидетельствует о том, что стойкая резистентность к острой гипоксии при гиперкапнически-гипоксическом воздействии формируется в промежутке между вторым и третьим сеансом тренировок, а также об отсутствии зависимости эффекта от увеличения кратности сеансов в течение суток. Данный факт может быть связан с тем, что минимальное время, необходимое для формирования резистентности к острому дефициту кислорода составляет около 24 часов [Лукьянова Л.Д., 2011].

Наименьшие значения показателей резистентности к острой гипоксии среди экспериментальных групп во время проведения третьей серии исследования были зарегистрированы в группе с интервальным гиперкапнически-гипоксическим воздействием, подвергнутой интервальным гиперкапнически-гипоксическим воздействиям. Подобные результаты были получены Лукьяновой и др., при исследовании роли реоксигенации в ходе гипоксического воздействия [Лукьянова Л.Д. и др., 2009]. В указанной работе было показано, что однократное воздействие интервальной гипоксией, оказывает значительно меньший положительный эффект, по сравнению с аналогичным воздействием безинтервальной гипоксией. Это можно объяснить тем, что периоды реоксигенации оказывают угнетающее действие на экспрессию HIF-1 $\alpha$ , тем самым, уменьшая эффективность гипоксического воздействия [Stroka D. et al. 2001]. В условиях тяжелой гипоксии интервалы реоксигенации оказывают положительное действие, но в условиях умеренной гипоксии, которая применялась в нашем исследовании в качестве тренировочного воздействия, они, напротив, снижают адаптогенный эффект.

Выполненный в шестом экспериментальном блоке 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). Применение эналаприла усиливало нейропротекторный эффект гиперкапнической гипоксии, вероятно, вследствие его дополнительных антиоксидантных и антиишемических свойств, которые реализуются посредством независимых от воздействия гиперкапнической гипоксии путей [Гацура С.В. и Зинчук В.В., 2004; Сафронова Е.С. и др., 2013].

Важно отметить, что сочетание блокатора карбоангидразы ацетазоламида с воздействиями гиперкапнической гипоксии полностью устраняло нейропротекторный эффект респираторных тренировок, что может быть связано с избыточным внутриклеточным ацидозом, вызванным накоплением  $\text{CO}_2$  после введения ацетазоламида [Xu J. et al., 2009]. Следовательно, фармакологическое потенцирование накопления  $\text{CO}_2$  в организме на фоне гиперкапнически-гипоксического воздействия не эффективно и даже снижает нейропротекторный эффект.

Таким образом, фармакологическое потенцирование может значимо повышать нейропротекторную эффективность респираторных тренировок с интермиттирующей гиперкапнической гипоксией. Комбинация респираторных воздействий с фармакологическими средствами, модулирующими сигнальные пути механизма формирования толерантности к ишемии, является перспективной стратегией повышения нейропротекторной эффективности гиперкапнической гипоксии.

В седьмом экспериментальном блоке на мышах проводилась оценка геропротекторного эффекта регулярных гиперкапнически-гипоксических тренировок в контексте средней продолжительности жизни и основных



критериев ее качества (репродуктивная функция, мышечная сила и поведенческая активность).

Мы предположили, что сочетание гипоксии с гиперкапнией (гиперкапническая гипоксия) может оказывать значимое воздействие на организм, способствуя увеличению продолжительности и качества жизни мышц. Эта гипотеза основывается, с одной стороны, на многочисленных хорошо известных экспериментальных и клинических наблюдениях эффективности гипоксии в повышении резистентности и лечении заболеваний. С другой стороны, появились убедительные данные о терапевтической эффективности гиперкапнии. Важно, что гиперкапния оказывает существенное положительное влияние на ряд ключевых геропротекторных механизмов – ангиогенез [Siafakas N.M. et al., 2001], торможение апоптоза [Тао Т. et al., 2013, 2014], антиоксидантную активность [Zakynthinos S. et al. 2007] и шапероны [Беспалов А.Г. и др., 2014]. Поэтому воздействие гипоксии и гиперкапнии можно рассматривать с точки зрения факторов, которые в умеренной дозировке оказывают модулирующее влияние на сигнальные механизмы, контролируемые системой витагенов (белки теплового шока, тиредоксин и протеиновую систему сиртуина), играющей существенную роль в защите от стресса и продлении жизни [Calabrese V. et al., 2014]. Возможно, что природа данного эффекта может реализовываться через эпигенетические механизмы, путем изменения экспрессии генов, кодирующих защитные факторы.

Предыдущие исследования показывают, что курсовое воздействие гипоксии в сочетании с гиперкапнией оказывает максимальный эффект для повышения резистентности к критическому дефициту кислорода [Tregub P., et al., 2013] и толерантности мозга к фокальной ишемии [Tregub P., et al., 2015] по сравнению с изолированным использованием гипоксии и гиперкапнии. Эти результаты позволяют считать, что гипотеза о геропротекторном потенциале гиперкапнической гипоксии имеет прочную

основу, что оправдывает усилия, предпринятые для проверки гипотезы в эксперименте.

Результаты исследования показали, что средняя продолжительность жизни у мышей, получавших курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии, увеличилась на 16% (74 дня). При интерпретации на среднюю продолжительность жизни человека, составляющую приблизительно 70 лет, это является эквивалентом 11 лет [Flurkey K. et al., 2007]. При сопоставлении полученных данных с результатами подобных экспериментальных исследований на мышах можно отметить, что это является существенным достижением. Так, при оценке эффективности генетически-индуцированной активации фермента теломеразы среднюю продолжительность жизни мышей удалось увеличить на 18% [Bernardes de Jesus B. et al., 2012], а при добавлении в рацион пожилых мышей рапамицина (иммуносупрессорное лекарственное средство - ингибитор mTOR-киназы) продолжительность жизни увеличивалась на 13% [Harrison D.E. et al., 2009]. Однако, геропротекторный эффект, полученный в этих исследованиях, сложно сопоставлять с нашими результатами, так как в описанных экспериментах воздействие начиналось не в молодом, а в пожилом возрасте (1 и 2 года - теломераза и 600 дней - рапамицин). В то время как респираторной воздействие на мышей по нашей модели начиналось одновременно с достижением половой зрелости (4-недельный возраст). При этом важно отметить, что использование небольшого количества животных в настоящем эксперименте и общие трудности при трансляции геропротекторных стратегий от мыши к человеку создают существенные ограничения для формирования прямых рекомендаций по продлению жизни. Тем не менее, результаты нашего исследования демонстрируют потенциальные перспективы применения гиперкапнической гипоксии в качестве средства для продления жизни и физиологической активности в пожилом возрасте.

Важно отметить, что для веществ, используемых в приведенных выше исследованиях, характерны побочные эффекты, в частности, риск

возникновения опухолей [Bodnar AG, et al., 1998]. В то же время, воздействие гиперкапнической гипоксии в настоящем исследовании продемонстрировало тенденцию к онкопротекции на фоне развития характерных для мышей опухолей [Anisimov V.N. et al., 2007], что выгодно отличает ГГ от упомянутых средств.

Перед началом исследования, мы понимали, что для характеристики эффекта, который оказывает гиперкапническая гипоксия на самок, важно было детально регистрировать параметры их репродуктивной функции. Результаты эксперимента показали, что воздействие гиперкапнической гипоксии продлило их репродуктивную молодость. Это является важным вкладом в подтверждение гипотезы о геропротекторном потенциале гиперкапнической гипоксии, так как увеличение репродуктивной активности в пожилом возрасте одно из ключевых составляющих здорового долголетия [Finch C.E., 2009; Muradian K., 2013].

Аналогичная позитивная динамика отмечалась в отношении мышечной силы и физической утомляемости у мышей в старости, подвергавшихся гиперкапнически-гипоксическим воздействиям. Хорошо известно, что с наступлением старости снижается мышечная сила и повышается утомляемость [Anisimov V.N. et al., 2007]. Соответственно, положительные изменения этих параметров в нашем исследовании также свидетельствуют о геропротекторном потенциале гиперкапнической гипоксии. Важно отметить, что при тестировании физической работоспособности на всех этапах исследования принимали участие все самки, вне зависимости от фазы их репродуктивного цикла (отсутствие беременности, беременность, кормление потомства, климактерический период). Такой шаг был сделан для того, чтобы максимально усреднить полученные результаты и избежать получения внутри каждой группы разрозненных данных, которые в итоге трудно поддаются объективной статистической обработке.

Регулярное воздействие гиперкапнической гипоксии в настоящем исследовании повысило стрессоустойчивость мышей, так как увеличение

вертикальной двигательной активности и времени исследования «норок» можно интерпретировать как угасание генерализованного возбуждения с активацией исследовательского поведения [Gould T.D. et al., 2010]. При этом формирование условного рефлекса пассивного избегания происходило за меньший промежуток времени. Эти улучшения стрессоустойчивости и когнитивных функций животных также можно принимать в качестве показателей здорового долголетия [Jafari M., 2015].

Важно помнить, что преобладание положительных или отрицательных эффектов гиперкапнии в значительной мере определяется концентрацией  $\text{CO}_2$ , длительностью экспозиции и кратностью воздействия. Например, воздействие выраженной непрерывной гиперкапнии (10%  $\text{CO}_2$ ) в течение 3, 7, 14 и 21 суток вызывает атрофию скелетных мышц у мышей [Jaitovich A. et al., 2015], а 24-часовое нахождение в среде с 7%  $\text{CO}_2$  формирует иммуносупрессивный эффект у дрозофил [Helenius I.T. et al., 2009]. В то же время, нахождение в среде с 19%  $\text{CO}_2$  в течение 1, 6 или 72 часов увеличивает продолжительность жизни червей *Caenorhabditis elegans*, при этом негативно влияя на моторику и репродуктивную функцию [Sharabi K. et al., 2009].

Клиническое исследование, выполненное отдельным блоком на пациентах с ДЦП, показало эффективность стандартного лечения в обеих группах, но без значимых различий между группой воздействия (гиперкапническая гипоксия) и сравнения (плацебо). В конце лечения группы продемонстрировали статистически значимое увеличение баллов по шкале неврологического статуса GMFM-66 при отсутствии различий между группами, как в начале, так и в конце курса воздействия.

В отношении курса респираторного воздействия нормобарической гипоксии было показано улучшение двигательной активности, церебральной гемодинамики и спектральных компонентов ЭЭГ [Yatsenko K.V. et al., 2012]. Это сопоставимо с результатами текущего исследования в части улучшения функциональных показателей ЦНС по данным электроэнцефалографии,

магнитной стимуляции и вызванных потенциалов. При этом улучшение двигательной активности после курса гипоксических воздействий, которого не наблюдалось после гиперкапнически-гипоксических тренировок, может быть обусловлено включением в указанное исследование когорты детей младенческого и раннего детского возраста.

Наши экспериментальные исследования показали существенно более высокую нейропротекторную эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии (гиперкапническая гипоксия) по сравнению с использованием изолированной нормокапнической гипоксии [Tregub P. et al., 2015]. В других экспериментальных работах [Vannucci R.C. et al., 1995; Zhou Q. et al., 2010, Tao T. et al., 2013] было показано защитное действие умеренной гиперкапнии при повреждении головного мозга. Эти исследования являются основой для одной из вентиляционных стратегий в неонатологии - пермиссивной гиперкапнии [Zhou W. and Liu W., 2009].

Стандартное лечение пациентов обеих групп, применявшееся в нашем исследовании, приводило к улучшению их неврологического статуса. Но, как уже было сказано, достоверных различий между группой воздействия гиперкапнической гипоксией и группой плацебо выявлено не было. Это может быть связано с коротким периодом наблюдения.

По данным Yatsenko K.V. и др. [2012] тренировки с интервальной гипоксией оказывали положительное воздействие на БЭМ по данным ЭЭГ в виде увеличения выраженности альфа-/бета- ритмов и снижения дельта-/тета-ритмов. В нашем исследовании не было получено значимых различий в показателях БЭА мозга в группе воздействия гиперкапнической гипоксией по сравнению с группой плацебо.

Нейрофизиологическое обследование продемонстрировало улучшение отдельных показателей у пациентов, тренировавшихся с гиперкапнической гипоксией, что может указывать на положительное влияние этих респираторных тренировок на функциональное состояние нервной системы при ДЦП. Так, результаты, полученные методом вызванных потенциалов,

продемонстрировали снижение после лечения латентности пика РЗ в группе воздействия гиперкапнической гипоксией, более выраженное по сравнению с группой плацебо. Магнитная стимуляция показала, что тренировки с гиперкапнической гипоксией сопровождались снижением времени центрального моторного проведения на 2,2-2,5 мс и порога возбудимости корковых мотонейронов на 12-16% в зависимости от латерализации, при отсутствии значимой динамики в группе плацебо. Несмотря на статистическую значимость приведенных различий, надо учитывать ограничения, связанные с небольшим размером выборки в нашем исследовании.

Механизмы терапевтической эффективности сочетания гиперкапнии и гипоксии основываются, с одной стороны, на многочисленных хорошо известных эффектах гипоксического воздействия: адаптивные эффекты митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов и аденозиновых рецепторов, митохондриальные сигнальные пути, синапто- и нейрогенез, протекторные эффекты HIF-1α [Obrenovitch T.P., 2008]. С другой стороны, гиперкапния оказывает существенное положительное влияние на ряд ключевых нейропротекторных механизмов – ангиогенез [Siafakas N.M. et al., 2001], торможение апоптоза [Tao T. et al., 2013, 2014] и антиоксидантную активность [Zakynthinos S. et al. 2007]. При этом сочетанное воздействие этих двух факторов может обеспечивать взаимное потенцирование разных сигнальных систем, повышая эффективность их сочетанного использования, как было указано выше.

В качестве потенциального механизма терапевтического воздействия, использованных нами респираторных тренировок, может выступать улучшение нейроваскулярного соответствия (соответствие мозгового кровотока метаболизму) за счет опосредованной интервальной гиперкапнической гипоксией нейропластичности [Vermeulen T.D. et al., 2020]. Это заключение подтверждается улучшением нейрофизиологических показателей у детей, тренировавшихся с гиперкапнической гипоксией, особенно снижение у них латентности пика РЗ.

Существует позиция, согласно которой интервальные гипоксические тренировки, не смотря на высокий терапевтический потенциал, должны использоваться в педиатрической практике с особой осторожностью и базироваться на возрастных и индивидуальных особенностях реактивности организма [Serebrovskaya T.V. and Xi L., 2015, 2016], а также, с учетом психоэмоциональных особенностей ребенка. Такой подход обоснован риском негативного влияния чрезмерной нагрузки во время гипоксических тренировок. В нашем исследовании проводилось специальное тестирование индивидуальной реактивности на гиперкапническую гипоксию, которое разделило пациентов по типу стратегии адаптации к изменению газового гомеостаза в организме на три типа: два неблагоприятных, не позволявших достигай заданного значения концентрации альвеолярных газов («гипервентиляция» и «избегание») и благоприятный («гомеостатическая» с достижением заданных значений гиперкапнии и гипоксии). Важно, что соотношение детей с этими типами в конце лечения не изменялось в группе плацебо, но существенно смещалась в сторону благоприятного типа в группе воздействия гиперкапнической гипоксией. Достижение целевого  $F_{et}CO_2$  во время повторного тестирования реакции на гиперкапническую гипоксию через 6-8 сеансов тренировок было почти в 2 раза больше в группе воздействия гиперкапнической гипоксией по сравнению с плацебо (71 против 39%). Известно, что система контроля дыхания обладает значительной пластичностью, что способствует надежной гомеостатической регуляции газов крови. В статье Welch J.F. [2021] подчеркивается, что периодическая гиперкапническая гипоксия улучшает вентиляционную способность (пластичность). Deacon N.L. и соавторы [2017] так же указывают на роль  $CO_2$ , как модулятора воздействия прерывистой гипоксии на вентиляционную нейропластичность. Эти данные могут объяснять, показанный в нашем исследовании, столь существенный рост успешного достижения целевого  $F_{et}CO_2$  пациентами, тренировавшимися с гиперкапнической гипоксией. Показанное в эксперименте, улучшение стрессоустойчивости под влиянием

интервальной гиперкапнической гипоксии [Kuznetsova D.V. and Kulikov V.P., 2014], может объяснить существенное, более чем в 2 раза (с 62 до 29%) сокращение в группе пациентов, тренировавшихся с гиперкапнической гипоксией, доли тех, кто реагировал на сеанс тренировки по стрессорному «гипервентиляционному» типу. Предложенное нами тестирование пациентов и их распределение в группы с различной стратегией адаптации к гиперкапнической гипоксии, позволяет подбирать методику дыхательных тренировок на основании объективных данных газообмена и поведенческих реакций для достижения максимальной терапевтической эффективности.



## 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. 6.1). Однако, ряд нейропротекторных сигнальных систем при воздействии гиперкапнической гипоксии связан с преимущественным влиянием только одного из компонентов. Например, такие молекулы, как HIF-1 $\alpha$  и A1 рецепторы, подвержены преимущественному влиянию гипоксического стимула, а фактор NF- $\kappa$ 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 $\alpha$ . Вероятно, эта особенность позволяет тканям достигать большего уровня толерантности к ишемии/гипоксии на организменном уровне и продлевать адаптационные изменения на более длительный срок.



Рисунок 6.1. Потенцирование нейропротекторных механизмов при воздействии гиперкапнии и гипоксии. Стрелками обозначены направления обнаруженных эффектов избытка  $\text{CO}_2$  и дефицита  $\text{O}_2$ : 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 пермиссивной 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 ретикулума, 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 пермиссивной гиперкапнии не повышает уровень транскрипционного фактора HIF-1α в ткани гиппокампа и процентное содержание клеток с HIF-1α в околоинсультной области головного мозга крыс и в культуре астроцитов *in vitro*. При этом гиперкапнический компонент, увеличивает процент клеток с HIF-1α в культуре астроцитов после химической гипоксии, что является частью нейропротекторного механизма при их сочетанном воздействии.

4. Воздействие пермиссивной гиперкапнии, в отличие от нормобарической гипоксии, не увеличивает процент клеток, содержащих A1 рецепторы, в околоинсультной области головного мозга крыс и астроцитарной культуре. При этом гиперкапния и ее сочетание с гипоксией повышают процент клеток, содержащих митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы, в околоинсультной области головного мозга крыс и культуре астроцитов, стимулируя нейропротекторные механизмы, отождествляемые с сигнальными путями preconditionирования.
5. Курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии вызывает наименьшее изменение уровня проницаемости ГЭБ у крыс, по сравнению с изолированными воздействиями нормобарической гипоксии и пермиссивной 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 СОКРАЩЕНИЙ

А1 рецепторы	- Аденозиновые рецепторы А1-субтипа
АДФ	- Аденозиндифосфат
АМФ	- Аденозинмонофосфат
АПФ	- Ангиотензинпревращающий фермент
АТФ	- Аденозинтрифосфат
БЭА	- Биоэлектрическая активность
ВАК РФ	- Высшая аттестационная комиссия Российской Федерации
ВЖ	- время жизни
ВПП	- время потери позы и двигательной активности;
ГАМК	- Гамма-аминомасляная кислота
ГБОУ ВПО	- Государственное бюджетное образовательное
АГМУ	учреждение высшего профессионального образования
Минздрава РФ	«Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ГДФ	- Гуанозиндифосфат
ГТФ	- Гуанозинтрифосфат
ГЭБ	- гематоэнцефалический барьер
ДНК	- Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОМП	- Дополнительный объем мертвого пространства
ДЦП	- Детский церебральный паралич
ИЛ	- Интерлейкин
К <sup>+</sup>	- Ионы калия
КГБУЗ	- Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения
кДа	- килоДальтон
КИ	- Клеточный индекс
КоА	- Кофермент А

КрасГМУ	- Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого
миток $K^{+}_{ATP}$ -каналы	- митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы;
ММП	- Матриксная металлопротеиназа
НАД $^{+}$	- Никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	- Восстановленная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида
НИИ	- Научно–исследовательский институт
O <sub>2</sub>	- Кислород
ООО	- Общество с ограниченной ответственностью
ОСМА	- Оклюзия средней мозговой артерии
ПЦР	- Полимеразноцепная реакция
P <sub>O2</sub>	- парциальное давление кислорода в артериальной крови;
P <sub>CO2</sub>	- парциальное давление углекислого газа в артериальной крови;
pH	- Водородный показатель
РНК	- Рибонуклеиновая кислота
P <sub>O2</sub>	- парциальное давление кислорода во вдыхаемом воздухе;
P <sub>CO2</sub>	- парциальное давление углекислого газа во вдыхаемом воздухе;
CA1	- Регион в гипокампе (Cornu Ammonis)
Ca <sup>2+</sup>	- Ионы кальция
СО РАМН	- Сибирское отделение Российской академии медицинских наук
CO <sub>2</sub>	- Углекислый газ
УРПИ	- Условный рефлекс пассивного избегания



ФГБНУ	- Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФГБОУ ВО	- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
ЦНС	- Центральная нервная система
ЭПР	- эндоплазматический ретикулум
ЭЭГ	- Электроэнцефалограмма
AIF / АИФ	- Apoptos-inducible factor / Апоптоз-индуцирующий фактор
Akt1	- RAC-alpha serine/threonine-protein kinase / Protein kinase B alpha / RAC-альфа-серин/треонин-протеинкиназа
AMPK	- АМФ-активируемая протеинкиназа
Apaf-1	- apoptotic peptidase activating factor 1 / фактор 1, активирующий апоптотическую пептидазу
Bad	- Bcl-2 associated agonist of cell death / Связанный с Bcl-2 белок - агонист клеточной гибели
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
BDNF	- нейротрофический фактор роста
bFGF	- основной фактор роста фибробластов
BSA	- bovine serum albumin / Бычий сывороточный альбумин
CAD	- caspase-activated DNase / ДНКаза, активируемая каспазами
CCL	- Хемокиновый лиганд
CFCS	- Communication function classification system / Система классификации коммуникативных функций
Cl <sup>-</sup>	- Ионы хлора

DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole / 4',6-диамидино-2-фенилиндол
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium / модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
ECOPRAM	- Европейский Конгресс по превентивной регенеративной и антивозрастной медицине
EGF	- эпидермальный ростовой фактор
FADD	- Fas-ассоциированный домен смерти
Fe <sup>2+</sup>	- Ионы железа
Fet <sub>CO2</sub>	- Концентрация углекислого газа в конце выдоха
Fet <sub>O2</sub>	- Концентрация кислорода в конце выдоха
FKHR / FOXO1	- forkhead in rhabdomyosarcoma / Forkhead box protein O1 / фактор транскрипции семейства forkhead
GFAP	- glial fibrillary acidic protein / глиальный фибриллярный кислый белок
GLUT	- glucose transporter / транспортер глюкозы
GMFCS	- Gross Motor Function Classification System / Система классификации общих двигательных функций
GMFM-66	- General Motor Function Measure / Измерение общей двигательной активности
GRP-78 / BiP / HSP70 / HSPA5	- Связывающий белок иммуноглобулина (BiP), также известный как GRP-78 или белок теплового шока 70 кДа 5 (HSP70 / HSPA5)
GSK3	- Glycogen Synthase kinase 3/ Гликоген--синтаза киназа-3
HIF-1 $\alpha$	- hypoxia inducible factor 1-alpha / гипоксия индуцируемый фактор 1-альфа
HRE	- Hypoxia response elements / элементы ответа на гипоксию

HSP-70	- белок теплового шока с молекулярной массой 70 килодальтон;
ICAM-1	- Intercellular Adhesion Molecule 1 / Внутриклеточная адгезионная молекула 1
JNK	- N-концевые киназы c-Jun
K <sub>ir</sub> 6.2 / IRK6.2	- Inward-rectifier potassium channels / Калиевые каналы внутреннего выпрямления - основная субъединица митоK <sup>+</sup> <sub>АТФ</sub> -канала
LAMP2	- Lysosome-associated membrane protein 2 / Лизосомально-ассоциированный мембранный белок 2
MACS	- Manual Ability Classification System / Система классификации мануальных навыков
MALAT1	- metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 / транскрипт аденокарциномы легкого, ассоциированный с метастазами
MAPK	- Mitogen activated proteinkinase / митоген активная протеинкиназа
Mir	- МикроРНК
N <sub>2</sub>	- Азот
Na <sup>+</sup>	- Ионы натрия
NF-κB	- Nuclear factor kappa–light–chain–enhancer of activated B cells / ядерный фактор «каппа–би»
NO°	- мон(о)оксид азота, окись азота, нитрозил-радикал
NSE	- neuron specific enolase / нейрон–специфическая енолаза
OH <sup>-</sup>	- Гидроксид-анион
p75 <sup>NTR</sup> / p75(NTR)	- p75 Neurotrophin Receptor / рецептор нейротрофинов p75
PBS	- phosphate buffered saline/фосфатно–солевой буфер
PDH	- пируватдегидрогеназа

PGC-1 $\alpha$	- peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ co-activator 1 $\alpha$ / $\gamma$ -ко-активатор 1 $\alpha$ -рецептора, активируемый пролифераторами пероксисом
PI3K	- Phosphoinositide 3-kinase / фосфатидилинозитол-3-киназа
PKR / EIF2AK2	- РНК-активированная протеинкиназа / протеинкиназа R / фактор инициации трансляции эукариот 2-альфа-киназа 2
PPARs	- peroxisome proliferator-activated receptors / рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом
RelA / субъединица p65	- v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RTCA	- real-time cell analysis / клеточный анализ в реальном времени
SDF-1	- Stromal cell-derived factor-1/ фактор 1 из стромальных клеток
SUR1	- Sulfonylurea receptors / Рецепторы сульфонилмочевины 1
TFEB	- Транскрипционный фактор EB
TNF $\alpha$	- фактор некроза опухоли альфа
TUNEL	- Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling / Детектирование концевой фрагмента концевой дезоксинуклеотидил -трансферазы
VEGF	- васкулоэндотелиальный фактор роста
vHL	- белок фон Гиппеля-Линдау

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Антонова, Л.В. Проллиферативная и секреторная активность эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых в условиях гипоксии разной степени / Л.В. Антонова, В.Г. Матвеева, М.Н. Чернова [и др.] // Цитология. – 2014. - Том 56, - № 1. – С. 67-76.
2. Антонова, О.А. Повреждение и активация эндотелиальных клеток при гипоксии *in vitro* / О.А. Антонова, С.А. Локтионова, Н.В. Голубева [и др.] // Бюл. exper. биол. – 2007. - Том. 144, - № 10. – С. 384-386.
3. Беспалов, А.Г. Роль VEGF, HSP-70 и белка S-100B в механизмах потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии / А.Г. Беспалов, П.П. Трегуб, В.П. Куликов [и др.] // Патологич. физиол. эксперим. терапия. – 2014. - № 2. – С. 24-27.
4. Ванюшин, Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика. / Б.Ф. Ванюшин. // Генетика. – 2006. - Том 42, - № 9. – С. 1186-1199.
5. Гацура, С.В. Влияние эналаприла малеата и лозартана на размеры экспериментального инфаркта миокарда, сродство гемоглобина к кислороду и некоторые показатели перекисного окисления липидов. / С.В. Гацура, В.В. Зинчук. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. - № 1. – С. 19-21.
6. Гребенчиков, О.А. Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции *in vitro*. / О.А. Гребенчиков, А.М. Овезов, Ю.В. Скрипкин [и др.] // Общая реаниматология. – 2018. – Том 14, - № 2. – С. 60 - 68.
7. Данилов, А.Н., Клиническое наблюдение за течением бронхиальной астмы у ребенка дошкольного возраста, тренирующегося в условиях гиперкапнической гипоксии на тренажере «Карбоник» / А.Н. Данилов, Ю.Ф. Лобанов, Е.В. Сероштанова, О.Ю. Белова, Е.Б. Беседина // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6.

8. Зверев Я. Ф., Стресс эндоплазматического ретикулума глазами нефролога (сообщение 1) / Зверев Я. Ф., Брюханов В. М. // Нефрология, - 2012. - №3-1, - С. 54 – 71.
9. Зуев, В.А. Накопление в стареющем мозге млекопитающих фактора, резко стимулирующего пролиферативную активность глии / В.А. Зуев, И.В. Викторов, Н.П. Бородина. // Бюл. эксперим. биол. мед. – 2000. - № 3. – С. 317.
10. Кувачева, Н.В. Особенности пролиферации клеток гематоэнцефалического барьера при подавлении активности HIF-1 in vitro / Н.В. Кувачева, А.В. Моргун, Е.Д. Хилажева [и др.] // Сиб. мед. обозр. – 2016. - № 2. – С. 51-56.
11. Косарев, М.О. Гиперкапнически-гипоксические тренировки с помощью дыхательного тренажера «Карбоник» у пациентов с хронической ишемией головного мозга атеросклеротического генез / М.О. Косарев, В.А. Садова, Д.Б. Сумная [и др.] // DIZWW. - 2021. - № 9. – С. 21 - 25.
12. Кувачева, Н.В. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации. / Н.В. Кувачева, А.Б. Салмина, Ю.К. Комлева [и др.] // Журн неврол психиатр им СС Корсакова. – 2013. - Том 113, - № 4. – С. 80-85.
13. Куликов, В.П. Оценка возбудимости мотонейронов коры головного мозга человека методом магнитной стимуляции. / В.П. Куликов, Ю.В. Смирнова, К.В. Смирнов. // Физиология человека. – 2004. - Том 30, - № 3. – С. 133-135.
14. Куликов, В.П. Цереброваскулярная и кардиоваскулярная CO<sub>2</sub>-реактивность в патогенезе артериальной гипертензии. / В.П. Куликов, Д.В. Кузнецова, А.Н. Заря. // Артериальная Гипертензия. – 2017. - Том 23, - № 5. – С. 433-446.
15. Левченкова, О.С. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии. / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков. // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. - № 2. – С. 134-144.

16. Лишманов, Ю.Б. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для лигандов опиоидных рецепторов. / Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов, К. Райс. // Экспериментальная и клиническая кардиология. – 2002. - Том 65, - №4. – С. 71-77.
17. Лукьянова, Л.Д. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического preconditionирования: роль гипоксического периода и реоксигенации / Л.Д. Лукьянова, Э.Л. Германова, Р.А. Копаладзе. // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2009. - Том 147, - № 4. – С. 380-384.
18. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии. / Л.Д. Лукьянова // Монография. М.: РАН; - 2019, 214с.
19. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова. // Патол. физиол. и экспериментальная терапия. – 2011. - № 1. – С. 3-19.
20. Минакина, Л.Н. Влияние лигандов аденозиновых рецепторов и гипоксического preconditionирования на показатели основного обмена мозговой ткани в эксперименте. / Л.Н. Минакина, Э.Г. Гольдапель, Л.А. Усов. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. - Том 118, - №7. – С. 54-58.
21. Моргун, А.В. Маркеры апоптоза и нейроспецифические белки в диагностике перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденных детей. / А.В. Моргун, Н.В. Овчаренко, Т.Е. Таранушенко [и др.] // Сиб мед обозр. – 2013. - Том 3, - № 81. – С. 3-11.
22. Москаленко, С.В. Реакция системы гемостаза при гиперкапнической гипоксии после курсового применения мексидола с использованием метода тромбоэластографии. / С.В. Москаленко, И.И. Шахматов, Ю.Ф. Бондарчук [и др.] // Каз мед журн. – 2018. - Том 99, - № 6. – С. 936-941.
23. Муллер, Т.А. Влияние гипоксически-гиперкапнических тренировок на уровни активации лобной коры головного мозга у детей с синдромом

- дефицита внимания и гиперреактивностью / Т.А. Муллер, С.Н. Шилов, А.С. Пуликов // Фундаментальные исследования. – 2015. - №1. - С. 1864 - 1868.
24. Неймарк, А.И. Влияние гиперкапнической гипоксии на течение хронического абактериального простатита / А.И. Неймарк, С.С. Максимова // Урология. – 2016. - №3. - С. 80-84.
25. Нетребенко, О.К. Метаболическое программирование и эпигенетика в педиатрии. / О.К. Нетребенко, Л.А. Щеплягина, С.Г. Грибакин. // Лечение и профилактика. – 2020. - Том 10, - №1. – С. 29-35.
26. Пат. №2482884 Российская Федерация, МПК А61 М 16/00 Способ коррекции общего недоразвития речи у детей старшего дошкольного возраста / С.Н. Шилов, Е.В. Миронова, И.А. Игнатова; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии медицинских наук Научноисследовательский институт медицинских проблем Севера Сибирского отделения РАМН (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева (RU) – № 2011129480/14; заявл. 15.07.201; опубл. 07.05.2013, Бюл. № 15.
27. Печкина, К.Г. Лечение хронического эрозивного гастродуоденита у детей с использованием гиперкапнической гипоксии / К.Г. Печкина, В.П. Куликов, П.Л. Щербаков, Ю.Ф. Лобанов. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. - № 1. - С. 28-30.
28. Салмина, А.Б. Повреждение гематоэнцефалического барьера при стрессе и нейродегенерации: биохимические механизмы и новые модели для трансляционных исследований. / А.Б. Салмина, Ю.К. Комлева, Н.А. Малиновская [и др.] // Биохимия. – 2021. - Том 86, - № 6. – С. 917-932.
29. Салмина, А.Б. Эндотелиальные прогениторные клетки в развитии и восстановлении церебрального эндотелия (обзор). / А.Б. Салмина, А.В. Моргун, Н.В. Кувачева [и др.] // Соврем технол мед. – 2014. - Том 6, - № 4. – С. 213-222.



30. Сафронова, Е.С., Юнцев С.В., Белозерцев, Ю.А. Нейропротекторное и мнемотропное действие ингибиторов АПФ при травматическом диффузном аксональном повреждении мозга. / Е.С Сафронова, С.В. Юнцев, Ю.А. Белозерцев. // Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация. – 2013. - № 12. – С. 160-166.
31. Семененков, И.И. Влияние комплексного применения нормобарической гипоксии и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на изменения жирнокислотного состава плазмы крови и показателей системного иммунного воспаления у пациентов с ишемической болезнью сердца, ассоциированной с хронической обструктивной болезнью легких. / И.И. Семененков, М.С. Пристром. // Кардиоваск тер проф. – 2019. - Том 18, - № 1. – С. 136-137.
32. Семенникова, Н.В. Параметры эффективности лечения сиалолитиаза с использованием методики повышения регенераторного потенциала тканей / Семенникова Н.В., Семенников В.И., Туkenov Е.С. // Российская стоматология. – 2019 – Том 12, - № 3. – С. 3-7.
33. Смирнов, К.В. Респираторные тренировки с гиперкапнической гипоксией — эффективная составляющая комплексной терапии полинейропатии у детей с сахарным диабетом 1-го типа. / К.В. Смирнов, Ю.В. Смирнова, В.П. Куликов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. - Том 118, - № 3. – С. 32-38.
34. Смирнова, К.В. Сравнительная эффективность антиоксидантных препаратов в эксперименте *in vitro*. / К.В. Смирнова, Д.И. Гильдилов. // Рос ветерин журн. – 2021. - № 2. – С. 37-40.
35. Старцев, А.А. Реабилитация детей школьного возраста с минимальными мозговыми дисфункциями с включением тренажера «Карбоник» / А.А. Старцев // Journal of Siberian Medical Sciences. - 2014. - № 5. – С. 37.
36. Суховершин, А.В. Восстановительное лечение больных неврастениями с применением гиперкапнической гипоксии в условиях бальнеологического курорта / А.В. Суховершин, А.В. Пантин, Р.А. Суховершин [и др.] //

Сибирский вестник психиатрии и наркологии, 2009. – Том 52, - № 13. – С. 126-128.

37. Текутьева, Н.А. Инновационный метод в лечении нервно-мышечной дисфункции мочевого пузыря / Н.А. Текутьева, Ю.Ф. Лобанов, Д.Ю. Латышев, В.П. Куликов // Рос вестн перинатол и педиат. - 2021. - № 4. – С. 259 – 260.

38. Трегуб, П.П. Роль аденозиновых A1-рецепторов и митохондриальных K<sup>+</sup>АТФ-каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии / П.П. Трегуб, В.П. Куликов, Л.А. Степанова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, - 2014, - Том 58, - № 4, - С. 48-52.

39. Хананашвили, Я.А. Характер оптимизирующего влияния гиперкапнически-гипоксического воздействия на системную гемодинамику в зависимости от типа регуляции кровообращения / Я.А. Хананашвили, И.О. Халявкина // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2014. – № 20. – С. 2716–2720.

40. Хилажева, Е.Д. Активация лактатных рецепторов GPR81 стимулирует митохондриальный биогенез в клетках эндотелия церебральных микрососудов. / Е.Д. Хилажева, Н.В. Писарева, А.В. Моргун [и др.] // Анн Клин Эксп Невр. – 2017. - Том 11, - № 1. – С. 34-39.

41. Хлебодаров, Ф.Е. Дисфункция сосудистого эндотелия и ее коррекция цитопротекторами у больных стабильной стенокардией напряжения и артериальной гипертонией. / Ф.Е. Хлебодаров, В.П. Михин, П.Ю. Тюриков. // Рос кардиол журн. – 2009. - № 6. – С. 34-39.

42. Чехонин, В.П. Иммуноферментный анализ NSE и GFAP, как критерий динамической оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера крыс при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС. / В.П. Чехонин, С.В. Лебедев, Т.Б. Дмитриева [и др.] // Бюлл эксп биол мед. – 2003. - Том 136, - № 9. – С. 299-303.

43. Чехонин, В.П. Патогенетическая роль нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейроспецифических белков при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях центральной нервной системы у новорожденных. / В.П. Чехонин, С.В. Лебедев, Д.В. Блинов [и др.] // Вопр гинекол акушер перинат. – 2004. - Том 3, - № 2. – С. 50-61.
44. Чудимов, В.Ф. Влияние гипоксически-гиперкапнических тренировок на самочувствие, активность, настроение и успеваемость школьников, отнесенных по состоянию здоровья к специальной медицинской группе по физкультуре / В.Ф. Чудимов, В.П. Куликов, Н.И. Куропятник [и др.] // Лечебная физкультура и спортивная медицина. - 2010. – Том 80, - №8. – С. 45-50.
45. Чурилова, А.В. Влияние ингибитора деацетилаз гистонов на экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в структурах переднего мозга крыс при действии гипоксии. / А.В. Чурилова, Т.С. Глущенко, Е.А. Рыбникова [и др.] // Цитология. – 2018. - Том 60, - № 12. – С. 1016-1021.
46. Чурилова, А.В. Влияние легкой гипобарической гипоксии в режиме preconditionирования на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-карраВ в гиппокампе крыс до и после тяжелой гипоксии / А.В. Чурилова, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко [и др.] // Морфология. – 2009. - Том 136, - № 6. – С. 38-42.
47. Шахмарданова, С.А. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине. / С.А. Шахмарданова, О.Н. Гулевская, В.В. Селецкая [и др.] // Журн Фунд Мед Биол. – 2016. - № 3. – С. 4-15.
48. Шведова, М.В. С-Jun p-терминальные киназы и их модуляторы при ишемически-реперфузионном повреждении миокарда (обзор литературы). / М.В. Шведова, Я.Д. Анфиногенова, С.В. Попов [и др.] // Сиб жур клин эксп мед. – 2016. - Том 31, - № 3. – С. 7-15.

49. Abbott, N.J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. / N.J. Abbott, L. Ronnback, E. Hansson. // *Nat Rev Neurosci.* – 2017. - № 7. – P. 41-53.
50. Adams, J.M. HIF-1: a key mediator in hypoxia. / J.M. Adams, L.T. Difazio, R.H. Rolandelli [et al.] // *Acta Physiol Hung.* – 2009. - Vol. 96, - №1. – P. 19 - 28.
51. Adkins-Muir, D.L. Cortical electrical stimulation combined with rehabilitative training: enhanced functional recovery and dendritic plasticity following focal cortical ischemia in rats. / D.L. Adkins-Muir, T.A. Jones. // *Neurol Res.* – 2003, - №25. – P. 780-788.
52. Ahmet, I. Beneficial effects of chronic pharmacological manipulation of beta-adrenoreceptor subtype signaling in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. / I. Ahmet, M. Krawczyk, P. Heller [et al.] // *Circulation.* – 2004. - Vol. 110, - № 9. – P. 1083-1090.
53. Allan, S.M. Cytokines and acute neurodegeneration. / S.M. Allan, N.J. Rothwell. // *Nat Rev Neurosci.* – 2001. - № 2. – P. 734-744.
54. Althausen, S. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 $\alpha$ , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischemia in mice / S. Althausen, T. Mengesdorf, G. Mies [et al.] // *Neurochem.* – 2001. - № 78. – P. 779-787.
55. Anisimov, V.N. Methods of evaluating the effect of of pharmacological drugs on aging and life span in mice / *Biological Aging: Methods and Protocols* / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski. // *Methods in Molecular Biology.* – 2007. - № 371. – P. 227-236.
56. Asemu, G. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. / G. Asemu, F. Papousek, B. Ostádal [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 1999. - Vol. 31, - №10. – P. 1821-1831.
57. Ashor, A.W. Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. / A.W. Ashor, M. Siervo, J. Lara [et al.] // *Br J Nutr.* – 2015. - Vol. 113, - № 8. – P. 1182-1194.

58. Back, S.A. Brain Injury in the Preterm Infant: New Horizons for Pathogenesis and Prevention. / S.A. Back. // *Pediatr Neurol.* – 2015. - Vol. 53, - № 3. – P.185-192.
59. Bai, Y. Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity. / Y. Bai, Y. Zhang, B. Han [et al.] // *J Neurosci.* – 2018. - Vol. 38, - №1. – P. 32-50.
60. Baillieul, S. Hypoxic conditioning and the central nervous system: A new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? / S. Baillieul, S. Chacaroun, S. Doutreleau [et al.] // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2017. - Vol. 242, - №11. – P. 1198-1206.
61. Bajgar, R. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. / R. Bajgar, S. Seetharaman, A.J. Kowaltowski [et al.] // *J Biol Chem.* – 2001. - № 276. – P. 33369-33374.
62. Baldauf, K. Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. / K. Baldauf, K.G. Reymann. // *Brain Res.* – 2005. - №1056. – P. 158-167.
63. Ballabh, P. The blood-brain barrier: an overview structure, regulation and clinical implications. / P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard. // *Neurobiology of Disease.* – 2014. - № 16. – P. 1-13.
64. Barth, A. Influence of hypoxia and hypoxia/hypercapnia upon brain and blood peroxidative and glutathione status in normal weight and growth-restricted newborn piglets. / A. Barth, R. Bauer, T. Gedrange [et al.] // *Exp Toxicol Pathol.* – 1998. -Vol. 50, - № 4-6. – P. 402-410.
65. Barth, A.M. Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. / A.M. Barth, Mody I. // *J Neurosci.* – 2011. - № 31. – P. 851-860.
66. Bates, S. Characterisation of gene expression changes following permanent MCAO in the rat using subtractive hybridisation. / S. Bates , S.J. Read, D.C. Harrison [et al.] // *Brain Res.* – 2001. - № 93. – P. 70-80.

67. Beere, H.M. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. / H.M. Beere, B.B. Wolf, K. Cain [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2000. - № 2. – P. 469-475.
68. Bejaoui, M. Acetazolamide protects steatotic liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. / M. Bejaoui, E. Pantazi, V. De Luca [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2015. - Vol. 355, - №2. – P. 191-198.
69. Benderro, G.F. Increased HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  accumulation, but decreased microvascular density, in chronic hyperoxia and hypercapnia in the mouse cerebral cortex. / G.F. Benderro, C.P. Tshipis, X. Sun [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2013. - Vol. 789. – P. 29-35.
70. Bergersen, L.H. Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain. / L.H. Bergersen, A. Gjedde. // *Front Neuroenergetics.* – 2012. - № 4. – P. 5.
71. Bernardes de Jesus, B. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. / B. Bernardes de Jesus, E. Vera, K. Schneeberger [et al.] // *EMBO Mol Med.* – 2012. - Vol. 4, - №8. – P. 691-704.
72. Bernstein, D.L. miR-98 reduces endothelial dysfunction by protecting blood-brain barrier (BBB) and improves neurological outcomes in mouse ischemia/reperfusion stroke model. / D.L. Bernstein, V. Zuluaga-Ramirez, S. Gajghate [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2020. - Vol. 40, - №10. – P. 1953-1965.
73. Björklund, O. Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. / O. Björklund, M. Shang, I. Tonazzini [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2008. - Vol. 596, - №1-3. – P. 6 -13.
74. Bourin, M. The mouse light/dark box test / M. Bourin, M. Hascoët. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. - Vol. 463, - №1-3. – P. 55-65.
75. Brambrink, A.M. Tolerance-Inducing dose of 3-nitropropionic acid modulates bcl-2 and bax balance in the rat brain: a potential mechanism of chemical preconditioning. / A.M. Brambrink, A. Schneider, H. Noga [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2000. - № 20, – P. 1425-1436.

76. Brini, M. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. / M. Brini, T. Cali, D. Ottolini [et al.] // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. - Vol. 71, - №15. – P. 2787-2814.
77. Brucklacher, R.M. Hypoxic preconditioning increases brain glycogen and delays energy depletion from hypoxia-ischemia in the immature rat. / R.M. Brucklacher, R.C. Vannucci, S.J. Vannucci. // *Dev Neurosci.* – 2002. - Vol. 24, - №5. – P. 411-417.
78. Brüll, V. Acute intake of quercetin from onion skin extract does not influence postprandial blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese adults with hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. / V. Brüll, C. Burak, B. Stoffel-Wagner [et al.] // *Eur J Nutr.* – 2017. - Vol. 56, - №3. – P. 1347-1357.
79. Budweiser, S. Treatment of respiratory failure in COPD. / S. Budweiser, R.A. Jörres, Pfeifer M. // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon.* – 2008. – Vol. 3, - № 3. – P. 60 - 618.
80. Bukeirat, M. MiR-34a regulates bloodbrain barrier permeability and mitochondrial function by targeting cytochrome c. / M. Bukeirat, S.N. Sarkar, H. Hu [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2016. - Vol. 36, - №2. – P. 387-392.
81. Calabrese, V. Sex hormonal regulation and hormesis in aging and longevity: role of vitagenes. / V. Calabrese, G. Scapagnini, S. Davinelli [et al.] // *J Cell Commun Signal.* – 2014. - Vol. 8, - №4. – P. 369-384.
82. Calvo CF. A pro- and an anti-inflammatory cytokine are synthesised in distinct brain macrophage cells during innate activation. / Calvo CF, Amigou E, Desaymard C, Glowinski J // *J Neuroimmunol.* –2005. - № 170. – P. 21-30.
83. Candé, C. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? / C. Candé, F. Cecconi, P. Dessen [et al.] // *J Cell Sci.* – 2002. - № 115. – P. 4727-4734.
84. Cantagrel, S. Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in a rat model of immature brain hypoxia-ischemia. / S. Cantagrel, C. Krier, S. Ducrocq [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2003. - Vol. 347, - №2. – P. 106-110.

85. Cao, T. Caffeine Treatment Promotes Differentiation and Maturation of Hypoxic Oligodendrocytes via Counterbalancing Adenosine 1 Adenosine Receptor-Induced Calcium Overload. / T. Cao, T. Ma, Y. Xu [et al.] // *Med Sci Monit.* – 2019. - Vol. 6, - №25. –P. 1729-1739.
86. Carmeliet, P. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation, and tumour angiogenesis. / P. Carmeliet, Y. Dor, J.M. Herbert [et al.] // *Nature.* – 1998. - № 394. – P. 485 – 490.
87. Carmichael, S.T. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. / S.T. Carmichael, I. Archibeque, L. Luke[et al.] // *Exp Neurol.* – 2005. – № 193. – P. 291-311.
88. Carmichael, S.T. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. / S.T. Carmichael, L. Wei, C.M. Rovainen [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2001. - № 8. – P. 910-922.
89. Cerutti, C. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. / C. Cerutti, A.J. Ridley. // *Exp Cell Res.* – 2017. - Vol. 358, - №1. – P. 31-38.
90. Chalbot, S. Cerebrospinal Fluid Secretory Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase A2 activity: a biomarker of blood-cerebrospinal fluid barrier permeability. / S. Chalbot, H. Zetterberg, K. Blennow [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2010. - Vol. 478, - №3. – P. 179-183.
91. Chan, Y.C. miR-210: the master hypoxamir. / Y.C. Chan, J. Banerjee, S.Y. Choi [et al.] // *Microcirculation.* – 2012. - Vol. 19, - №3. – P. 215-223.
92. Chen, J. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. / J. Chen, S.H. Graham, R.L. Zhu [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* –1996. - № 16. –P. 566-577.
93. Chen, W.J. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. / W.J. Chen, H.W. Chen, S.L. Yu [et al.] // *Shock.* – 2005. - № 24. – P. 124-131.



94. Chi, O.Z. Hypoxic Preconditioning Increases Blood-Brain Barrier Disruption in the Early Stages of Cerebral Ischemia. / O.Z. Chi, S.J. Mellender, S. Barsoum [et al.] // *Curr Neurovasc Res.* – 2017. - Vol. 14, - №1. – P. 26-31.
95. Chiu, C.H. Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening. / C.H. Chiu, K.F. Lei, W.L. Yeh [et al.] // *J Orthop Surg Res.* – 2017. – Vol. 12, - №1. – P. 149.
96. Chiu, C.H. Real-Time Monitoring of Ascorbic Acid-Mediated Reduction of Cytotoxic Effects of Analgesics and NSAIDs on Tenocytes Proliferation. / C.H. Chiu, P. Chen, A.C. Chen, [et al.] // *Dose Response.* – 2019. – Vol. 17, - № 1. – P. 1559325819832143.
97. Cho, S. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. / S. Cho, E.M. Park, P. Zhou [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2005. - Vol. 25, - №4. – P. 493-501.
98. Choy, M. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. / M. Choy, V. Ganesan, D.L. Thomas [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. - № 26. – P. 1066-1075.
99. Chuang, I.C. Effect of carbon dioxide on pulmonary vascular tone at various pulmonary arterial pressure levels induced by endothelin-1. / I.C. Chuang, H.P. Dong, R.C. Yang [et al.] // *Lung.* – 2010. - № 188. – P. 199 - 207.
100. Churilova, A.V. Effects of moderate hypobaric hypoxic preconditioning on the expression of the transcription factors pCREB and NF-kappaB in the rat hippocampus before and after severe hypoxia. / A.V. Churilova, E.A. Rybnikova, T.S. Glushchenko [et al.] // *Neurosci Behav Physiol.* – 2010. - Vol. 40, - №8. – P. 852-857.
101. Coimbra-Costa, D. Intermittent Hypobaric Hypoxic Preconditioning Provides Neuroprotection by Increasing Antioxidant Activity, Erythropoietin Expression and Preventing Apoptosis and Astroglialosis in the Brain of Adult Rats

- Exposed to Acute Severe Hypoxia / D. Coimbra-Costa, F. Garzón, N. Alva [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, - № 10. – P. 5272.
102. Coimbra-Costa, D. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. / D. Coimbra-Costa, N. Alva, M. Duran [et al.] // *Redox Biol.* – 2017. - № 12. – P. 216-225.
103. Coppi, E. A2B Adenosine Receptors: When Outsiders May Become an Attractive Target to Treat Brain Ischemia or Demyelination. / E. Coppi, I. Dettori, F. Cherchi [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. - Vol. 21, - № 24. – P. 9697.
104. Costa, A.D. The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart mitochondria. / A.D. Costa, C.L. Quinlan, A. Andrukhiv [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H406–H415, 2006.
105. Cramer, T. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cellmediated inflammation. / T. Cramer, Y. Yamanishi, B.E. Clausen [et al.] // *Cell.* – 2003. - № 112. – P. 645 - 657.
106. Cregan, S.P. p53 activation domain 1 is essential for PUMA upregulation and p53-mediated neuronal cell death. / S.P. Cregan, N.A. Arbour, J.G. MacLaurin [et al.] // *J Neurosci.* – 2004. - № 24. – P. 10003–10012.
107. Cui, M. Decreased extracellular adenosine levels lead to loss of hypoxia-induced neuroprotection after repeated episodes of exposure to hypoxia. / M. Cui, X. Bai, T. Li [et al.] // *PLoS One.* – 2013. - Vol. 8, - №2. – P. 57065.
108. Currie, R.W. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. / R.W. Currie, J.A. Ellison, R.F. White [et al.] // *Brain Res.* – 2000. - Vol. 863, - №1-2. – P. 169-81.
109. Dahlem, Y. The human mitochondrial KATP channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach. / Y. Dahlem, T. Horn, L. Butinas [et al.] // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2004. - № 1656. – P. 46-56
110. Danbolt, N.C. Glutamate uptake. / N.C. Danbolt. // *Prog Neurobiol.* – 2001. - № 65. – P. 1–105.

111. D'Arcy, MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. / M.S. D'Arcy // Cell Biol Int. – 2019. - Vol. 43, - №6. – P. 582 - 592.
112. Deacon, N.L. Intermittent hypercapnic hypoxia during sleep does not induce ventilatory long-term facilitation in healthy males. / N.L. Deacon, R.D. McEvoy, D.L. Stadler [et al.] // J Appl Physiol (1985). – 2017. - Vol. 123, - № 3. – P. 534-543.
113. del Zoppo, G.J. Inflammation after stroke: is it harmful? / G.J. del Zoppo, K.J. Becker, J.M. Hallenbeck. // Archives of Neurology. – 2001. - Vol. 58, - №4. – P. 669–672.
114. Dell, R.B. / R.B. Dell, S. Holleran, R. Ramakrishnan. // ILAR J. – 2002. - № 43. – P. 207-213.
115. Dempsey, R.J. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. / R.J. Dempsey, K.A. Sailor, K.K. Bowen [et al.] // J Neurochem. – 2003. - № 87. – P.586–597.
116. Deniz, B.F. High gestational folic acid supplementation prevents hypoxia-ischemia-induced caspase-3 augmenting without changing synapsin and H3 methylation levels in the rat hippocampus. / B.F. Deniz, H.D. Confortim, P.M. Miguel [et al.] // Int J Dev Neurosci. – 2021. - Vol. 81, - №6. – P. 510-519.
117. Deryagin, O.G. Molecular Bases of Brain Preconditioning. / O.G. Deryagin, S.A. Gavrilova, K.L. Gainutdinov [et al.] // Front Neurosci. – 2017. - Vol. 25, - №11. – P, 427.
118. Dettori, I. Protective effects of carbonic anhydrase inhibition in brain ischaemia in vitro and in vivo models. / Dettori I, Fusco I, Bulli I, [et al.] // J Enzyme Inhib Med Chem. – 2021. – Vol. 36, - №1. – C. 964 - 976.
119. Dickhout, J.G. Endoplasmic reticulum stress and renal disease / J.G. Dickhout, J.C. Krepinsky. // Antioxid. Redox Signal. – 2009. - Vol. 11, - №9. – P. 2341-2352.

120. Dirnagl, U. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. / U. Dirnagl, R.P. Simon, J.M. Hallenbeck. // Trends Neurosci. – 2003. - Vol. 26, - №5. – P. 248–254.
121. Doman, R.J. Children with severe brain injuries. Neurological organization in terms of mobility. / R.J. Doman, E.B. Spitz, E. Zucman [et al.] // JAMA. – 1960. - Vol. 17, - №174. – P. 257-262.
122. Dong, H.P. Salvinorin A preserves cerebral pial artery autoregulation after forebrain ischemia via the PI3K/AKT/cGMP pathway. / H.P. Dong, W. Zhou, X.X. Ma [et al.] // Braz J Med Biol Res. – 2018. - Vol. 51, - №5. – P. e6714.
123. Dunwiddie, T.V. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. / T.V. Dunwiddie, S.A. Masino. // Annu Rev Neurosci. – 2001. - № 24. – P. 31-55.
124. Dzhalilova, D.S., Expression of HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and VEGF genes in the liver and blood serum levels of HIF-1 $\alpha$ , erythropoietin, VEGF, TGF- $\beta$ , 8-isoprostane, and corticosterone in Wistar rats with high and low resistance to hypoxia / D.S. Dzhalilova, M.E. Diatroptov, I.S. Tsvetkov [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2018. – Vol. 165, - № 6. - C. 781-785.
125. Eckhart, A.D. Characterization of the  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. / A.D. Eckhart, N. Yang, X. Xin [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. - № 94. – P. 9487 - 9492.
126. Ek, C.J. Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia. / C.J. Ek, B. D'Angelo, A.A. Baburamani [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2015. - Vol. 35, - №5. – P. 818-827.
127. Eliasson, A. The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability / A. Eliasson, L. Krumlinde-Sundholm. // Developmental Medicine & Child Neurology. – 2007. - Vol. 48, - №7. – P. 549-554.

128. Ertan, C. Adenosine-induced ventricular arrhythmias in patients with supraventricular tachycardias. / C. Ertan, I. Atar, O. Gulmez [et al.] // *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* – 2008. - Vol. 1, - №4. – P. 386-390.
129. Evans, M.D. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. / M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke. // *Mutat Res.* – 2004. - № 567. – P. 1–61.
130. Fan, F. MiR-539 targets MMP-9 to regulate the permeability of blood-brain barrier in ischemia/reperfusion injury of brain. / F. Fan, J. Yang, Y. Xu [et al.] // *Neurochem Res.* – 2018. - Vol. 43, - №12. – P. 2260-2267.
131. Feldser, D. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. / D. Feldser, F. Agani, N.V [et al.] Ferreira G., // *Cancer Res.* – 1999. - № 59. – P. 3915 - 3918.
132. Ferreira, J.V. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. / J.V. Ferreira, A.R. Soares, J.S. Ramalho [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. - № 5. – P. 10210.
133. Ferreira, J.V. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. / J.V. Ferreira, H. Fôfo, E. Bejarano [et al.] // *Autophagy.* – 2013. - № 9. – P. 1349 -1366.
134. Ferrer, I. Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies. / I. Ferrer. // *Cerebrovasc Dis.* – 2006. - Vol. 21, - № 2. – P. 9-20.
135. Ferrer, I. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. / I. Ferrer, B. Friguls, E. Dalfó [et al.] // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2003. - Vol. 29, - № 5. – P. 472 – 481.
136. Finch, C.E. Update on slow aging and negligible senescence—a mini-review. / C.E. Finch. // *Gerontology.* – 2009. - № 55. – P. 307-313.
137. Flurkey, K. The Mouse in Aging Research. In: Fox JG, et al., editors. / K. Flurkey, J.M. Curren, D.E. Harrison. // *The Mouse in Biomedical Research.* Second. III. Academic Press. – 2007. pp. 637-672.

138. Fowler, J.C. Systemic hypoxia and the depression of synaptic transmission in rat hippocampus after carotid artery occlusion. / J.C. Fowler, L.M. Gervitz, M.E. Hamilton [et al.] // *J Physiol.* – 2003. - № 550. – P. 961-972.
139. Franklin, T.B. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. / T.B. Franklin, A.M. Krueger-Naug, D.B. Clarke [et al.] // *Int J Hyperthermia.* – 2005. - Vol. 21, - №5. – P. 379-392.
140. Fraser, D. Fetal heart rate response to maternal hypocapnia and hypercapnia in late gestation. / D. Fraser, D. Jensen, L.A. Wolfe [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Can.* – 2008. - № 30. – P. 312.
141. Frémont, M. Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is a stress-responsive kinase that induces NFkappaB-mediated resistance against mercury cytotoxicity. / M. Frémont, F. Vaeyens, C.V. Herst [et al.] // *Life Sci.* – 2006. - Vol. 78, - №16. – P. 1845-1856.
142. Frijns, CJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. / C.J. Frijns, L.J. Kappelle. // *Stroke.* – 2012. - № 33. – P. 2115-2122.
143. Frykholm, P. Relationship between cerebral blood flow and oxygen metabolism, extracellular glucose and lactate concentrations during middle cerebral artery occlusion and reperfusion: a microdialysis and positron emission tomography study in nonhuman primates. / P. Frykholm, L. Hillered, B. Långström [et al.] // *J Neurosurg.* – 2005. - Vol. 102, - №6. – P. 1076-1084.
144. Furuichi, T. Generation of hydrogen peroxide during brief oxygen-glucose deprivation induces preconditioning neuronal protection in primary cultured neurons. / T. Furuichi, W. Liu, H. Shi [et al.] // *J Neurosci Res.* – 2005. - Vol. 79, - №6. – P. 816-824.
145. Gabai, V.L. Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation. / V.L. Gabai, A.B. Meriin, J.A. Yaglom [et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. - № 275. – P. 38088-38094.

146. Gang, L. Cytokines and epilepsy. / L. Gang, S. Bauer, M. Nowak [et al.] // *Seizure-Eur J Epilep.* – 2011. - Vol. 20, - №3. – P. 249-256.
147. Garberg, H.T. Tempora profile of circulating microRNAs after global hypoxia-ischemia in newborn piglets. / H.T. Garberg, M.U. Huun, L.O. Baumbusch [et al.] // *Neonatology.* – 2017. - Vol. 111, - №2. – P. 133-139.
148. Garlid, K.D. Evidence for the existence of an inner membrane anion channel in mitochondria. / K.D. Garlid, A.D. Beavis. // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1986. - № 273. – P. 13578-13582.
149. Ge, X. MiR-21 alleviates secondary blood-brain barrier damage after traumatic brain injury in rats. / X. Ge, Z. Han, F. Chen [et al.] // *Brain Res.* – 2015. - № 1603. – P. 150-157.
150. Gerber, H-P. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. / F. Condorelli, J. Park, N. Ferrara. // *J Biol Chem.* – 1997. - № 272. – P. 23659 - 23667.
151. Gharibani, P.M. The mechanism of taurine protection against endoplasmic reticulum stress in an animal stroke model of cerebral artery occlusion and stroke-related conditions in primary neuronal cell culture. / P.M. Gharibani, J. Modi, C. Pan [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2013. - № 776. – P. 241-258.
152. Gheorghiu, M.A. short review on cell-based biosensing: challenges and breakthroughs in biomedical analysis. / M.A. Gheorghiu // *J Biomed Res.* – 2020. – Vol. 35, - №4. – P. 255 - 263.
153. Ghozy, S. Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: A Battle Against the Biology of Nature. / S. Ghozy, A. Reda, J. Varney [et al.] // *Front Neurol.* – 2022. - №13. – P. 870141.
154. Goryacheva, A.V. Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain / A.V. Goryacheva, S.V. Kruglov, M.G. Pshennikova. // *Nitric Oxide.* – 2010. - Vol. 23, - № 4. – P. 289-299.

155. Goss, S.P. Bicarbonate enhances the peroxidase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical. / S.P. Goss, R.J. Singh, B. Kalyanaraman. // J Biol Chem. – 1999. - Vol. 274, - №40. – P. 28233-28239.
156. Gould, T.D. The Open Field Test in Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice / T.D. Gould, T.D. Dao, C.E. Kovacsics. // Neuromethods. – 2010. - Vol. 42. – P. 1-20.
157. Govindaswami, M. Delta 2-specific opioid receptor agonist and hibernating woodchuck plasma fraction provide ischemic neuroprotection / M. Govindaswami, S.A. Brown, J. Yu [et al.] // Acad Emerg Med. – 2008. – Vol. 15, - № 3. – P. 250 - 257.
158. Gu, G.J. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and erythropoietin in rats. / G.J. Gu, Y.P. Li, Z.Y. Peng [et al.] // J Appl Physiol (1985). – 2008. - Vol. 104, - №4. – P. 1185-1191.
159. Guan, N. Label-free monitoring of T cell activation by the impedance-based xCELLigence system / N. Guan, J. Deng, T. Li [et al.] // Mol. Biosyst. – 2013. - Vol. 9, - № 5. – P. 1035-1043.
160. Guo, F. M9, a novel region of Amino-Nogo-A, attenuates cerebral ischemic injury by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in mice. / F. Guo, W-L. Jin, L-Y. // CNS Neuroscience & Therapeutics. – 2013. - Vol. 19, - №5. – P. 319-328.
161. Gustin, S.E. Testis development, fertility, and survival in Ethanolamine kinase 2-deficient mice. / S.E. Gustin, P.S. Western, P.J. McClive[et al.] // Endocrinology. – 2008. - Vol. 149, - №12. – P. 6176-686.
162. Gutmann, B. In vitro models of brain ischemia: the peptidergic drug cerebrolysin protects cultured chick cortical neurons from cell death /B. Gutmann, B. Hutter-Paier, G. Skofitsch. // Neurotox Res. – 2002. - № 1. – P. 59-65.
163. Hall, CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. / C.S. Hall. // J. comp. physiol. Psychol. – 1936. - № 22. – P. 345-352.



164. Halterman, M.W. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. / M.W. Halterman, C.C. Miller, H.J. Federoff. // J Neurosci. – 1999. - Vol. 19. – P. 6818–6824.
165. Harrison, D.E. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. / D.E. Harrison, R. Strong, Z.D. Sharp [et al.] // Nature. – 2009. - Vol. 460, - № 7253. - P. 392-395.
166. Helenius, I.T. Elevated CO<sub>2</sub> suppresses specific *Drosophila* innate immune responses and resistance to bacterial infection. / I.T. Helenius, T. Krupinski, D.W. Turnbull [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. - Vol. 106, - №44, – P. 18710-18715.
167. Heurteaux, C. Essential role of adenosine, adenosine A<sub>1</sub> receptors, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. / C. Heurteaux, I. Lauritzen, C. Widmann [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. - Vol. 92, - №10. – P. 4666-4670.
168. Hidecker, M.J. Developing and validating the Communication Function Classification System for individuals with cerebral palsy. / M.J. Hidecker, N. Paneth, P.L. Rosenbaum [et al.] // Dev Med Child Neurol. – 2011. - Vol. 53, - № 8. – P. 704-710.
169. Höehn, B. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. / B. Höehn, T.M. Ringer, L. Xu [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2001. - № 21. – P. 1303-139.
170. Hopwood, S.E. Transient changes in cortical glucose and lactate levels associated with peri-infarct depolarizations, studied with rapid-sampling microdialysis. / S.E. Hopwood, M.C. Parkin, E.L. Bezzina [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2005. - Vol. 25, - №3. – P. 391-401.
171. Horiguchi, T. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. / T. Horiguchi, B. Kis, N. Rajapakse [et al.] // Stroke. - 2003. – Vol. 34, - № 4. – P. 1015-1020.

172. Howell, N.J. The role of HIFs in ischemia-reperfusion injury. / N.J. Howell, D. Tennant. // Hypoxia. – 2014. - № 2. – P. 107-115.
173. Hu, H. MiR-34a interacts with cytochrome c and shapes stroke outcomes. / H. Hu, E.A. Hone, E.A. Provencher [et al.] // Sci Rep. – 2020. - Vol. 10, - №1. – P. 3233.
174. Hu, J. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. / J. Hu, D.J. Discher, N.H. Bishopric [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 1998. - № 245. – P. 894 - 899.
175. Huang, L. Activation of ATP-sensitive K channels protects hippocampal CA1 neurons from hypoxia by suppressing p53 expression. / L. Huang, W. Li, B. Li [et al.] // Neurosci Lett. – 2006. - № 398. – P. 34-38.
176. Huang, L. Inhibition of microRNA-210 suppresses pro-inflammatory response and reduces acute brain injury of ischemic stroke in mice. / L. Huang, Q. Ma, Y.H. Li [et al.] // Exp Neurol. – 2018. - № 300. – P. 41-50.
177. Huang, L.E. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. / L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1996. - Vol. 271, - №50. – P. 32253-32259.
178. Huang, L.E. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependant degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. / L.E. Huang, J. Gu, M. Schau [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. - № 95. – P. 7987–7992.
179. Hubbi, M.E. Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) for lysosomal degradation. / M.E. Hubbi, H. Hu, Kshitiz, I. Ahmed [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – № 288. – P. 10703 - 10714.
180. Hubbi, M.E. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  to promote cell-cycle progression. / M.E. Hubbi, D.M. Gilkes, H. Hu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2014. - № 111. – P. 3325-3334.

181. Husain, N. AgNOR expression in CNS neoplasms. / N. Husain, M. Bagchi, M. Husain [et al.]. – 1997. - Vol. 40, - № 4. – P. 503-509.
182. Ii, M. Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells / M. Ii, H. Nishimura, H. Sekiguchi [et al.] // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 105, - № 9. – P. 860-868.
183. Ikeda, T. Hyperthermic preconditioning prevents blood-brain barrier disruption produced by hypoxia-ischemia in newborn rat. / T. Ikeda, X.Y. Xia, Y.X. Xia [et al.] // *Brain Res.* – 1999. - № 117. – P. 53-58.
184. Ilie, A. Endogenous activation of adenosine A(1) receptors accelerates ischemic suppression of spontaneous electrocortical activity. / A. Ilie, D. Ciocan, A.M. Zagrean [et al.] // *J Neurophysiol.* – 2006. - Vol. 96, - №5. – P. 2809-2814.
185. Iyer, N.V. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . / N.V. Iyer, L.E. Kotch, F. Agani [et al.] // *Genes Dev.* – 1998. - № 12. – P. 149-162.
186. Jablonska, A. Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation. / A. Jablonska, B. Lukomska. // *Acta Neurobiologiae Experimentalis.* – 2011. - Vol. 71, - №1. – P. 74-85.
187. Jackson, H.F. The effects of parachlorophenylalanine and stimulus intensity on open-field test measures in rats / H.F. Jackson, P.L. Broadhurst. // *Neuropharmacology.* – 1982. - № 21. – P. 1279-1282.
188. Jacobson, K.A. Adenosine receptors as therapeutic targets. / Jacobson KA, Gao ZG. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2006. - № 5. – P. 247-264.
189. Jafari, M. Healthspan Pharmacology / M. Jafari. // *Rejuvenation Research.* December. – 2015. - Vol. 18, - №6. – P. 573-580.
190. Jaitovich, A. High CO<sub>2</sub> levels cause skeletal muscle atrophy via AMP-activated kinase (AMPK), FoxO3a protein, and muscle-specific Ring finger protein 1 (MuRF1). / A. Jaitovich, M. Angulo, E. Lecuona [et al.] // *J Biol Chem.* – 2015. - Vol. 290, - №14. – P. 9183-9194.

191. Jambhekar, A. Roles and regulation of histone methylation in animal development. / A. Jambhekar, A. Dhall, Y. Shi. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2019. - Vol. 20, - №10. – P. 625-641.
192. Jensen, M.S. Preconditioning-induced protection against cyanide-induced neurotoxicity is mediated by preserving mitochondrial function. / M.S. Jensen, B. Ahlemeyer, A. Ravati [et al.] // *Neurochem Int.* – 2002. - Vol. 40. –P. 285–293.
193. Jiang, B-H. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. / B-H. Jiang, E. Rue, G.L. Wang [et al.] // *J Biol Chem.* – 1996. - № 271. – P. 17771 - 17778.
194. Jiang, Y. miR-210 mediates vagus nerve stimulation-induced antioxidant stress and anti-apoptosis reactions following cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. / Y. Jiang, L. Li, X. Tan [et al.] // *J Neurochem.* – 2015. - Vol. 134, - №1. – P. 173-181.
195. Jin, R. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. / R. Jin, G. Yang, G. Li. // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2010. - Vol. 87, - №5. – P. 779-789.
196. Jornayvaz, F.R. Regulation of mitochondrial biogenesis. / F.R. Jornayvaz, G.I. Shulman. // *Essays Biochem.* – 2010. - № 47. – P. 69-84.
197. Jung, M.E. Intermittent hypoxia training: Powerful, non-invasive cerebroprotection against ethanol withdrawal excitotoxicity. / Jung M.E., Mallet R.T. // *Respir Physiol Neurobiol.* – 2018. - №256. – P.67-78.
198. Kallio, P.J. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. / P.J. Kallio, W.J. Wilson, S. O'Brien [et al.] // *J Biol Chem.* – 1999. - № 274. – P. 6519-6525.
199. Kaneko, M. Activation signal of nuclear factor- $\kappa$ B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. / M. Kaneko, Y. Niinuma, Y. Nomura. // *Biol Pharm Bull.* – 2003. - Vol. 26, - №7. – P. 931-935.
200. Kato, K. Differential effects of sublethal ischemia and chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid on protein expression in gerbil

- hippocampus. / K. Kato, K. Shimazaki, T. Kamiya [et al.] // *Life Sci.* –2005. - Vol. 77, - №23. – P. 2867-2878.
201. Kelly, S. Gene transfer of HSP72 protects cornu ammonis 1 region of the hippocampus neurons from global ischemia: influence of Bcl-2. / S. Kelly, Z.J. Zhang, H. Zhao [et al.] // *Ann Neurol.* – 2002. - № 5. – P. 160-167.
202. Kelly, S. Targeting expression of hsp70i to discrete neuronal populations using the Lmo-1 promoter: assessment of the neuroprotective effects of hsp70i in vivo and in vitro. / S. Kelly, A. Bieneman, K. Horsburgh [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2001. - № 21. – P. 972-981.
203. Keynes, R.G. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. / R.G. Keynes, J. Garthwaite. // *Curr Mol Med.* – 2004. - Vol. 4, - №2. – P. 179-191.
204. Khan, M. The inhibitory effect of S-nitrosoglutathione on blood-brain barrier disruption and peroxynitrite formation in a rat model of experimental stroke. / M. Khan, T.S. Dhammu, H. Sakakima [et al.] // *Journal of Neurochemistry.* – 2012. - № 123 (supplement s2). – P. 86-97.
205. Kim, S-W. Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1 phosphorylation and secretion. / S-W. Kim, Y. Jin, J-H. Shin [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2012. - Vol. 46, - №1. – P. 147-156.
206. Kitamura, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces / M. Kitamura. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2008. - Vol. 295, - №2. – P. F323-F334.
207. Kleindienst, A. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat. / A. Kleindienst, H.B. Harvey, A.C. Rice, C. Müller [et al.] // *J Neurotrauma.* – 2004. - Vol. 21, - №5. – P. 541-547.
208. Kniffin, C.D. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. / C.D. Kniffin, L.E. Burnett, K.G. Burnett. // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* – 2014. - № 170. – P. 43-49.

209. Knyazev, E.N. Metabolic Reprogramming of Trophoblast Cells in Response to Hypoxia. / E.N. Knyazev, G.S. Zakharova, L.A. Tonevitsky [et al.] // Bull Exp Biol Med. – 2019. - Vol. 166, - №3, – P. 321-325.
210. Krantic, S. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. / S. Krantic, N. Mechawar, S. Reix [et al.] // Trends Neurosci. – 2005. - № 28. – P. 670-676.
211. Krenz, M. Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. / M. Krenz, O. Oldenburg, H. Wimpee [et al.] // Basic Res. Cardiol. – 2002. - № 97. – P. 365-373.
212. Krick, S. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. / S. Krick, B.G. Eul, J. Hänze [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2005. - Vol. 32, - №5. – P. 395-403.
213. Krieg, M. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. / M. Krieg, R. Haas, H. Brauch [et al.] // Oncogene. – 2000. - Vol. 19, - №48. – P. 5435-5443.
214. Krieger, J. Pulmonary hypertension, hypoxemia, and hypercapnia in obstructive sleep apnea patients. / J. Krieger, E. Sforza, M. Apprill [et al.] // Chest. – 1989. - № 96. – P. 729-737.
215. Kulikov, V.P. The state of cerebral hemodynamics in conditions of prolonged adaptation to hypercapnic hypoxia. / V.P. Kulikov, A.G. Bespalov, N. Yakushev // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2009. - №39. – P. 269-273.
216. Kulinskiĭ, V.I. Biochemical and pharmacological mechanisms of different types of hypoxic preconditioning in cerebral ischemia in mice. / V.I. Kulinskiĭ, T.V. Gavrilina, L.N. Minakina [et al.] // Biomed Khim. – 2006. - Vol. 52, - №3. – P. 309-316.
217. Kuznetsova, D.V. Cerebrovascular and systemic hemodynamic response to carbon dioxide in humans / D.V. Kuznetsova, V.P. Kulikov. // Blood Pressure Monitoring. – 2014. - Vol. 19, - №2. – P. 81-89.

218. Kwasiborski, P.J. Selected biochemical markers of hypoxia. / P.J. Kwasiborski. // *Przegl Lek.* – 2012. - Vol. 69, - №3. – P. 115-119.
219. Lacza, Z. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain. / Z. Lacza, J. Snipes, B. Kis [et al.] // *Brain Res.* – 2003. - № 994. – P. 27-36.
220. Lakhan, S.E. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. / S.E. Lakhan, A. Kirchgessner, M. Hofer. // *Journal of Translational Medicine.* – 2009. – 7. – P. 97
221. Lando, D. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. / D. Lando, J.J. Gorman, M.L. Whitelaw [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2003. - № 270. – P. 781-790.
222. Lanzillotta, A. Targeted acetylation of NF-κB/RelA and histones by epigenetic drugs reduces post-ischemic brain injury in mice with an extended therapeutic window. / A. Lanzillotta, G. Pignataro, C. Branca [et al.] // *Neurobiology of Disease.* – 2012. - № 49. – P. 177-189.
223. Larsson, E. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. / E. Larsson, R.J. Mandel, R.L. Klein [et al.] // *Exp Neurol.* – 2002. - № 177. – P. 1-8.
224. Lassoukova, T.V. Opioid receptors and resistance of the heart to pathogenetic influences. / T.V. Lassoukova, L.N. Maslov. // *CurrDrug Targets.* – 2012. - Vol.13, - №2. – P. 230-246.
225. Latour, L.L. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. / L.L. Latour, D.W. Kang, M.A. Ezzeddine [et al.] // *Ann Neurol.* – 2004. - № 56. – P. 468-477.
226. Leak, R.K. Enhancing and Extending Biological Performance and Resilience. / R.K. Leak, E.J. Calabrese, W.J. Kozumbo [et al.] // *Dose Response.* – 2018. - № 16. – P. 1559325818784501.
227. Lee, J.W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. / J.W. Lee, S.H. Bae, J.W. Jeong [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine.* – 2004. - Vol. 36, - №1. – P. 1 - 12.

228. Li, B. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction / B. Li, S. Roth. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1999. – Vol. 40, - №6. – P. 1200-1216.
229. Li, L. Relationship between HIF-1alpha expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury. / L. Li, Y. Qu, J. Li [et al.] // *Brain Res.* – 2007. - № 1180. – P. 133-139.
230. Li, S.J. MicroRNA-150 regulates glycolysis by targeting von Hippel-Lindau in glioma cells. / S.J. Li, H.L. Liu, S.L. Tang [et al.] // *Am J Transl Res.* – 2017. - № 9. – P. 1058-1066.
231. Li, W. Ischemic preconditioning in the rat brain enhances the repair of endogenous oxidative DNA damage by activating the base-excision repair pathway. / W. Li, Y. Luo, F. Zhang [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. - № 26. – P. 181-198.
232. Li, Z. Long noncoding RNA Malat1 is a potent autophagy inducer protecting brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by sponging miR-26b and upregulating ULK2 expression. / Z. Li, J. Li, N. Tang. // *Neuroscience.* – 2017. -№ 354. – P. 1-10.
233. Lichtenwalner, R.J. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. / R.J. Lichtenwalner, J.M. Parent. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. - Vol. 26, - №1. – P. 1-20.
234. Lin, H.J. Hypobaric hypoxia preconditioning attenuates acute lung injury during high-altitude exposure in rats via up-regulating heat-shock protein 70. / H.J. Lin, C.T. Wang, K.C. [et al.] // *Clin Sci (Lond).* – 2011. - Vol. 121, - №5. – P. 223-231.
235. Lin, L.T. Protective effects of hypercapnic acidosis on Ischemia-reperfusion-induced retinal injury. / L.T. Lin, J.T. Chen, M.C. Tai [et al.] // *PLoS One.* – 2019. - Vol. 14, - №1. – P. e0211185.



236. Lin, X.W. HIF-1 regulates insect lifespan extension by inhibiting c-Myc-TFAM signaling and mitochondrial biogenesis. / X.W. Lin, L. Tang, J. Yang [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. - № 1863. – P. 2594-2603.
237. Lindauer, U. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels. / U. Lindauer, J. Vogt, S. Schuh-Hofer [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2003. - Vol. 23, - №10. – P. 1227-1238.
238. Liu, B.N. Neuroprotective effect of pAkt and HIF-1  $\alpha$  on ischemia rats. / B.N. Liu, B.X. Han, F. Liu. // *Asian Pac J Trop Med*. – 2014. - Vol. 7, - №3. – P. 221-225.
239. Liu, C. Sleep fragmentation attenuates the hypercapnic (but not hypoxic) ventilatory responses via adenosine A1 receptors in awake rats. / C. Liu, Y. Cao, A. Malhotra [et al.] // *Respir Physiol Neurobiol*. – 2011. – Vol. 175, - №1. – P. 29-36.
240. Liu, D. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. / D. Liu, C. Lu, R. Wan [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2002. - № 22. – P. 431-443.
241. Liu, J.Y. Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmacoresistance in human epilepsy. / J.Y. Liu, M. Thom, C.B. Catarino [et al.] // *Brain*. – 2012. - Vol. 135, - №10. – P. 3115-3133.
242. Liu, Y. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection. / Y. Liu, T. Sato, B. O'Rourke [et al.] // *Circulation*. – 1998. - Vol. 97, - №24. – P. 2463-2469.
243. Liu, Z. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. / Z. Liu, M. Chopp. // *Prog Neurobiol*. – 2016. - № 144. – P. 103-120.
244. Lorrio, S. Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia. / S. Lorrio,

V. Gómez-Rangel, P. Negredo [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2013. - № 67. –P. 403-411.

245. Lowry, O.H. Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. / O.H. Lowry, J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger [et al.] // *J Biol Chem*. – 1964. – № 239. – P. 18-30.

246. Lukyanova, L. Signaling Role of Mitochondrial Enzymes and Ultrastructure in the Formation of Molecular Mechanisms of Adaptation to Hypoxia / L. Lukyanova, E. Germanova, N. Khmil, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2021. – Vol. 22. - № 16. – P. 8636.

247. Ma, J. Effects of permissive hypercapnia on pulmonary and neurodevelopmental sequelae in extremely low birth weight infants: a meta-analysis. / J. Ma, H. Ye. // *Springerplus*. – 2016. - Vol. 5, - №1. – P. 764.

248. Ma, Q. MicroRNA-210 suppresses junction proteins and disrupts blood-brain barrier integrity in neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury. / Q. Ma, C. Dasgupta, Y. Li [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2017. - Vol. 18, - №7. – P. 1356.

249. Ma, Q. MicroRNAs in brain development and cerebrovascular pathophysiology. / Q. Ma, L. Zhang, W.J. Pearce. // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2019. - Vol. 317, - №1. – P. 3-19.

250. Magnon, C. Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1 $\alpha$ -mediated tumor apoptotic switch. / C. Magnon, P. Opolon, M. Ricard [et al.] // *J Clin. Invest*. – 2007. - Vol. 117, - №7. – P. 1844 - 1855.

251. Mahmoud, S. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. / S. Mahmoud, M. Gharagozloo, C. Simard [et al.] // *Cells*. – 2019. - Vol. 8, - №2. – P. 184.

252. Majda, B.T. Suppression subtraction hybridization and Northern analysis reveal upregulation of heat shock, trkB, sodium calcium exchanger genes following global cerebral ischemia in the rat. / B.T. Majda, B.P. Meloni, N. Rixon [et al.] // *Brain Res Mol Brain Res*. – 2001. – Vol. 93, - №2. – P. 173-179.

253. Majid, A. Neuroprotection in stroke: past, present, and future / A. Majid // *ISRN Neurol*. – 2014. - № 2014. - P. 515716.

254. Majid, A. Pathophysiology of ischemic stroke. / A. Majid, D. Zemke, M. Kassab. // In: Basow D, editor. UpToDate. Waltham, Mass, USA: UpToDate. – 2013.
255. Malyshev, I.Y. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia / I.Y. Malyshev, T.A. Zenina, L.Y. Golubeva [et al.] // Nitric Oxide. – 1999. - № 3. - P. 105-113.
256. Manaenko, A. Comparison Evans Blue Injection Routes: Intravenous vs. Intraperitoneal, for Measurement of Blood-Brain Barrier in a Mice Hemorrhage Model. / A. Manaenko, H. Chen, J. Kammer [et al.] // J Neurosci Methods. – 2011. - Vol. 195, - №2. – P. 206-210.
257. Martí Navia, A. Adenosine Receptors as Neuroinflammation Modulators: Role of A1 Agonists and A2A Antagonists. / A. Martí Navia, D. Dal Ben, C. Lambertucci [et al.] // Cells. – 2020. - Vol. 9, - №7. – P. 1739.
258. Marti, H.H. Neuroprotection and angiogenesis: a dual role of erythropoietin in brain ischemia. / H.H. Marti, M. Bernaudin, E. Petit [et al.] // News Physiol Sci. – 2000. - № 15. – P. 225-229.
259. Martire, A. Neuroprotective potential of adenosine A1 receptor partial agonists in experimental models of cerebral ischemia. / A. Martire, C. Lambertucci, R. Pepponi [et al.] // J Neurochem. – 2019. - Vol. 149, - №2. – P. 211-230.
260. Martone, M.E. Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study. / M.E. Martone, Y.Z. Jones, S.J. Young [et al.] // J Neurosci. – 1999 – Vol. 19, - № 6. – P. 1988–1997,
261. Maruoka, N. Hypoxic tolerance induction in rat brain slices following 3-nitropropionic acid pretreatment as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. / N. Maruoka, T. Murata, N. Omata [et al.] // Neurosci Lett. – 2012. - № 319. – P. 83-86.

262. Masada, T. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. / T. Masada, Y. Hua, G. Xi [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2001. - № 21. – P. 22-33.
263. Masada, T. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. / T. Masada, Y. Hua, G. Xi [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2013. - № 21. – P. 22-33.
264. Maslov, L.N. Activation of peripheral  $\delta 2$  opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system. / L.N. Maslov, Y.B. Lishmanov, P.R. Oeltgen [et al.] // Life Sciences. – 2009. - № 84. – P. 657-663.
265. Matsumori, Y. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. / Y. Matsumori, S.M. Hong, K. Aoyama [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2005. - № 25. – P. 899-910.
266. Matsushita, H. Natural and synthetic retinoids afford therapeutic effects on intracerebral hemorrhage in mice. / H. Matsushita, M. Hijioka, A. Hisatsune [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2012. - Vol. 683, - №1–3. – P. 125-131.
267. Maxwell, P.H. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. / P.H. Maxwell, M.S. Wiesener, G-W. Chang [et al.] // Nature. – 1999. - № 399. – P. 271-275.
268. Mayanagi, K. The mitochondrial K(ATP) channel opener BMS-191095 reduces neuronal damage after transient focal cerebral ischemia in rats. / K. Mayanagi, T. Gáspár, P.V. Katakam [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2007. - Vol. 27, - №2. – P. 348-355.
269. McLaughlin, B. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. / B. McLaughlin, K.A. Hartnett, J.A. Erhardt [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. - № 100. – P. 715-720.
270. Melillo, G. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. / G. Melillo, T. Musso, A. Sica [et al.] // J Exp Med. – 1995. - № 182. – P. 1683 - 1693.

271. Meller, R. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. / R. Meller, M. Minami, J.A. Cameron [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2005. - № 25. – P. 234-246.
272. Meng, Q. Protective effects of histone deacetylase inhibition by Scriptaid on brain injury in neonatal rat models of cerebral ischemia and hypoxia. / Q. Meng, G. Yang, Y. Yang [et al.] // Int J Clin Exp Pathol. – 2020. - Vol. 13, - №2. – P. 179-191.
273. Meng, Z.Y. MicroRNA-210 promotes accumulation of neural precursor cells around ischemic foci after cerebral ischemia by regulating the SOCS1-STAT3-VEGF-C pathway. / Z.Y. Meng, H.L. Kang, W. Duan [et al.] // J Am Heart Assoc. – 2018. - Vol. 7, - №5. – P. 005052.
274. Michalski, D. Spatio-temporal course of macrophage-like cell accumulation after experimental embolic stroke depending on treatment with tissue plasminogen activator and its combination with hyperbaric oxygenation. / D. Michalski, M. Heindl, J. Kacza [et al.] // Eur J Histochem. – 2012. - Vol. 56, - №2. – P.14.
275. Mironova, G.D. Functioning of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel in rats varying in their resistance to hypoxia. Involvement of the channel in the process of animal's adaptation to hypoxia. / G.D. Mironova, M.I. Shigaeva, E.N. Gritsenko [et al.] // J Bioenerg Biomembr. – 2010. - Vol. 42, - №6. – P. 473-48.
276. Mohan, S. Involvement of NF-kappaB and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobiloxanthone A. / S. Mohan, S.I. Abdelwahab, B. Kamalidehghan [et al.] // Phytomedicine. – 2012. - Vol. 19, - №11. – P. 1007-1015.
277. Mole, D.R. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. / D.R. Mole, P.H. Maxwell, C.W. Pugh [et al.] // IUBMB Life. – 2001. - № 52. – P. 43-47.
278. Mori, T. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats. / T. Mori, H. Muramatsu, T.

- Matsui [et al.] // Neuropathol Appl Neurobiol. – 2000. - Vol. 26, - №1. – P. 31-40.
279. Moro, M.A. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. / M.A. Moro, A. Almeida, J.P. Bolaños [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2005. - Vol. 39, - №10. – P. 1291-1304.
280. Muñoz, A. Ischemic preconditioning in the hippocampus of a knockout mouse lacking SUR1-based KATP channels. / A. Muñoz, M. Nakazaki, J.C. Goodman [et al.] // Stroke. – 2003. - Vol. 34. – P. 164-170.
281. Muradian, K. "Pull and push back" concepts of longevity and life span extension. / K. Muradian. // Biogerontology. – 2013. - Vol. 14, - №6. – P. 687-691.
282. Murphy, B.J. Regulation of malignant progression by the hypoxia-sensitive transcription factors HIF-1 $\alpha$  and MTF-1. / B.J. Murphy. // Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. – 2004. – Vol. 139, - №3. – P. 495-507.
283. Nagao, A. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. / A. Nagao, M. Kobayashi, S. Koyasu [et al.] // Int J Mol Sci. – 2019. - Vol. 20, - №2. – P. pii: E238
284. Nakagawa, I. Mito KATP-channel opener protects against neuronal death in rat venous ischemia. / I. Nakagawa, B. Alessandri, A. Heimann [et al.] // Neurosurgery. – 2005. – № 57. – P. 334-340.
285. Nakajima, T. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the penumbra region of the rat brain. / T. Nakajima, S. Iwabuchi, H. Miyazaki [et al.] // J Vet Med Sci. – 2004. - № 66. – P. 521-527.
286. Nakata, N. Inhibition of ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody. / N. Nakata, H. Kato, K. Kogure. // Neuroreport. – 1993. - № 4. – P. 695-698.
287. Namura, S. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil. / S. Namura, I. Nagata, H. Kikuchi [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2000. - № 20. – P. 1301-1305.

288. Naylor, M. Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus. / M. Naylor, K.K. Bowen, K.A. Sailor [et al.] // *Neurochem Int.* – 2005. - Vol. 47, - №8. – P. 565-572.
289. Neckár, J. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. / J. Neckár, F. Papousek, O. Nováková [et al.] // *Basic Res Cardiol.* – 2002. - Vol. 97, - №2. – P. 161-167.
290. Nishino, K. Time course and cellular distribution of hsp27 and hsp72 stress protein expression in a quantitative gerbil model of ischemic injury and tolerance: thresholds for hsp72 induction and hilar lesioning in the context of ischemic preconditioning. / K. Nishino, T.S. Jr. Nowak. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2004. - № 24. – P. 167-178.
291. Obrenovitch, T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. / T.P. Obrenovitch. // *Physiol Rev.* – 2008. - Vol. 88, - №1. – P. 211-247.
292. Obrenovitch, T.P. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. / T.P. Obrenovitch, J. Urenjak. // *Prog Neurobiol.* – 1994. - № 51. – P. 39-87.
293. Oda, T. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. / T. Oda, K. Hirota, K. Nishi [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. - № 29. – P. 104 - C113.
294. Ohnishi, M. Sesamin suppresses activation of microglia and p44/42 MAPK pathway, which confers neuroprotection in rat intracerebral hemorrhage. / M. Ohnishi, A. Monda, R. Takemoto [et al.] // *Neuroscience.* – 2012. - № 232. – P. 45-52.
295. Ohta, S. Calcium movement in ischemia-tolerant hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia in gerbils. / S. Ohta, S. Furuta, I. Matsubara [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1996. - Vol. 16, - № 5. – P. 915-922.

296. Ohtaki, H. Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. / H. Ohtaki, T. Fujimoto, T. Sato [et al.] // *Acta Neurochir Suppl.* – 2006. - № 96. – P. 283-287.
297. Oldenburg, O. Mitochondrial KATP channels: role in cardioprotection. / O. Oldenburg, M.V. Cohen, D.M. Yellon [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2002. - № 55. – P. 429-437.
298. Ortega, F.J. ATP-dependent potassium channel blockade strengthens microglial neuroprotection after hypoxia-ischemia in rats. / F.J. Ortega, J. Gimeno-Bayon, J.F. Espinosa-Parrilla [et al.] // *Exp Neurol.* – 2012. - Vol. 235, - №1. – P. 282-296.
299. Ortega, F.J. Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia. / F.J. Ortega, J. Jolkkonen, N. Mahy [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* – 2013. - Vol. 33, - №3. – P. 356-364.
300. Ostergaard, L. Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmatic stress proteins in human endothelial cells. / L. Ostergaard, U. Simonsen, Y. Eskildsen-Helmond [et al.] // *Proteomics.* – 2009. - Vol. 9, - №19. – P. 4457-4467.
301. Palisano, R.J. Content validity of the expanded and revised Gross Motor Function Classification System. / R.J. Palisano, P. Rosenbaum, D. Bartlett [et al.] // *Dev Med Child Neurol.* – 2008. - Vol. 50, - №10. – P. 744-750.
302. Palmer, L.A. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. / L.A. Palmer, G.L. Semenza, M.H. Stoler [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 1998. - № 274. – L212 - L219.
303. Pan, J. MicroRNA-126-3p/-5p overexpression attenuates blood-brain barrier disruption in a mouse model of middle cerebral artery occlusion. / J. Pan, M. Qu, Y. Li [et al.] // *Stroke.* – 2020. - Vol. 51, - №2. – P. 619-627.
304. Parada, E. The microglial  $\alpha 7$ -acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor



- erythroid-2-related factor 2. / E. Parada, J. Egea, I. Buendia [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. - Vol. 19, - №11. – P. 1135-1148.
305. Patten, D.A. Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. / D.A. Patten, V.N. Lafleur, G.A. Robitaille [et al.] // *Mol Biol Cell*. – 2010. - Vol. 21, - №18. – P. 3247-3257.
306. Pavlides, S. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. / S. Pavlides, D. Whitaker-Menezes, R. Castello-Cros. // *Cell Cycle*. – 2009. - № 8. – P. 3984-4001.
307. Pedersen, S.F. Physiology and pathophysiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport in the heart, brain, blood. / S.F. Pedersen, M.E. O'Donnell, S.E. Anderson [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2006. - Vol. 291, - №1. – R1-25.
308. Pérez-Pinzón, M.A. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. / M.A. Pérez-Pinzón, P.L. Mumford, M. Rosenthal [et al.] // *Neuroscience*. – 1996. - Vol. 75, - №3. – P. 687-694.
309. Perez-Pinzon, M.A. Mechanisms of neuroprotection during ischemic preconditioning: lessons from anoxic tolerance. / M. A. Perez-Pinzon. // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. – 2007. - Vol. 147, - №2. – P. 291-299.
310. Pevsner, P.H. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. / P.H. Pevsner, J.W. Eichenbaum, D.C. Miller [et al.] // *J Pharmacol Toxicol Methods*. – 2001. - № 45. – P. 227-233.
311. Pezzuto, A. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. / A. Pezzuto, E. Carico. // *Curr Mol Med*. – 2018. - Vol. 18, - №6. – P. 343-351.
312. Pierre, W.C. Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups. / W.C. Pierre, L.M. Legault, I. Londono [et al.] // *FASEB J*. – 2020. - Vol. 34, - №1. – P. 432-445.
313. Pignataro, G. Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia.

/ G. Pignataro, R. Gala, O. Cuomo [et al.] // *Stroke*. – 2004. - Vol. 35, - №11. – P. 2566-2570.

314. Plotnikov, M.B. Neuroprotective Effects of a Novel Inhibitor of c-Jun N-Terminal Kinase in the Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. / M.B. Plotnikov, G.A. Chernysheva, V.I. Smolyakova [et al.] // *Cells*. – 2020. - Vol. 9, - №8. – P. 1860.

315. Pradillo, J.M. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist reduces ischemic brain damage and inflammation in comorbid rats. / J.M. Pradillo, A. Denes, A.D. Greenhalgh [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. - Vol. 32, - №9. – P. 1810-1819.

316. Proskuryakov, S.Y. Necrosis: a specific form of programmed cell death? / S.Y. Proskuryakov, A.G. Konoplyannikov, V.L. Gabai. // *Exp Cell Res*. – 2003. - № 283. – P. 1–16.

317. Pruimboom, L. Intermittent living: the use of ancient challenges as a vaccine against the deleterious effects of modern life - A hypothesis. / L. Pruimboom, F.A.J. Muskiet. // *Med Hypotheses*. – 2018. – № 120. – P. 28-42.

318. Raeis, V. Central venous hypoxemia is a determinant of human atrial ATP-sensitive potassium channel expression: evidence for a novel hypoxia-inducible factor 1alpha-Forkhead box class O signaling pathway. / V. Raeis, P. Philip-Couderc, A. Roatti [et al.] // *Hypertension*. – 2010. - Vol. 55, - №5. – P. 1186-1192.

319. Raghavendra Rao, V.L. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. / V.L. Raghavendra Rao, K.K. Bowen, V.K. Dhodda [et al.] // *J Neurochem*. – 2002. – № 83. – P. 1072-1086.

320. Rajapakse, N. Diazoxide pretreatment induces delayed preconditioning in astrocytes against oxygen glucose deprivation and hydrogen peroxide-induced toxicity. / N. Rajapakse, B. Kis, T. Horiguchi [et al.] // *J Neurosci Res*. – 2003. - № 73. – P. 206-214.

321. Ravagnan, L. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. / L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S.A. Susin [et al.] // Nat Cell Biol. – 2001. - № 3. – P. 839-843.
322. Rebola, N. Subcellular Localization of Adenosine A(1) Receptors in Nerve Terminals and Synapses of the Rat Hippocampus. / N. Rebola, P.C. Pinheiro, C.R. Oliveira [et al.] // Brain Res. – 2003. - Vol. 987, - №1. – P. 49-58.
323. Riabowol, K.T. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp 70. / K.T. Riabowol, L.A. Mizzen, W.J. Welch. // Science. – 1988. - № 242. – P. 433-436.
324. Rink, C. Micro RNA in ischemic stroke etiology and pathology. / C. Rink, S. Khanna. // Physiol Genomics. – 2017. - Vol. 43, - № 10. – P. 521-528.
325. Ruan, Y.W. Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. / Y.W. Ruan, B. Zou, Y. Fan [et al.] // Neuroscience. – 2006. - № 140. – P. 191-201.
326. Ruchalski, K. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. / K. Ruchalski, H. Mao, Z. Li [et al.] // J Biol Chem. – 2006. - № 281. – P. 7873-7880.
327. Ruchalski, K. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. / K. Ruchalski, H. Mao, Z. Li, Z. Wang [et al.] // J Biol Chem. – 2006. - № 281. – P. 7873-7880.
328. Russell, D.J. Development and validation of item sets to improve efficiency of administration of the 66-item Gross Motor Function Measure in children with cerebral palsy / D.J. Russell, L.M. Avery, S.D. Walter [et al.] // Dev Med Child Neurol. – 2010. - Vol. 52, - №2. – P. 48-54.
329. Russo, V.C. Neuronal protection from glucose deprivation via modulation of glucose transport and inhibition of apoptosis: a role for the insulin-like growth factor system. / V.C. Russo, K. Kobayashi, S. Najdovska [et al.] // Brain Res. – 2004. - Vol. 1009, - №1-2. – P. 40-53.

330. Ruzaeva, V.A. Development of blood-brain barrier under the modulation of HIF activity in astroglial and neuronal cells in vitro. / V.A. Ruzaeva, A.V. Morgun, E.D. Khilazheva [et al.] // *Biomed Khim.* – 2016. - № 62. – P. 664-669.
331. Ryan, H.E. HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. / H.E. Ryan, J. Lo, R.S. Johnson. // *EMBO J.* – 1998. - № 17. – P. 3000-3015.
332. Rybnikova, E. Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre- and postconditioning using hypobaric hypoxia. / E. Rybnikova, M. Samoilov // *Front Neurosci.* – 2015. - № 9. – P. 388.
333. Rybnikova, E. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. / E. Rybnikova, N. Sitnik, T. Gluschenko [et al.] // *Brain Res.* – 2006. - Vol. 1089, - №1. – P. 195-202.
334. Rybnikova, E.A., Intermittent Hypoxic Training as an Effective Tool for Increasing the Adaptive Potential, Endurance and Working Capacity of the Brain / E.A. Rybnikova, N.N. Nalivaeva, M.Y. Zenko [et al.] // *Front Neurosci.* - 2022. - № 16. – P. 941740.
335. Saleh, A. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp 70. / A. Saleh, S.M. Srinivasula, L. Balkir [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2000. - № 2. – P. 476–483.
336. Samoilov, M. Neocortical pCREB and BDNF expression under different modes of hypobaric hypoxia: role in brain hypoxic tolerance in rats. / M. Samoilov, A. Churilova, T. Gluschenko [et al.] // *Acta Histochem.* – 2014. – Vol. 116, - №5. – P. 949-957.
337. Sasaki, N. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. / N. Sasaki, T. Sato, A. Ohler [et al.] // *Circulation.* – 2000. - № 101. – P. 439-445.
338. Sazontova, T.G., Addition of Hyperoxic Component to Adaptation to Hypoxia Prevents Impairments Induced by Low Doses of Toxicants (Free Radical Oxidation and Proteins of HSP Family) / T.G. Sazontova, N.V. Stryapko, Y.V.

- Arkhipenko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2016. - Vol. 160, - № 3. - C. 304-307.
339. Schiene, K. Enlargement of cortical vibrissa representation in the surround of an ischemic cortical lesion. / K. Schiene, J.F. Staiger, C. Bruehl [et al.] // J Neurol Sci. – 1999. - № 162. – P. 6-13.
340. Selfridge, A.C. Hypercapnia Suppresses the HIF-dependent Adaptive Response to Hypoxia. / A.S. Selfridge, M.A. Cavadas, C.C. Scholz [et al.] // J Biol Chem. – 2016. - Vol. 291, - №22. – P. 11800-11808.
341. Semenza G.L. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. / G.L. Semenza. // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 1999. - № 15. – P. 551-578.
342. Semenza, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. / G.L. Semenza, G.L. Wang. // Mol Cell Biol. – 1992. - № 12. – P. 5447-5454.
343. Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. / G.L. Semenza. // Journal of Applied Physiology. – 2000. - Vol. 88, - №4. – P. 1474-1480.
344. Semenza, G.L. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. / G.L. Semenza, Jiang B-H, S.W. Leung [et al.] // J Biol Chem. – 1996. - № 271. – P. 32529-32537.
345. Serebrovskaya, T.V. Intermittent hypoxia in childhood: the harmful consequences versus potential benefits of therapeutic uses. / T.V. Serebrovskaya, L. Xi. // Front Pediatr. – 2015. - Vol. 19, - №3 – P. 44.
346. Serebrovskaya, T.V. Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: Practical analysis on methods and equipment / T.V. Serebrovskaya, L. Xi. // Exp Biol Med (Maywood). – 2016. - Vol. 241, - №15. – P. 1708-1723.

347. Seydyousefi, M. Exogenous adenosine facilitates neuroprotection and functional recovery following cerebral ischemia in rats. / M. Seydyousefi, A.E. Moghanlou, G.A.S. Metz [et al.] // *Brain Res Bull.* – 2019. – №153. – P. 250 - 256.
348. Sharabi, K. Elevated CO<sub>2</sub> levels affect development, motility, and fertility and extend life span in *Caenorhabditis elegans*. / K. Sharabi, A. Hurwitz, A.J. Simon [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. - Vol. 106, - №10. – P. 4024-4029.
349. Sharifi, Z.N. Effects of FK506 on Hippocampal CA1 Cells Following Transient Global Ischemia/Reperfusion in Wistar Rat. / Z.N. Sharifi, F. Abolhassani, M.R. Zarrindast [et al.] // *Stroke Res Treat.* – 2012. - № 2012. – P. 809417.
350. Sharp, F.R. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. / F.R. Sharp, R. Ran, A. Lu [et al.] // *NeuroRx.* – 2004. - Vol. 1, - №1. – P. 26-35.
351. Shatilo, V.B. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men / V. B. Shatilo, O.V. Korkushko, V.A. Ischuk [et al.] // *High Alt. Med. Biol.* – 2008. - Vol. 9, - №1. – P. 43-52.
352. Shen, G. MicroRNAs in the Blood-Brain Barrier in Hypoxic-Ischemic Brain Injury. / G. Shen, Q. Ma. // *Curr Neuropharmacol.* – 2020. - Vol. 18, - №12. – P. 1180-1186.
353. Shi, Y. Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury. / Y. Shi, X. Jiang, L. Zhang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. - Vol. 114, - №7. – P. 1243-1252.
354. Shibata, M. Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. / M. Shibata, T. Yamawaki, T. Sasaki [et al.] // *Brain Res.* – 2002. - № 942. – P. 1-10.
355. Shimazaki, K. Reduced calcium elevation in hippocampal CA1 neurons of ischemia-tolerant gerbils. / K. Shimazaki, T. Nakamura, K. Nakamura [et al.] // *Neuroreport.* – 1998. - Vol. 9, - №8. – P. 1875-1878.

356. Shimizu, K. Mito KATP opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. / K. Shimizu, Z. Lacza, N. Rajapakse [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. - № 283. – P. 1005-1011.
357. Shimizu, S. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. / S. Shimizu, T. Nagayama, K.L. Jin [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* –2001. - № 21. – P. 233-243.
358. Siafakas, N.M. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. / N.M. Siafakas, M. Jordan, H. Wagner [et al.] // *Eur Respir J.* – 2001. - № 17. – P. 681-687.
359. Siegenthaler, J.A. ‘Sealing off the CNS’: cellular and molecular regulation of blood-brain barrierogenesis. / J.A. Siegenthaler, F. Sohet, R. Daneman. // *Curr Opin Neurobiol.* – 2013. - Vol. 23, - №6. – P. 1057-1064.
360. Smith, C.O. The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection. / C.O. Smith, K. Nehrke, P.S. Brookes. // *Biochem J.* – 2017. - Vol. 474, - №12. – P. 2067-2094.
361. Sommer, C. [3H]muscimol binding to  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptors is upregulated in CA1 neurons of the gerbil hippocampus in the ischemia-tolerant state. / C. Sommer, A. Fahrner, M. Kiessling. // *Stroke.* – 2002. - № 33. – P. 1698-1705.
362. Söti, C. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. / C. Söti, E. Nagy, Z. Giricz [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2005. - № 146. – P. 769-780.
363. Stankiewicz, A.R. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. / A.R. Stankiewicz, G. Lachapelle, C.P. Foo [et al.] // *J Biol Chem.* – 2005. - Vol. 280, - №46. – P. 38729-38739.
364. Steel, R. Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. / R. Steel, J.P. Doherty, K. Buzzard [et al.] // *J Biol Chem.* – 2004. - № 279. – P. 51490-51499.
365. Stockwell, J. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. / J. Stockwell, E. Jakova, F.S. Cayabyab. // *Molecules.* – 2017. - Vol. 22, - №4. – P. 676.

366. Stoica, B.A. Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3 $\beta$ , induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. / B.A. Stoica, V.A. Movsesyan, P.M. Lea [et al.] // *Mol Cell Neurosci.* – 2003. - № 22. – P. 365-382.
367. Stroka, D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia / D. Stroka, T. Burkhardt, I. Desbaillets [et al.] // *FASEB J.* – 2001. - № 15. – P. 2445-2453.
368. Sugawa, M. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. / M. Sugawa, Y. Sakurai, Y. Ishikawa-Ieda [et al.] // *Neurosci Res.* – 2002. - № 44. – P. 391-403.
369. Sun, H.S. Neuronal K(ATP) channels mediate hypoxic preconditioning and reduce subsequent neonatal hypoxic-ischemic brain injury. / H.S. Sun, B. Xu, W. Chen [et al.] // *Exp Neurol.* – 2015. - № 263. – P. 161-171.
370. Sun, J. Protective effect of delayed remote limb ischemic postconditioning: role of mitochondrial KATP channels in a rat model of focal cerebral ischemic reperfusion injury / J. Sun, L. Tong, Q. Luan [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2012. - Vol. 32, - №5. – P. 851-859.
371. Sun, X.L. KATP channel openers facilitate glutamate uptake by gluts in rat primary cultured astrocytes. / X.L. Sun, X.N. Zeng, F. Zhou [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* – 2008. - № 33. – P. 1336-1342.
372. Sun, Y. The carboxyl-terminal domain of inducible Hsp70 protects from ischemic injury in vivo and in vitro. / Y. Sun, Y.B. Ouyang, L. Xu [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. - № 26. – P. 937-950.
373. Sun, Y. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, angiogenesis after focal cerebral ischemia. / Y. Sun, K. Jin, L. Xie [et al.] // *J Clin Invest.* – 2003. - № 111. – P. 1843-1851.
374. Szeto, V. The role of KATP channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. / V. Szeto, N.H. Chen, H.S. Sun [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* – 2018. - Vol. 39, - №5. – P. 683-694.



375. Tanaka, H. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. / H. Tanaka, H. Yokota, T. Jover [et al.] // J Neurosci. – 2004. - № 24. – P. 2750-2759.
376. Tao, T. Neuroprotective effects of therapeutic hypercapnia on spatial memory and sensorimotor impairment via anti-apoptotic mechanisms after focal cerebral ischemia/reperfusion. / T. Tao, M. Zhao, W. Yang [et al.] // Neurosci Lett. – 2014. - Vol. 24, - №573. – P. 1-6.
377. Tao, T. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. / T. Tao, Y. Liu, J. Zhang [et al.] // Brain Res. – 2013. - № 1533. – P. 52-62.
378. Tazuke, S.I. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. / S. I. Tazuke, N.M. Mazure, J. Sugawara [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. - № 95. – P. 10188-10193.
379. Teshima, Y. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. / Y. Teshima, M. Akao, R.A. Li [et al.] // Stroke. – 2003. - № 34. – P. 1796-1802.
380. Tetzlaff, W. Synaptic and Extrasynaptic Localization of Adenosine Binding Sites in the Rat Hippocampus. / W. Tetzlaff, P. Schubert [et al.] // Neuroscience. – 1987. - Vol. 21, - №3. – P. 869-875.
381. Tohidpour, A. Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. / A. Tohidpour, A.V. Morgun, E.B. Boitsova [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. – 2017. - № 7. – P. 276.
382. Tomasevic, G. Activation of p53 and its target genes p21(WAF1/Cip1) and PAG608/Wig-1 in ischemic preconditioning. / G. Tomasevic, M. Shamloo, D. Israeli [et al.] // Brain Res. – 1999. - № 70. – P. 304-313.
383. Tornabene, E. Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain

- endothelial cells/astrocyte co-cultures. / E. Tornabene, H.C. Helms, S.F. Pedersen [et al.] // PLoS One. – 2019. - № 14. – P. 0221103.
384. Tran, K.A. Endothelial  $\beta$ -catenin signaling is required for maintaining adult bloodbrain barrier integrity and central nervous system homeostasis. / K.A. Tran, X. Zhang, D. Predescu [et al.] // Circulation. – 2016. - Vol. 133, - №2. – P. 177-186.
385. Tregub, P. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. / P. Tregub, V. Kulikov, Y. Motin [et al.] // J Stroke Cerebrovasc Dis. – 2015. - Vol. 24, - №2. – P. 381-387.
386. Tregub, P. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. / P. Tregub, V. Kulikov, A. Besspalov. // Pathophysiology. – 2013. - Vol. 20, - №3. – P. 165-170.
387. Tureyen, K. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. / K. Tureyen, R. Vemuganti, K.K. Bowen [et al.] // Neurosurgery. – 2005. - № 57. – P. 1254-1263.
388. Uzdensky, A.B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. / A.B. Uzdensky. // Apoptosis. – 2019. - № 24. – P. 687-702.
389. Vannucci, R.C. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. / R.C. Vannucci, J. Towfighi, D.F. Heitjan [et al.] // Pediatrics. – 1995. - № 95. – P. 868-874.
390. Vázquez-Trincado, C. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. / C. Vázquez-Trincado, I. García-Carvajal, C. Pennanen [et al.] // J Physiol. – 2016. - Vol. 594, - №3. – P. 509-525.
391. Vaupel, P. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. / P. Vaupel, A. Mayer. // Cancer Metastasis Rev. – 2007. - Vol. 26, - №2. – P. 225-239.

392. Verdegem, D. Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. / D. Verdegem, S. Moens, P. Stapor [et al.] // *Cancer Metab.* – 2014. - № 2. – P. 19.
393. Vermeulen, T.D. Acute intermittent hypercapnic hypoxia and cerebral neurovascular coupling in males and females. / T.D. Vermeulen, J. Benbaruj, C.V. Brown [et al.] // *Exp Neurol.* – 2020. – № 334. – P. 113441.
394. Vlasov, T.D. Ischemic preconditioning of the rat brain as a method of endothelial protection from ischemic/reperfusion injury. / T.D. Vlasov, D.E. Korzhevskii, E.A. Polyakova. // *Neurosci Behav Physiol.* – 2005. - № 35. – P. 567-572.
395. Von Arnim, C.A. Adenosine receptor up-regulation: initiated upon preconditioning but not upheld. / C.A. Von Arnim, M. Timmler, A.C. Ludolph [et al.] // *Neuroreport.* – 2000. - № 11. – P. 1223-1226.
396. Vucicevic, K. Association of bax expression and Bcl2/Bax ratio with clinical and molecular prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. / K. Vucicevic, V. Jakovljevic, N. Colovic [et al.] // *J. Med. Biochem.* – 2016. - Vol. 35, - №2. – P. 150-157.
397. Wacker, B.K. Junctional protein regulation by sphingosine kinase 2 contributes to blood-brain barrier protection in hypoxic preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance. / B.K. Wacker, A.B. Freie, J.L. Perfater [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2012. - Vol. 32, - №6. – P. 1014-1023.
398. Wali, B. Glibenclamide administration attenuates infarct volume, hemispheric swelling, and functional impairments following permanent focal cerebral ischemia in rats. / B. Wali, T. Ishrat, F. Atif [et al.] // *Stroke Research and Treatment.* – 2012. - № 6. – P. 460909.
399. Wan, Y. MicroRNA-149-5p regulates bloodbrain barrier permeability after transient middle cerebral artery occlusion in rats by targeting S1PR2 of pericytes. / Y. Wan, H.J. Jin, Y.Y. Zhu YY [et al.] // *FASEB J.* – 2018. - Vol. 32, - №6. – P. 3133-3148.

400. Wang, G.L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. / G.L. Wang, G.L. Semenza. // *Blood*. – 1993. - № 82. – P. 3610-3615.
401. Wang, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. / G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. - Vol. 92, - №12. – P. 5510-5514.
402. Wang, L. The protective roles of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during hypoxia-ischemia-reperfusion in brain. / L. Wang, Q.L. Zhu, G.Z. Wang [et al.] // *Neurosci Lett*. – 2011. - Vol. 491, - №1. – P. 63-67.
403. Wang, Y. MicroRNA-130a regulates cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability by targeting Homeobox A5. / Y. Wang, M.D. Wang, Y.P. Xia [et al.] // *FASEB J*. – 2018. - Vol. 32, - №2. – P. 935-944.
404. Welch, J.F. Intermittent hypercapnic hypoxia: a model to study human respiratory motor plasticity? / J.F. Welch. // *J Physiol*. – 2021. - Vol. 599, - №7. – P. 1951-1953.
405. Whitehead, C.L. Circulating MicroRNAs in maternal blood as potential biomarkers for fetal hypoxia in-utero. / C.L. Whitehead, W.T. Teh, S.P. Walker [et al.] // *PLoS One*. – 2018. - Vol. 8, - №11. – P. 78487.
406. Wood, S.M. Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -subunit (HIF-1 $\alpha$ ): characterization of HIF-1 $\alpha$ -dependent and independent hypoxia-inducible gene expression. / S.M. Wood, M.S. Wiesener, K.M. Yeates [et al.] // *J Biol Chem*. – 1998. - № 273. – P. 8360-8368.
407. Wu, L.Y. Involvement of increased stability of mitochondrial membrane potential and overexpression of Bcl-2 in enhanced anoxic tolerance induced by hypoxic preconditioning in cultured hypothalamic neurons. / L.Y. Wu, A.S. Ding, T. Zhao [et al.] // *Brain Res*. – 2004. - № 999. – P. 149-154.

408. Xie, Y. Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal  $\text{Ca}^{2+}$  overload injury. / Y. Xie, W.Z. Zhu, Y. Zhu [et al.] // Life Sci. – 2004. - Vol. 76, - № 5. – P. 559-572.
409. Xu, J. Normoxic induction of cerebral HIF-1 by acetazolamide in rats: Role of acidosis. / J. Xu, Z. Peng, R. Li [et al.] // Neurosci Lett. – 2009. - № 451. – P. 274-278.
410. Xu, L. Geldanamycin reduces necrotic and apoptotic injury due to oxygen-glucose deprivation in astrocytes. / L. Xu, Y.B. Ouyang, R.G. Giffard. // Neurol Res. – 2003. - № 25. - P. 697-700.
411. Xu, L. HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury. / L. Xu, R.G. Giffard. // Neurosci Lett. – 1997. - № 224. – P. 9-12.
412. Xu, Y. Quantifying blood-brain-barrier leakage using a combination of evans blue and high molecular weight FITC-Dextran. / Y. Xu, Q. He, M. Wang [et al.] // J Neurosci Methods. – 2019. - № 325. – P. 108349.
413. Yabe, K. Hypoxic preconditioning in isolated rat hearts: non-involvement of activation of adenosine A1 receptor, Gi protein, and ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel. / K. Yabe, Y. Nasa, S. Takeo. // Heart Vessels. – 1995. - Vol. 10, - №6. – P. 294-303.
414. Yaglom, J.A. Regulation of necrosis of H9c2 myogenic cells upon transient energy deprivation. Rapid deenergization of mitochondria precedes necrosis and is controlled by reactive oxygen species, stress kinase JNK, HSP72 and ARC. / J.A. Yaglom, D. Ekhterae, V.L. Gabai [et al.] // J Biol Chem. – 2003. - № 278. – P. 50483-50496.
415. Yamada, T. Nitric oxide produced during sublethal ischemia is crucial for the preconditioning-induced down-regulation of glutamate transporter GLT-1 in neuron/astrocyte co-cultures. / T. Yamada, K. Kawahara, T. Kosugi [et al.] // Neurochem Res. – 2006. - № 31. – P. 49-56.
416. Yamaguchi, A. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. / A. Yamaguchi, M. Tamatani, H. Matsuzaki [et al.] // J Biol Chem. – 2001. - № 276. – P. 5256-5264.

417. Yan, G. Application of Real-Time Cell Electronic Analysis System in Modern Pharmaceutical Evaluation and Analysis. / G. Yan, Q. Du, X. Wei [et al.] // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, - №12. – P. 3280.
418. Yang, C.C. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling. / C.C. Yang, L.C. Lin, M.S. Wu [et al.] // *Transplantation*. – 2009. - Vol. 88. – P. 1251-1260.
419. Yang, W. Effects of acute systemic hypoxia and hypercapnia on brain damage in a rat model of hypoxia-ischemia. / W. Yang, X. Zhang, N. Wang [et al.] // *PLoS One*. – 2016. - Vol. 11: e0167359.
420. Yang, W. Therapeutic hypercapnia reduces blood–brain barrier damage possibly via protein kinase C $\epsilon$  in rats with lateral fluid percussion injury. / W. Yang, Q. Wang, L. Chi [et al.] // *J Neuroinflammation*. – 2019. - Vol. 16. – P. 36.
421. Yang, Y. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. / Y. Yang, E.Y. Estrada, J.F. Thompson [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2017. - № 27. – P. 697-709.
422. Yano, S. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. / S. Yano, M. Morioka, K. Fukunaga [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2001. - № 21. – P. 351-360.
423. Yao, B. Unlocking epigenetic codes in neurogenesis. / B. Yao, P. Jin. // *Genes Dev*. – 2014. - Vol. 28, - №12. – P. 1253-1271.
424. Yao, X. microRNA-21 confers neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury and alleviates blood-brain barrier disruption in rats via the MAPK signaling pathway. / X. Yao, Y. Wang, D. Zhang. // *J Mol Neurosci*. – 2018. - Vol. 65, - №1. – P. 43-53.
425. Yatsenko, K.V. Effects of intermittent normobaric hypoxia on the state of the CNS and cerebral circulation in children with cerebral palsy / K.V. Yatsenko, V.A. Berezovskii, J.V. Deyeva. // *Fiziol Zh*. – 2012. - Vol. 58, - №3. – P. 77-84.

426. Yellon, D.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. / D.M. Yellon, J.M. Downey. // *Physiol Rev.* – 2003. - Vol. 83, - №4. – P. 1113-1151.
427. Yeom, C.J. LY6E: A conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis / C.J. Yeom, L. Zeng, Y. Goto [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. - Vol. 7, - №40. – P. 65837-65848.
428. Yin, K.J. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. / K.J. Yin, Z. Deng, M. Hamblin [et al.] // *J Neurosci.* – 2018. - Vol. 30, - №18. – P. 6398-6408.
429. Yoon, D. Hypoxia-inducible factor 1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. / D. Yoon, Y.D. Pastore, V. Divoky [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. - № 281. – P. 25703-25711.
430. Zaccagnini, G. miR-210 hypoxamiR in Angiogenesis and Diabetes. / G. Zaccagnini, S. Greco, C. Voellenkle [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2022. - Vol. 36, - №10-12. – P. 685-706
431. Zahler, S. Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF- $\alpha$ . / S. Zahler, C. Kupatt, B.F. Becker. // *FASEB J.* – 2000. - № 14. – P. 555-564.
432. Zakyntinos, S. Antioxidants increase the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. / S. Zakyntinos, P. Katsaounou, M.H. Karatza [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2007. - Vol. 175, - №1. – P. 62-68.
433. Zhan, L. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic preconditioning in adult rats. / L. Zhan, T. Wang, W. Li [et al.] // *J Neurochem.* – 2010. - Vol. 114, - №3. – P. 897-908.
434. Zhang, D. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. / D. Zhang, Y. Chen, W. Campbell [et al.] // *Circ. Res.* – 2001. - № 89. – P. 1177-1173.

435. Zhang, F.Y. Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. / F.Y. Zhang, X.C. Chen, H.M. Ren [et al.] // *Neurol Res.* – 2006. - № 28. – P. 21-24.
436. Zhang, K. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response / K. Zhang, R.J. Kaufman. // *Nature.* – 2008. - № 454. – P. 455-462.
437. Zhang, S. Chronic intermittent hyobaric hypoxia protects against cerebral ischemia via modulation of mitoKATP. / S. Zhang, Z. Guo, S. Yang [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2016. - Vol. 2, - №635. – P. 8-16.
438. Zhang, W. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. / W. Zhang, C. Smith, A. Shapiro [et al.] // *J Neuroimmunol.* – 1999. - № 101. – P. 148-160.
439. Zhang, W.L. Changes of adenosine and its A(1) receptor in hypoxic preconditioning. / W.L. Zhang, G.W. Lu. // *Biol Signals Recept.* – 1999. - Vol. 8, - №4-5. – P. 275-280.
440. Zhang, Y. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice. / Y. Zhang, X. Yang, X. Ge [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2019. - № 109. – P. 726-733.
441. Zhang, Y.B. The effects of CoCl<sub>2</sub> on HIF-1 $\alpha$  protein under experimental conditions of autoprogressive hypoxia using mouse models / Y.B. Zhang, X. Wang, E.A. Meister [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2014. - Vol. 15, - №6. – P. 10999-11012.
442. Zhao, B.Q. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. / B.Q. Zhao, S. Wang, H.Y. Kim [et al.] // *Nat Med.* – 2006. - № 12. – P. 441-445.
443. Zhao, H. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. / H. Zhao, R.M. Sapolsky, G.K. Steinberg [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2006. - Vol. 34, - №3. – P. 249-270.



444. Zhao, Y.D. Effect of hypobaric hypoxia on the P2X receptors of pyramidal cells in the immature rat hippocampus CA1 sub-field / Y.D. Zhao, S.Y. Cheng, S. Ou [et al.] // *Brain Inj.* – 2012. - Vol. 26, - №3. – P. 282-290.
445. Zhao, Z.S. Catecholic iron complexes as cytoprotective superoxide scavengers against hypoxia: reoxygenation injury in isolated hepatocytes. / Z.S. Zhao, S. Khan, P.J. O'Brien. // *Biochem Pharmacol.* – 1998. - Vol. 56, - №7. – P. 825-830.
446. Zheng, Z. The application of HSP70 as a target for gene therapy. / Z. Zheng, M.A. Yenari. // *Front Biosci.* – 2006. - № 11. – P. 699-707.
447. Zhong, H. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. / H. Zhong, A.M. De Marzo, E. Laughner [et al.] // *Cancer Research.* – 1999. - Vol. 59, - №22. – P. 5830-5835.
448. Zhou Q., c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. / Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E // *J Neurochem.* - 2008, - Vol. 104, - №2. – P. 325-335.
449. Zhou, A.M. A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. / A.M. Zhou, W.B. Li, Q.J. Li [et al.] // *Neurosci Res.* – 2004. - Vol. 48, - №4. – P. 397-404.
450. Zhou, Q. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia–reperfusion injury in rats. / Q. Zhou, B. Cao, L. Niu [et al.] // *Anesthesiology.* – 2010. - № 112. – P. 288-297.
451. Zhou, S.G. Effects of hypoxic preconditioning on the adhesion of neutrophils to vascular endothelial cells induced by hypoxia/reoxygenation. / S.G. Zhou, X.Y. Lei, D.F. Liao. // *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* – 2003. - № 15. – P. 159-162.
452. Zhou, S.G. Effects of hypoxic preconditioning on the adhesion of neutrophils to vascular endothelial cells induced by hypoxia/reoxygenation. / S.G. Zhou, X.Y. Lei, D.F. Liao. // *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* – 2013. - № 15. – P. 159-162.

453. Zhou, W. Hypercapnia and hypocapnia in neonates. / W. Zhou, W. Liu W. // World J Pediatr. – 2008. - Vol. 4, - №3. – P. 192-196.
454. Zhu, H.C. Inhibition of caspase-3 activation and apoptosis is involved in 3-nitropropionic acid-induced ischemic tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. / H.C. Zhu, X.Q. Gao, Y. Xing [et al.] // J Mol Neurosci. – 2004. - № 24. – P. 299-305.
455. Zhu, Y. Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. / Y. Zhu, K. Saito, Y. Murakami [et al.] // Neurosci Lett. – 2006. - № 393. – P. 122-126.
456. Ziring, P.R. American Academy of Pediatrics. Committee on Children with Disabilities. The treatment of neurologically impaired children using patterning. / P.R. Ziring, D. brazdziunas, W.C. Cooley [et al.] // Pediatrics. – 1999. - № 104, - №5. – P. 1149-1151.
457. Zubakov, D. Late ischemic preconditioning of the myocardium alters the expression of genes involved in inflammatory response. / D. Zubakov, J.D. Hoheisel, F.W. Kluxen [et al.] // FEBS Lett. – 2003. - № 547. – P. 51-55.