

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Алтайский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Трегуб Павел Павлович

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО
И ИЗОЛИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПЕРКАПНИИ
И ГИПОКСИИ**

14.03.03. - патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Куликов В.П.

ТОМСК– 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Использование гипоксии для повышения толерантности органов и тканей к ишемии/гипоксии	13
1.2. Применение гиперкапнических воздействий в качестве нейропротектора и терапевтического средства при ишемически-реперфузионном повреждении	17
1.3. Эффективность гиперкапнической гипоксии для увеличения толерантности органов и тканей к ишемии/гипоксии	22
1.4. Основные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга	25
Глава 2. Материалы и методы исследования	31
2.1. Материал и объект исследования	31
2.2. Методика сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и гипоксии	31
2.3. Методика моделирования фокальной и субтотальной ишемии головного мозга у крыс	33
2.4. Метод моделирования острой гипобарической гипоксии	34
2.5. Методика моделирования острой нормобарической гипоксии	36
2.6. Методика оценки неврологического дефицита и двигательного- координационных нарушений	36
2.7. Методика гистологического исследования препаратов головного мозга	37
2.8. Методика определения содержания HSP-70 и S-100 β в сыворотке крови у крыс	38
2.9. Исследование роли мито- K^{+}_{ATP} -каналов и аденозиновых A_1 -рецепторов методом применения активатора/блокатора механизма	39
2.10. Статистическая обработка экспериментальных данных	39
2.11. Дизайн экспериментального исследования эффективности изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии в повышении резистентности к острому дефициту кислорода и ишемии головного мозга	40

2.12. Дизайн экспериментального исследования механизмов, увеличивающих толерантность головного мозга к ишемии/гипоксии, при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии	42
Глава 3. Результаты собственных исследований	45
3.1. Эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии в повышении резистентности к острому дефициту кислорода	45
3.2. Нейропротекторная эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии при ишемии головного мозга	50
3.3. Участие протекторных белков HSP-70 и S-100 β в механизме формирования ишемической толерантности головного мозга при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии	59
3.4. Роль митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и A ₁ -рецепторов к аденозину в механизме нейропротекции при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии	62
Глава 4. Обсуждение результатов	66
4.1. Резистентность к острому дефициту кислорода у крыс после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии	66
4.2. Формирование ишемической толерантности головного мозга крыс после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии	69
4.3. Механизмы формирования толерантности головного мозга крыс к гипоксии/ишемии после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии	76
Выводы	81
Список сокращений	82
Список литературы	83

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Гипоксия является эффективным средством повышения толерантности органов и тканей к острому дефициту кислорода и ишемии [Agadzhanyan N.A. et al., 2009]. Однако недостатком гипоксических воздействий является необходимость длительной экспозиции (1-6 часов) и большого количества сеансов (не менее 7 раз) [Neckar J. et al., 2009; Yang C.C. et al., 2009], что малоперспективно для клинического применения. Поэтому актуальной научной задачей является повышение эффективности использования гипоксии для профилактики и лечения гипоксических и ишемических повреждений.

Имеются данные, свидетельствующие о протекторном потенциале гиперкапнического воздействия на нервную ткань. Доказано, что углекислый газ эффективен для нейропротекции при гипоксическом/ишемическом повреждении головного мозга [Vannucci R.C. et al., 1995]. В 2010 году был показан терапевтический эффект перmissive гиперкапнии при экспериментальном ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга [Zhou Q. et al., 2010; Tao T. et al., 2013].

Существует ряд работ, демонстрирующих, что протекторная эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии значительно больше по сравнению с изолированной гипоксией. Это было показано в отношении кардиопротекторного эффекта [Зверькова Е.Е., 1980; 1982] и формирования ишемической толерантности головного мозга [Беспалов А.Г. и соавт., 2004; Куликов В.П. и соавт., 2009].

В то же время в литературе не представлено исследований, посвященных сравнительному изучению эффективности изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для увеличения резистентности к острой гипоксии, а также формирования ишемической

толерантности головного мозга. Это же касается работ, посвященных изучению механизмов нейропротекции при воздействии гиперкапнической гипоксии.

Одними из вероятных нейропротекторных механизмов сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии могут быть: активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и A_1 -рецепторов к аденозину, являющихся важнейшими звеньями в феномене гипоксического/ишемического прекондиционирования мозга [Heurteaux C. et al., 1995; Blondeau N. et al., 2000], повышение экспрессии шаперона HSP-70, индуцируемое после гипоксического воздействия [Lin H.J. et al., 2011] и белка S-100 β – нейротрофического фактора и клинического маркера повреждения нервной ткани [Kleindienst A. Et al., 2004].

Степень разработанности

В литературе представлено значительное количество публикаций, посвященных толерантности мозга к действию повреждающих факторов после гипоксического прекондиционирования и тренировок [Miller B. et al., 2001; Архипенко Ю.В. и соавт., 2005; Lukianova L.D. et al., 2011]. При этом доказано, что важнейшими механизмами увеличения ишемической толерантности мозга являются такие, как ингибирование апоптоза [Fremont M. et al., 2006], активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов [Mayanagi K. et al., 2007] и A_1 -рецепторов к аденозину [Neckar J. et al., 2002], усиление экспрессии редокс-чувствительного белка HIF-1 α [Lukianova L.D., 2011] и стимуляция ангиогенеза [Siafakas N.M. et al., 2001].

В последнее время появился ряд работ, демонстрирующих терапевтическую эффективность пермиссивной гиперкапнии и протекторное действие CO_2 на головной мозг при гипоксическом/ишемическом повреждении [Vannucci R.C. et al., 1995; Zhou Q. et al., 2010]. Было показано, что важную роль в этом эффекте играет процесс ингибирования апоптоза в

нервных клетках [Zhou Q. et al., 2010], стимулирование ангиогенеза [Chuang I.C. et al., 2010] и активация митоK⁺_{АТФ}-каналов [Lindauer U. et al., 2003].

При этом в литературе сравнительно мало публикаций, касающихся исследования сочетанной эффективности гипоксии и гиперкапнии. Было показано, что устойчивость к экстремальному дефициту кислорода повышается более выражено при сочетании гипоксии и гиперкапнии, чем при аналогичных воздействиях изолированной гипоксии [Зверькова Е.Е., 1980; 1982]. Также было установлено, что предварительное курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии индуцирует нейропротекцию при тотальной [Беспалов А.Г. и соавт., 2004] и субтотальной [Куликов В.П. и соавт., 2009] ишемии головного мозга.

Таким образом, в рамках изучения феномена ишемической толерантности важной научной задачей является сравнение эффективности изолированной гипоксии и гиперкапнии по отношению к их сочетанному воздействию, а также определение механизмов потенцирования их эффектов.

Всё вышеизложенное предопределило цель настоящего исследования.

Цель исследования

Сравнить эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для формирования ишемической толерантности головного мозга и установить важные нейропротекторные механизмы сочетания этих факторов.

Задачи исследования

1. Сравнить эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для повышения резистентности к острому дефициту кислорода и изучить зависимость эффекта от кратности сеансов воздействия.

2. Сравнить нейропротекторную эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии.
3. Определить роль протекторных белков HSP-70 и S-100 β в механизме формирования ишемической толерантности головного мозга после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.
4. Установить роль митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и A₁-рецепторов к аденозину в механизме нейропротекции после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.

Научная новизна

Установлено, что гиперкапническая гипоксия наиболее эффективно повышает резистентность к острой гипоксии и толерантность мозга к ишемии по сравнению с нормобарической гипоксией и перmissiveй гиперкапнией, а увеличение кратности воздействий сопровождается пропорциональным увеличением резистентности. При этом эффективность перmissiveй гиперкапнии для повышения резистентности к острому дефициту кислорода при любой кратности воздействия значительно выше эффективности нормобарической гипоксии.

Установлено, что повышение экспрессии шаперона HSP-70, увеличение синтеза белка S-100 β , активация A₁-аденозиновых рецепторов и митохондриальных АТФ-зависимых K⁺-каналов являются важными механизмами нейропротекторных эффектов при воздействии гиперкапнической гипоксии.

Теоретическая значимость и практическая значимость

Результаты проведенного исследования, продемонстрировавшие максимальную нейропротекторную эффективность сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии по сравнению с их изолированным применением,

расширяют представления о влиянии на организм респираторных воздействий, изменяющих газовый гомеостаз и обеспечивающих различные комбинации гипоксии и гиперкапнии. Эксперименты, показавшие активацию АТФ-зависимых калиевых каналов и A_1 -рецепторов к аденозину при гиперкапнически-гипоксическом воздействии, вносят значительный вклад в фундаментальные представления о механизмах нейропротекторной эффективности сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.

Установленный в диссертационной работе факт максимальной нейропротекторной эффективности сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии, по сравнению с их изолированным воздействием, создает основу для разработки эффективных методов дыхательных тренировок для повышения неспецифической резистентности организма и формирования ишемической толерантности головного мозга.

Экспериментальные данные об участии АТФ-зависимых калиевых каналов и аденозина в механизме формирования ишемической толерантности мозга при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии создают основу для разработки метода фармакологического потенцирования нейропротекторной эффективности гиперкапнической гипоксии путем использования препаратов, воздействующих на мито K^+ _{АТФ}-каналы и аденозиновые A_1 -рецепторы.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования послужил диалектический метод, базирующийся на системном подходе в изучении функционирования живого организма. Были использованы теоретико-эмпирические общенаучные методы: анализа и синтеза, индукции и дедукции, моделирования, научной абстракции, а также метод статистической обработки. Из методов естественнонаучных исследований

применялись наблюдение, измерение, эксперимент и сравнение. Были использованы специальные методы гистологической обработки нервной ткани, ее окраски и морфометрии, а также специфические лабораторные методы серологической диагностики.

Положения, выносимые на защиту

1. Сочетание гипоксии и гиперкапнии в предварительных респираторных воздействиях обладает максимальной эффективностью для повышения резистентности к острой гипобарической гипоксии и формирования ишемической толерантности головного мозга, по сравнению с их изолированным воздействием в эквивалентных концентрациях кислорода и углекислого газа.

2. Сочетание умеренной гипоксии и гиперкапнии, в отличие от их изолированного применения, уже после однократного воздействия увеличивает резистентность к острой гипобарической гипоксии, а эффективность пермиссивной гиперкапнии при любой кратности использования превосходит эффективность нормобарической гипоксии.

3. Важными механизмами повышения толерантности головного мозга к ишемии/гипоксии при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии являются: повышение синтеза HSP-70 и S-100 β , активация митохондриальных АТФ-зависимых K⁺-каналов и аденозиновых A₁-рецепторов.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на VI Всероссийской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (г. Москва, 2011 год); на конференциях, посвященных Дню науки в Алтайском государственном медицинском университете (г. Барнаул, 2012-2015 гг.); на городских научно-практических

конференциях молодых ученых «Молодежь – Барнаулу» (г. Барнаул, 2012-2013 гг.); на VII Сибирском физиологическом съезде (г. Красноярск, 25-27.06.2012 г.); на Юбилейной XX всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 7-8.04.2014 г.); на I Международном конгрессе по нейронаукам (г. Красноярск, 10-12.06.2014 г.).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования, показавшие максимальную эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии для увеличения ишемической толерантности мозга, стали основой для разработки методики применения гиперкапнически-гипоксических дыхательных тренировок на базе КГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» г. Барнаула у детей с неврологическими нарушениями и используются в учебном процессе в рамках изучения патофизиологии (разделы «Гипоксия и дискапния» и «Нарушения регионарного кровообращения») на базе кафедры патофизиологии, клинической патофизиологии с курсом ФПК и ППС ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 2 статьи – в зарубежных научных журналах, индексируемых базами «Web of Science» и «Scopus».

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 106 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования,

4 разделов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками. Библиографический указатель включает 214 источников (41 – на русском и 173 – на английском языках).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнены все экспериментальные исследования, проведены статистическая обработка, анализ и обобщение полученных данных, сформулированы научная новизна, положения и выводы по диссертации.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения, в частности, инфаркт миокарда и инсульт, являются основными причинами смертности и инвалидизации населения [Гусев Е.И. и соавт., 2001, 2007; Липовецкий Б.М., 2007; Шахпаронова Н.В. и соавт., 2008]. Что делает особенно актуальным вопрос о поиске эффективных способов кардио- и нейропротекции, среди которых в последние два десятилетия активно рассматриваются гипоксическое прекондиционирование и гипоксические тренировки [Лукьянова Л.Д. и соавт., 2004; Manukhina E. V. et al., 2006; Steiger H.J. et al., 2007], позволяющие повысить ишемическую толерантность органа в относительно короткие сроки, без медикаментозного вмешательства и инвазий.

В основе патогенеза ишемии находится два сопутствующих фактора: дефицит кислорода (гипоксия) и избыток углекислоты (гиперкапния). Исследованию эффектов этих факторов посвящены многочисленные научные работы, демонстрирующие высокую активность их воздействия на системы органов, ткани и клетки организма [Reddy G. et al., 1974; Косицкий Г.И., 1993; Edmunds N. et al., 2009].

Гипоксия и гиперкапния в медико-биологических системах крайне редко встречаются в изолированных друг от друга формах. Поэтому они рассматриваются медициной, с одной стороны, как важнейшие звенья патогенеза сердечно-сосудистых, дыхательных и неврологических заболеваний [Kwasiborski P.J. et al., 2012; Douglas R.M. et al., 2013; Back S.A., 2015; Wilson M.H. et al., 2015; Campochiaro P.A. 2015; Lyons O.D. et al., 2015], а с другой стороны, как перспективные средства профилактики и лечения этих патологий [Miliaru M. et al., 2003; Агаджанян Н.И. и соавт., 2004].

Настоящий литературный обзор направлен на анализ и систематизацию существующих научных данных о применении и механизмах гипоксии и гиперкапнии в качестве нейропротекторных средств.

1.1 Использование гипоксии для повышения толерантности головного мозга к ишемии/гипоксии

Гипоксия – авторитетный способ повышения неспецифической резистентности организма [Agadzhanyan N.A. et al., 1984; Meerson F.Z. et al., 1987]. В современной литературе принято разделять термины «гипоксическое прекондиционирование» и «гипоксические тренировки» по принципу длительности воздействия (1 сутки и более 1-х суток, соответственно) и времени до наступления ишемического повреждения (до 24 часов и более 24 часов, соответственно) [Neckar J. et al., 2002; Bemaudin M., et al., 2004; Глазачев О.С. и соавт., 2008; Маслов Л.Н., 2011].

Впервые эффект гипоксического прекондиционирования головного мозга на новорожденных крысах показал Gidday et al. [1994]. В исследовании Miller V. et al. [2001] было показано, что гипоксическое прекондиционирование в эксперименте снижало площадь инфаркта мозга при окклюзии средней мозговой артерии на 64%. Согласно данным [Y. Feng et al., 2010], гипоксическое прекондиционирование в головном мозге обеспечивает уменьшение размера очага некроза в 5 раз при моделировании экспериментального ишемического повреждения. Также нейропротекторный эффект кратковременной тяжелой гипоксии продемонстрирован на переживающих ишемию срезах мозга [Семенов Д.Г. и соавт., 2004] и при острых нарушениях церебрального кровообращения геморрагического типа [Самойлов М.О., 2001; Ran R., 2005; Крушинский А.Л., 2007]. В исследовании Zhao T. et al. [2000] показано, что предварительные гипоксические воздействия лабораторных крыс повышают толерантность к

ишемии нейронов из региона СА-1 в гиппокампе за счет увеличения диаметра и количества функционирующих сосудов.

Нейропротекторный эффект гипоксических тренировок впервые установлен в экспериментах из области авиакосмической медицины [Агаджанян Н.А. и соавт., 1973; Блинков Н.А. и соавт., 1974]. В серии этих исследований было показано, что кратковременное воздействие умеренной гипоксии оказывает протекторный эффект при острых нарушениях церебральной гемодинамики. Позже эти данные были подтверждены в других работах [Кошелев В.Б., 1987; Крушинский А.Л., 2001; Miller В.А., 2001]. Показано, что 30-дневное воздействие гипоксии ограничивает частоту возникновения кистозного инфаркта в головном мозге, связанного с пережатием общей сонной артерии у крыс [Vannucci R. et al., 2004].

В работе Портниченко А.Г. [2008] нейропротекторный эффект проявлялся немедленно после воздействия 4-х сеансов гипоксии-реоксигенации, поэтому в данном случае следует говорить о раннем гипоксическом прекондиционировании. Большинство других исследователей изучали нейропротекторный эффект гипоксического прекондиционирования спустя 24 часа после воздействия [Xi L. et al., 2002; Bemaudin M. et al., 2004; Beguin P.C. et al., 2005].

В клинической практике гипоксическое прекондиционирование применялось Емельяновой Т.В., Подоксеновым Ю.К. и Шишневой Е.В. [2008, 2009, 2010], в ряде работ был выявлен кардиопротекторный и нейропротекторный эффект гипоксического прекондиционирования. Гипоксическое прекондиционирование воспроизводили следующим образом: до начала глобальной ишемии сердца в течение 10 мин в оксигенатор подавали газовую смесь со сниженным до 10-12% содержанием O_2 , а затем проводили 5-минутную реоксигенацию. Они наблюдали снижение уровня концентрации креатинфосфокиназы (КФК), КФК-МВ и тропонина I в плазме крови в постреперфузионном и раннем послеоперационном периодах, а также снижение уровня белка астроцитарной глии S-100 β . Кроме того, было

показано, что гипоксическое прекондиционирование улучшает насосную функцию сердца в реперфузионном периоде и предупреждает появление когнитивной дисфункции.

Китайские исследователи [Zhan L. et al., 2010] воспроизводили ГП у крыс, помещая животных в атмосферу 8% O₂ на 30 мин, 60 мин, 120 мин, 180 мин. Через 1, 2, 3, 4 и 5 суток моделировали ишемию мозга. Через 2 суток после ГП оказалось, что наиболее выраженный нейропротекторный эффект оказывало 30-минутное прекондиционирование, а 3-часовое ГП не влияло на устойчивость мозга к гипоксии. Цитопротекторный эффект 30-минутного ГП был максимален через сутки после воздействия гипоксии, через 4 дня этот эффект был минимальным, а через 5 суток его не удавалось выявить.

Многие исследования эффективности гипоксических тренировок посвящены интервальному гипоксическому воздействию [Neckar J. et al., 2002; Shatilo V.V. et al., 2008; Goryacheva A.V. et al., 2010]. Имеются работы, в которых продемонстрирована эффективность коротких 12-минутных и 3-минутных эпизодов аноксии, проводимых 4-кратно и 3-кратно, с интервалом 10 минут [Кулинский В.И. и соавт., 2006; Годухин О.В. и соавт., 2009].

Описана сравнительная эффективность различной кратности сеансов интервальной гипоксии [Lukyanova L.D. et al., 2009]. При этом общим недостатком гипоксических воздействий является необходимость длительной экспозиции и большого количества сеансов, как правило, 1-15-часовое гипоксическое воздействие с кратностью сеансов не менее 7 раз [Neckar J. et al., 2002; Chen W.J. et al., 2005; Lukyanova L.D. et al., 2009; Yang C.C. et al., 2009].

Адаптация к гипоксии в литературе подразделяется на две стадии: фазу индукции адаптации (от нескольких минут до 24 часов) и фазу формирования геном-зависимых реакций долгосрочной адаптации (более суток), которые отличаются механизмами формирования [Лукьянова Л.Д. и соавт., 2011, Маслов Л.Н. 2011]. По мнению авторов, фаза индукции адаптации – это период генерализованного ответа на первое действие раздражителя,

включающий как неспецифическую стресс-реакцию (активацию адренергической и гипофизарно-адреналовой систем), так и мобилизацию специфических для гипоксии срочных компенсаторных реакций. Отсроченная или долговременная адаптация формируется при длительном или многократном гипоксическом воздействии на организм. Она сопровождается экспрессией мРНК, специфических белков и генов и характеризуется переходом на новый уровень регуляции кислородного гомеостаза.

Известно, что гипоксическое прекондиционирование и гипоксические тренировки вызывают нейропротекторный эффект, воздействуя на сходные механизмы с разной интенсивностью [Bernaudin, et al., 2004]. Это дает возможность для их отождествления при объяснении протекторных эффектов гипоксического воздействия.

Ведущая роль в нейропротекции и повышении толерантности головного мозга к ишемии при гипоксическом прекондиционировании принадлежит аденозину, который активирует АТФ-зависимые калиевые каналы [Kulinskii V.I. et al., 2006], снижает передачу возбуждения в синапсах, сдвигая равновесие в сторону торможения [Pile A. et al., 2006]. Активация A_1 -рецепторов к аденозину полностью воспроизводит защитный эффект прекондиционирования [Yellon D.M. et al., 2003].

В свою очередь, конечным эффектором гипоксического прекондиционирования являются митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы [Seubert J. et al., 2004; Mayanagi K. et al., 2007]. Имеются многочисленные доказательства, что фармакологическое открытие АТФ-зависимых K^+ -каналов полностью воспроизводит защитный эффект ишемического прекондиционирования, а их блокада, наоборот, способствует ухудшению течения ишемии [Ahmet I. et al., 2000].

1.2. Применение гиперкапнических воздействий в качестве нейропротектора и терапевтического средства при ишемически-реперфузионном повреждении

В последние десятилетия значительно увеличился интерес к использованию перmissive (досл. пер. с англ. – «Разрешающей») гиперкапнии в качестве средства повышения толерантности головного мозга к ишемии/гипоксии [Vannucci R.C. et al., 1995, 1997, 2001; Zhou Q. et al., 2010]. Для перmissive гиперкапнического воздействия в этих работах применялись нетоксические концентрации углекислого газа в диапазоне около 60-100 мм рт. ст.

Роль умеренной гиперкапнии – как в предотвращении, так и в последующем восстановлении повреждения систем органов – была подробно изучена на сердце, легких и иммунной системе [Gores G.J. et al., 1989; Kavanagh B.P., 1999; O’Croinin D. et al., 2005; Zhou W. et al., 2008; Das S. et al., 2009]. В настоящее время перmissive гиперкапния является частью повседневной клинической практики вентиляции легких с уменьшением дыхательных объемов с целью улучшения исхода у пациентов с синдромом острого повреждения легких [The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000]. Интересен тот факт, что текущий протокол Американской ассоциации изучения сердечных заболеваний рекомендует 12-15 вдохов в минуту во время сердечно-легочной реанимации и делает акцент на потенциальном неблагоприятном влиянии произвольной гипервентиляции на выживаемость пациентов.

Острая гипокапния широко используется в снижении внутричерепного давления после травм головного мозга, острого геморрагического инсульта и во время хирургических вмешательств по поводу опухолей головного мозга [Verbree J. et al., 1985; Haubrich C. et al., 2013]. Тем не менее, расширяется объем данных, свидетельствующих о том, что гиперкапния улучшает

перфузию и оксигенацию тканей и в условиях низкого перфузионного давления может положительно влиять на сохранение мозгового кровотока после тотальной ишемии мозга, возникшей интраоперационно [Haubrich S. et al., 2011; Qi L. et al., 2012; Faraco C.C. et al., 2015].

Особый интерес в изучении эффектов гиперкапнии при ишемии головного мозга представляет возрастающее внутричерепное давление, вазодилатация сосудов головного мозга и его отек. Кроме того, данные об углекислоте артериальной крови и ее молекулярном воздействии на ишемизированные ткани мозга до недавнего времени были противоречивы. Сейчас доказано, что в при ишемии мозга умеренная гиперкапния способна провоцировать некоторые нейропротекторные механизмы – противовоспалительные и антиоксидантные, а также усиленную секрецию различных нейротрансмиттеров, что, вероятно, реализуется через активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Тяжелая гиперкапния, напротив, может усугублять повреждение нейронов путем окисления вне и внутри клетки и/или ухудшения внутриклеточного гомеостаза кальция [Vannucci R.C. et al., 2001, Акса О., 2006]. Таким образом, в контексте ишемического повреждения мозга началось разграничение между неблагоприятными эффектами выраженной гиперкапнии и нейропротекторным воздействием пермиссивной гиперкапнии.

В 2010 году в литературе был введен термин – «терапевтическая гиперкапния», которым обозначается защищающий мозг эффект гиперкапнии после экспериментальной ишемии/гипоксии от реперфузионного повреждения [Zhou Q. et al., 2010]. В своем исследовании Zhou и соавт. обозначили различные исходы трех диапазонов уровня PaCO_2 во время реперфузии после ишемического инсульта. Авторы моделировали транзиторную тотальную ишемию мозга у взрослых крыс на протяжении 15 минут. После восстановления перфузии головного мозга животные подвергались ингаляции углекислоты определенной концентрации на

протяжении 2-х часов для достижения уровня PaCO_2 , соответствующего умеренной, средней и тяжелой гиперкапнии (60–80, 80–100, и 100–120 мм рт. ст., соответственно). На всех трех тестируемых уровнях гиперкапния способствовала повышению внутричерепного давления, среднего артериального давления и снижению рН артериальной крови. Умеренная и средняя гиперкапния, по сравнению с нормакапнией, способствовала восстановлению неврологических расстройств в большей степени, возникновению менее выраженных ультраструктурных гистологических изменений и менее выраженному апоптозу нейронов. Наибольшие нейропротекторные эффекты были выражены при средней гиперкапнии ($\text{PaCO}_2 = 80\text{--}100$ мм рт. ст.). Напротив, при тяжелой гиперкапнии нейропротективного действия не наблюдалось, и у этих животных был более выражен отек мозга.

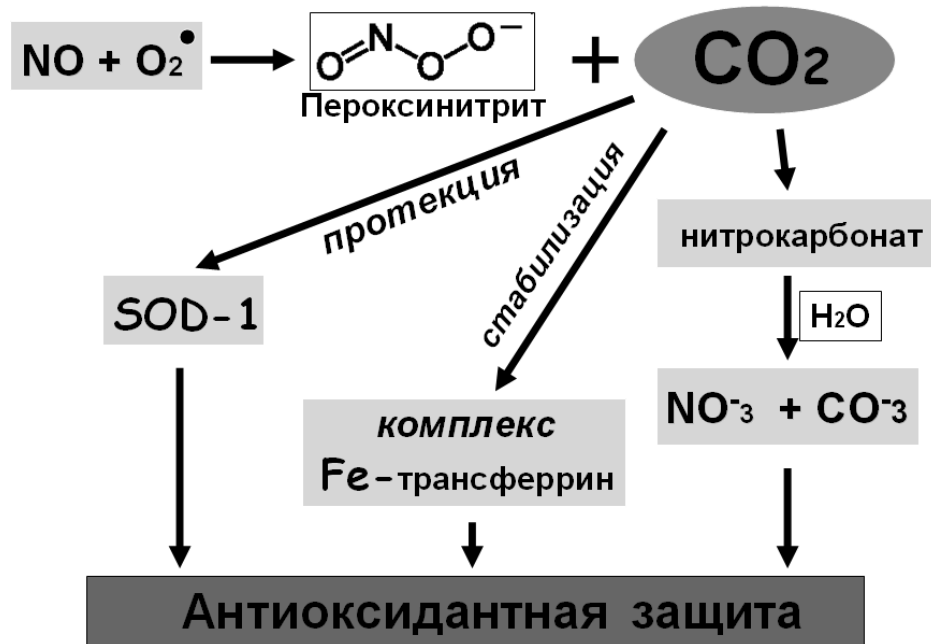
В ряде работ было установлено, что гиперкапния, по всей видимости, обеспечивает дополнительный положительный эффект в комплексной интенсивной терапии [Laffey J. et al., 2000]. Например, при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения ксантин оксидаза усиливала выработку супероксида, но этот эффект не проявлялся при гиперкапнически-индуцированном ацидозе [Shibata K. et al., 1998; Laffey J.G. et al., 2000]. Точно так же в модели изолированного кровоснабжаемого сердца гиперкапния улучшает коронарный кровоток и функциональное восстановление [Nomura F. et al., 1994]. Кроме того, снижение интенсивности искусственной вентиляции легких (связанное с увеличенным PaCO_2 и гиперкапническим ацидозом) улучшает состояние пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом в результате снижения механического растяжения пораженных легочных тканей [Hickling K. et al., 1994; Amato M. et al., 1998].

В экспериментальных исследованиях мозга гиперкапния увеличивает мозговой кровоток и уменьшает цереброваскулярное сопротивление через

вазодилатацию прекапиллярных мозговых артериол, тогда как гипокапния вызывает противоположный эффект [Grubb R. et al., 1974; Kontos H., 1981]. В недавнем исследовании на свиньях гиперкапния и гипокапния оказывали влияние на напряжение кислорода в мозге при геморрагическом шоке [Manley G. et al., 2000], тогда как гипервентиляция и, как следствие, гипокапния снижали напряжение кислорода в мозге на 56%. Гиперкапния применялась клинически для улучшения реперфузии мозга в ходе каротидной эндартерэктомии [Cho H. et al., 1998; Samra S.K et al., 2000] и для экстренной терапии при окклюзии сосудов сетчатки [Atebara N. et al., 1995]. Обобщая эти наблюдения, можно предположить, что перmissive гиперкапния может оказывать нейропротекторный эффект за счет повышения кислородного снабжения мозга и уменьшать церебральное повреждение, индуцированное постишемической реперфузией.

В литературе также представлено множество статей, раскрывающих механизмы протекторных эффектов permissive гиперкапнии. Имеются данные, демонстрирующие активацию под влиянием гиперкапнии Ca_{2+} -активируемых и АТФ-зависимых калиевых каналов [Lindauer U. et al., 2003], имеющих большое значение в процессе NO-зависимой вазодилатации церебральных сосудов.

В умеренной концентрации углекислый газ стимулирует антиоксидантную активность [Zakynthinos et al., 2007], активируя супероксиддисмутазу, стабилизируя комплекс железо-трансферрин, нейтрализуя активные формы кислорода, связываясь с пероксинитритом, затем переходя в нитрокарбонат и, при соединении с водой, образуя карбокси-анион и нитроксид-анион [Barth A. et al., 1998; Zhao Z.S. et al., 1998; Goss S.P. et al., 1999] (рисунок 1.2.1).



[Barth et al. 1998 ; Khan et al. 1998; Goss et al. 1999].

Рисунок 1.2.1 – Схема участия углекислоты в механизме антиоксидантной защиты клетки

Показано, что гиперкапния существенно усиливает кровоток в легких в условиях индуцированного гипоксией повышенного давления в легочных артериях [Chuang I.C. et al., 2010], что оказывает положительный клинический эффект и улучшает кислородное обеспечение при нарушении легочной вентиляции, ишемических повреждениях миокарда, респираторном дистресс-синдроме новорожденных и артериальной гипертензии.

В последние годы две команды исследователей из Китая достаточно подробно раскрыли механизм ингибирования апоптоза при воздействии перmissive гиперкапнии во время реперфузии, следующей за транзиторной ишемией головного мозга [Zhou Q. et al., 2010; Tao T. et al., 2013]. Авторы продемонстрировали, что гиперкапния в умеренной концентрации ($\text{PaCO}_2 = 60\text{-}100$ мм рт. ст.) ингибирует активную форму основной эффекторной каспазы-3, снижает содержание в цитозоле цитохрома C, проапоптотического белка Вах и увеличивает концентрацию в митохондриях антиапоптотического белка Bcl-2.

1.3 Эффективность гиперкапнической гипоксии для увеличения толерантности органов и тканей к ишемии/гипоксии

Показано, что увеличенное содержание углекислого газа в газовой смеси с пониженным содержанием кислорода повышает устойчивость организма к острой гипоксии, нормализует дыхание и улучшает кровообращение в органах и тканях [Агаджанян Г.И., 1973; Зверькова Е.Е., 1982; Сверчкова В.С. и соавт., 1983; Агаджанян Н.А. и соавт., 1997; Miliaru M. et al., 2003; Агаджанян Н.И. и соавт., 2004;].

Бернштейн А.Н. [1967] называл основной причиной горной болезни гипервентиляционный синдром, который вызывает состояние гипокапнии. Известно, что при добавлении в газовую среду гипобарической камеры, моделирующей высоту 5000 м, углекислого газа в концентрации 3-4% достигается минимизация симптомов горной болезни [Газенко О.Г. и соавт., 1970]. При этом авторы делают заключение о том, что клиническая картина горной болезни обусловлена одновременным воздействием не только недостатка кислорода, но и дефицитом CO_2 .

Около 30 лет назад было показано, что устойчивость к экстремальному дефициту кислорода после 30-суточного курса тренировок повышается более выражено при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии, чем при аналогичных воздействиях изолированной нормобарической гипоксии [Зверькова Е.Е., 1980]. Этим же автором позже было обнаружено, что сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии увеличивает диаметр и площадь поперечного сечения коронарных сосудов и повышает толерантность миокарда к ишемии значительно эффективнее, чем изолированная гипоксия [Зверькова Е.Е., 1982].

Баевым В.И. [1995, 1999] показано, что однократное и повторное (через 48 часов после первого) 120-минутное пребывание крыс в герметической камере с сочетанием действия гипоксии (O_2 5,3-4,5%) и гиперкапнии (CO_2 12,5-13,1%) способствует увеличению устойчивости животных к

последующему действию острой гипоксии разного происхождения (гемической и циркуляторной, при тотальной ишемии мозга). При этом автором подчеркивается физиологическая роль углекислоты как эндогенного неферментативного компонента антиоксидантной защиты организма. Долговременная адаптация к гипобарической гипоксии и гиперкапнической гипоксии характеризуется снижением реактивности сосудов мозга к воздействию O_2 и CO_2 [Kulikov V.P. et al., 2009; Lucas S.J. et al., 2011] и снижением нейронального метаболизма [Brian J.E. Jr., 1996].

В исследовании Глазковой В.А., Чернякова И.Н. [1975] показано, что рН крови и оксигенацию артериальной крови в условиях гипоксии (O_2 – 16%) можно поддерживать в физиологических пределах только при ее сочетании с гиперкапнией (CO_2 – 5%). Представленные данные подтверждаются экспериментами Агаджаняна Н.А. и соавт. [1973; 2003], в которых установлено, что добавление 5% CO_2 к гипоксическим смесям вызывает увеличение парциального давления O_2 в артериальной крови приблизительно на 20 мм рт. ст. по сравнению с уровнем O_2 во время дыхания газовой смесью с пониженным содержанием кислорода без углекислого газа [Агаджанян Н.А., 1973; Агаджанян Н.А. и соавт., 2003]. Это объясняется тем, что состояние гиперкапнии в организме способствует развитию ацидоза, что вызывает сдвиг кривой диссоциации гемоглобина вправо и повышает оксигенацию тканей.

В эксперименте, моделирующем воздействие гипоксии и гиперкапнии на беспозвоночных животных [Kniffin C.D. с соавт., 2014], показано, что эти два фактора в умеренном режиме способствуют активации фундаментальных систем антиоксидантной защиты клеток при повреждении, увеличивая транскрипцию генов цитоплазматической Mn-супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и пептид-метионин-оксид-редуктазы.

При исследовании тренированных мужчин-ныряльщиков, способных к длительной задержке дыхания и, соответственно, имеющих естественную адаптацию к сочетанию гипоксии и гиперкапнии, было обнаружено, что в

покое у них усилена реакция на нормокапническую гипоксию без изменения реактивности сосудов легких на углекислый газ [Costalat G. et al., 2014].

Доказано, что при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии в течение месяца у здоровых людей 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 соавт., 2004; Kulikov V.P. et al., 2009]. В экспериментальных работах на животных этими же авторами показано, что гиперкапнически-гипоксические тренировки приводят к выраженному увеличению времени жизни головного мозга при острой тотальной ишемии, одним из механизмов которого является увеличение количества микрососудов [Беспалов А.Г. и соавт., 2003]. При тотальной ишемии головного мозга крыс, подвергавшихся воздействию гиперкапнической гипоксии, была отмечена меньшая выраженность некробиотических, некротических и геморрагических проявлений.

Учитывая, что активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов при острой ишемии наблюдается как после гипоксического, так и после гиперкапнического воздействия, а аденозин является основным триггером прекодиционирования [Obrenovitch T.P., 2008], можно предположить, что эти механизмы могут потенцировать нейропротекторные эффекты углекислого газа и дефицита кислорода при их сочетании.

Кроме того, имеются данные об участии белка теплового шока HSP-70 в увеличении толерантности головного мозга к ишемии при гипоксическом прекодиционировании [Lin H.J. et al., 2011], также доказано, что белок S-100 β оказывает протекторный эффект при ишемическом повреждении нервной ткани [Kleindienst A. et al., 2004]. Поэтому уместно полагать, что важными нейропротекторными механизмами сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии будут: увеличение активности белков HSP-70, являющихся шаперонами клеточной репарации [Yenari M.A. et al., 2010] и

активация белка астроцитарной глии S-100 β , выполняющего нейротрофическую функцию [Acheson A. et al., 2009; Bianchi R. et al., 2011].

1.4 Основные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга

Главными механизмами повышения толерантности головного мозга к ишемическому повреждению, по мнению многих авторов, являются: поддержание ионного гомеостаза и энергетического метаболизма в нервных клетках, адаптивные эффекты аденозина, ингибирование апоптоза, репарация ДНК, функционирование шаперонов, нейро- и синаптогенез, антиоксидантные системы защиты, активизация транспортных систем глюкозы, равновесие глутаматэргической и ГАМК-эргической передачи [Blondeau N. et al., 2004; Sharp F.R. et al., 2004; Obrenovich T.P., 2008].

В толерантных к ишемии нейронах области CA1 гиппокампа были обнаружены такие потенциально благоприятные изменения, как повышенная активность Ca²⁺-АТФазы плазматической мембраны и повышенная секвестрация Ca²⁺ в митохондриях [Ohta S. et al., 1996]. В соответствии с этими данными визуализация внутриклеточного кальция ([Ca²⁺]_i) показала, что повышение его уровня в нейронах области CA₁ гиппокампа после эпизода аноксии-агликемии заметно снижалось у животных, толерантных к ишемии [Shimazaki K. et al., 1998]. Кроме того, в случаях усиления толерантности мозга к ишемии путем прекондиционирования 3-нитропропионовой кислотой, также в гиппокампе песчанок экспрессия изоформы Ca²⁺-АТФазы плазматической мембраны повышалась, наряду с индуцируемым белком теплового шока HSP-70 [Kato K. et al., 2005]. Важно заметить, что после транзиторной глобальной ишемии в нейронах активируется ген Na/Ca-обменника [Majda B.T. et al., 2001], экспрессия которого зависит от изоформы обменника и зоны, вовлеченной в повреждение [Pignataro G. et al., 2004; Boscia F. et al., 2006]. Na⁺/H⁺-обменник

и Na^+ - K^+ - 2Cl^- -копереносчик также являются важными ионными транспортерами, поскольку принимают участие в регуляции внутриклеточной pH и объема клетки [Pedersen S.F. et al., 2006]. Согласно этим данным, можно ожидать, что ишемическая толерантность будет ассоциирована с пониженной регуляцией этих мембранных структур, однако данные о такой ассоциации для центральной нервной системы пока не обнаружены.

Аденозин и A_1 -рецепторы к нему играют ключевую роль в формировании ишемической толерантности мозга [Heurteaux C. et al., 1995; Blondeau N. et al., 2005], однако принимает ли аденозин участие в последующей отдаленной адаптивной цитопротекции – остается менее ясным. Ишемическое прекондиционирование у крыс повышает иммунореактивность A_1 -рецепторов к аденозину в регионе СА-1 гиппокампа на 1, 3 и 7 сутки после начала прекондиционирования, т.е. в рамках временного окна ишемической толерантности [Zhou A.M. et al., 2004]. В то же время аденозин активирует АТФ-зависимые калиевые каналы [Kulinskii V.I. et al., 2006], снижает передачу возбуждения в синапсах, сдвигая равновесие в сторону торможения и экономии энергетических субстратов [Shie A. et al., 2006].

В исследованиях на молодых крысах были получены противоречивые данные: уровень гликогена в головном мозге повышался спустя 24 часа после прекондиционирования, а уровень остаточной АТФ, измеренной в конце 90-минутной гипоксии-ишемии был значительно выше, чем в контрольных группах [Brucklacher R.M. et al., 2002]. Такой быстрый рост АТФ в мозговой ткани наряду с ростом уровня лактата вне клетки, не только во время ишемии [Lowry O.H. et al., 1964; Frykholm P. et al., 2001], но также ишемии с периинфарктной деполяризацией [Norwood S.E. et al., 2005], а также улучшенная способность использовать лактат в качестве энергетического субстрата, могут явиться потенциально значимым адаптивным изменением энергетического метаболизма мозга, особенно во время реперфузии.

Одним из важнейших механизмов увеличения толерантности головного мозга к ишемии является торможение апоптоза [Obrenovich T.P., 2008]. В исследовании гипоксического прекондиционирования [Cantagrel S. et al. 2003], показано снижение апоптотических клеток в мозге через 24 и 48 часов после экспериментального инсульта. Гипоксические тренировки практически полностью предотвращают гибель клеток головного мозга в результате апоптоза [Gao X. et al., 2006]. Торможение апоптоза осуществляется за счет антиапоптотических свойств HSP70 через активацию транскрипционного фактора PKR/NFκB [Fremont M. et al., 2006]. Кроме того, HSP70 ингибирует реакции, повышающие проницаемость мембран митохондрий и высвобождение цитохрома C, блокируя транслокацию Bax и повышая экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2 [Stankiewicz A.R. et al., 2005]. Активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов предотвращает активацию цитохрома C и, соответственно, также блокирует каспаза-зависимый путь апоптоза [Liu D. et al., 2002].

Оксидативные повреждения ДНК являются характерной чертой ишемически-реперфузионного повреждения [Cui J. et al., 2000]. Недавно была установлена взаимосвязь между повышенной толерантностью к ишемии головного мозга у крыс и заметным ослаблением повреждений ДНК, что может являться следствием улучшенной репарации ДНК непосредственно после прекондиционирования, которое вызывало заметное увеличение опосредованной бета-полимеразой активности, наблюдающейся при формировании ишемической толерантности [Li W. et al., 2006].

Повышенная экспрессия генов белков теплового шока является универсальной чертой клеточного ответа на повреждения и достоверно известно, что их шаперонная активность обеспечивает цитопротекцию во время стресса [Franklin T.B. et al., 2005.]. Многие исследования *in vivo* показали, что ишемическая толерантность головного мозга непосредственно связана с индукцией неконститутивного HSP-70 и других шаперонов [Simon R.P. et al., 1993; Chen J. et al., 1996; Currie R.W. et al., 2000].

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. et al., 2006, Nithianantharajah J. et al., 2006]. В толерантном к ишемии мозге феномен нейрогенеза был изучен Naylor и соавторами [Naylor M. et al., 2005] на модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс. Было показано, что пролиферация клеток-предшественниц возрастала после создания фокальной ишемии, а также после прекондиционирования, т.е. в отсутствии какого-либо существенного повреждения.

Огромное количество фактов свидетельствует о том, что активные формы кислорода принимают участие в патогенезе повреждения головного мозга, спровоцированного ишемией/реперфузией [Chan P.H., 1996; Moro M.A. et al., 2005]. Во время рециркуляции происходит чрезмерный выброс NO, что также может приводить к ишемическому повреждению головного мозга посредством формирования активных форм азота, таких как пероксинитрит [Keynes R.G. et al., 2004]. Имеется подтверждение тому, что генерация супероксидного аниона во время прекондиционирования, вызванная транзиторной ишемией, необходима для последующего развития ишемической толерантности [Furuichi T. et al., 2005, Perez-Pinzon M.A. et al., 2005]. К примеру, внутривенное введение человеческой рекомбинантной Cu/Zn-супероксиддисмутазы (СОД) крысам незадолго до ишемического прекондиционирования подавляло развитие толерантности к последующему ОСМА повреждению, так же как и экспрессию HSP-70 [Mori T. et al., 2000]. Имеются аналогичные данные о защитных и укрепляющих свойствах окиси азота (NO), которые включают в себя индукцию программ экспрессии генов, лежащих в основе прекондиционирования мозга [Huang P.L. 2004; Keynes R.G. et al., 2004; Cho S. et al., 2005].

Обратный захват глюкозы мозгом и ее утилизация опосредуются, главным образом, через белки-переносчики глюкозы GLUT₁ и GLUT₃

[Yamada T. et al., 2006]. Существуют факты, указывающие на то, что модуляция белков GLUT₁ и GLUT₃ может быть связана с толерантностью мозга к ишемии. Работа с первичными культурами крысиных нейронов привела к тому, что 24-часовая гипоксия спровоцировала быстрое повышение нейрональной мРНК GLUT₁ и GLUT₃ в 40 и 5 раз соответственно, с похожими изменениями мРНК GLUT₁ в глии [Bruckner B.A. et al., 1999].

Также известно, что GLUT₁ – один из генов-мишеней для HIF-1, который является транскрипционным фактором, повышающимся в ответ на гипоксию/ишемию [Sharp F.R. et al., 2004]. Некоторые антиапоптозные системы также могут повышать продукцию GLUT₁ [Russo V.C. et al., 2004].

Глутаматные переносчики (EAAT) в глии и нейронах утилизируют глутамат из внеклеточного пространства, завершая, таким образом, глутаматопосредованную синаптическую передачу и предотвращая достижение внеклеточным глутаматом своего нейротоксического уровня. Данные механизмы могут предотвращать развитие эксайтотоксичности, а изменения в плотности глутаматных переносчиков могут быть еще одним адаптивным изменением, ведущим к формированию ишемической толерантности мозга [Obrenovitch T.P. et al., 1997; Danbolt N.C. 2001]. Ишемическое прекондиционирование путем 10-минутной ОСМА у крыс привело к апрегуляции EAAT₂ и EAAT₃, но не к усилению экспрессии EAAT₁ [Pradillo J.M. et al., 2006]. Напротив, РКД-прекондиционирование у тех же самых видов уменьшило продукцию глиальных изоформ переносчиков EAAT₁ и EAAT₂ на 1, 3 и 7-й день после прекондиционирования, с максимальным эффектом на 3-й день временного промежутка, который совпадает с максимальной ишемической толерантностью [Douen A.G. et al., 2000].

В настоящее время в литературе не представлено работ, посвященных сравнительному изучению эффективности изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии в формировании ишемической толерантности головного мозга и увеличении резистентности к острой

гипоксии, так же как и работ, посвященных изучению механизмов нейропротекции при воздействии гиперкапнической гипоксии.

По данным анализа литературы можно сделать заключение, что часть механизмов, за счет которых гипоксия и гиперкапния повышают резистентность органов и тканей к острой ишемии/гипоксии, совпадает, а это дает основание предположить, что при сочетанном воздействии этих факторов будет происходить взаимопотенцирование нейропротекторных эффектов.

Поэтому оценка сравнительной эффективности изолированного и сочетанного курсового воздействия гипоксии и гиперкапнии для повышения устойчивости организма к острой гипоксии/ишемии, а также изучение механизмов их нейропротекторной эффективности является важной научной задачей в рамках изучения феномена формирования ишемической толерантности.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал и объект исследования

Все используемые экспериментальные процедуры были одобрены локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. Эксперименты проводились на 420 взрослых крысах-самцах линии Wistar (240-320 г, возрастом приблизительно 8-9 месяцев и 290 белых мышах-самцах линии C57BL/6, средней массой 36 ± 3 г (Институт Цитологии и Генетики СО РАМН, Новосибирск, Россия).

Животные в каждой серии исследования были рандомизированы с использованием программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Животные находились в клетках при контролируемой комнатной температуре (~ 22 °C) и естественном освещении. У животных был свободный доступ к еде и воде. До и после экспериментов производилось взвешивание.

2.2 Методика сочетанного и изолированного воздействия гиперкапнии и гипоксии

Для проведения респираторных воздействий использовалась проточная камера (рисунок 2.2.1). 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. Экспериментальные группы животных дышали газовой смесью, состав которой зависел от назначения группы. Контрольная группа помещалась в камеру при аналогичных условиях, но вместо газовой смеси компрессором нагнетался атмосферный воздух. Контроль газового

состава в камере производился газоанализатором Микон (ООО «Ласпек», Россия).

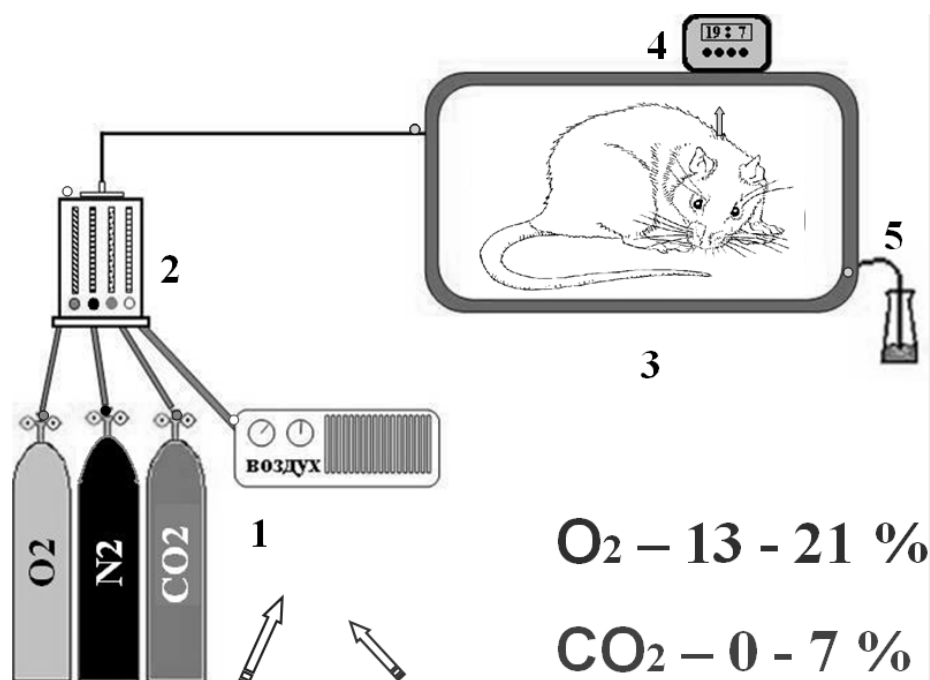


Рисунок 2.2.1 – Схема установки для проведения респираторных воздействий

1 – Баллоны с углекислым газом, кислородом, азотом и компрессор для подачи атмосферного воздуха; 2 – Ротаметры; 3 – Герметичная проточная камера; 4 – Газоанализатор; 5 – Выпускной клапан, помещенный в емкость с водой

Во всех сериях исследования для проведения респираторных воздействий по газовому составу формировались следующие группы животных:

НГ группа (нормобарическая гипоксия: $PO_2 - 90$ мм рт. ст.; $PCO_2 - 1$ мм рт. ст.): в этой группе животные дышали газовой смесью в течение 20 минут, таким образом, чтобы PO_2 сохранялось в пределах 90 мм рт. ст.

ПГ группа (пермиссивная гиперкапния: $PO_2 - 150$ мм рт. ст.; $PCO_2 - 50$ мм рт. ст.): в этой группе животные также дышали газовой смесью в течение 20 минут, но PO_2 сохранялось в пределах 150 мм рт. ст., а PCO_2 – в пределах 50 мм рт. ст.

ГГ группа (гиперкапническая гипоксия: $PO_2 - 90$ мм рт. ст.; $PCO_2 - 50$ мм рт. ст.): в этой группе животные также дышали газовой смесью в течение

20 минут, но PO_2 сохранялось в пределах 90 мм рт. ст., а PCO_2 – в пределах 50 мм рт. ст.

К группа (контрольная группа: PO_2 – 150 мм рт. ст.; PCO_2 – 1 мм рт. ст.): эти животные подвергались всем экспериментальным процедурам, за исключением изменения газового состава атмосферного воздуха во время респираторных воздействий.

2.3 Методика моделирования фокальной и субтотальной ишемии головного мозга у крыс

2.3.1 Хирургические манипуляции

Все животные накануне перед оперативным вмешательством не получали питание, но имели свободный доступ к воде. Перед операцией у животных был измерен вес. Анестезия у крыс проводилась путем внутрибрюшинного введения смеси Кетамин/Ксилазин (75 мг Кетамин + 10 мг Ксилазин на 1 кг веса).

Температурные датчики были введены в прямую кишку каждого животного. Ректальная температура находилась в постоянном значении – $37.5^{\circ} \pm 0.2$ °С. Это достигалось при помощи сервоконтролируемой тепловой пластины, расположенной в операционном столике и регулируемой термостатом. Пластина нагревала стол в течение операции и послеоперационного периода.

2.3.2 Моделирование субтотальной ишемии головного мозга

Для моделирования ишемии головного мозга на следующие сутки после окончания респираторных воздействий у крыс под наркозом производилась перевязка правой общей сонной артерии [Vannucci R.C., 1998]. Выполнялся продольный разрез кожи шеи, затем послойное разделение фасций и

мышц шеи до гортани. Перевязка отсепарированной правой сонной артерии проводилась при помощи шелковой нити таким образом, чтобы воздействие на окружающие мягкие ткани, сосуды и нервы было минимальным.

2.3.3 Фокальное ишемическое повреждение

Для моделирования фокального ишемического повреждения в левой паховой области был произведен стерильный разрез. В левую бедренную вену был введен стерильный катетер для инфузии 4% раствора бенгальского розового (Sigma Aldrich, Germany), разведенного в 0,9% р-ре NaCl. Бенгальский розовый инфузироваля крысам в течение 1 минуты в дозировке 40 мг/кг.

Ишемическое повреждение сенсомоторной области коры правого полушария головного мозга производилось по методике транскраниального фотохимического тромбоза [Watson B.D. et al., 1985; Pevsner P.H. et al., 2001; Barth A.M. et al., 2011]. Выполнялся разрез кожи головы, надкостница очищалась от мягких тканей, затем проводилось 10-минутное освещение костей черепа зеленым лазером с длиной волны 532 нм и мощностью 15 мВт. На черепе освещался участок теменной кости диаметром около 2 мм, расположенный по середине между брегмой и ламбдовидным швом и на 2 мм латеральнее сагиттального шва.

2.4 Метод моделирования острой гипобарической гипоксии

Резистентность крыс к острому дефициту кислорода определяли по устойчивости к острой гипобарической гипоксии [Лукьянова Л.Д. 1990; Shrivastava K. et al. 2008]. Острая гипобарическая гипоксия моделировалась в барокамере с объемом 7 л (рисунок 2.4.1). 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 завершения эксперимента все крысы выживали и восстанавливали активное поведение без признаков патологии. Эксперимент проводился при внешней температуре 20-22 °С и влажности 40-50%. 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).

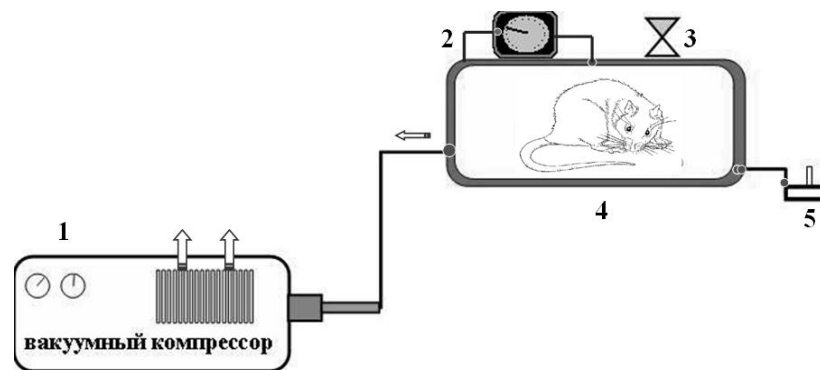


Рисунок 2.4.1 – Установка для моделирования острой гипобарической гипоксии

1 – вакуумный компрессор; 2 – альтиметр; 3 – электронный таймер;
4 – герметичная камера, 5 – впускной клапан

2.5 Методика моделирования острой нормобарической гипоксии

У мышей для определения устойчивости к острому дефициту кислорода оценивалась резистентность к острой нормобарической гипоксии (ОНБГ) по методике Zhang K .et al. [2004]. Мыши индивидуально помещались в герметичную проточную камеру, куда компрессором нагнетался азот и атмосферный воздух. Камера имела выходное отверстие, соединенное с емкостью, наполненной водой, что исключало ретроградное поступление газов. Контроль газового состава в камере производился при помощи газоанализатора Microlux O₂+CO₂ (ООО «Микролюкс», Екатеринбург, Россия). Для оценки резистентности использовался параметр «время жизни в условиях гипоксии» (ВЖУГ), который включал период от момента установления и поддержания концентрации O₂ ~ 5% до наступления второго агонального вдоха.

2.6 Методика оценки неврологического дефицита и двигательного-координационных нарушений

Оценка неврологического дефицита производилась по 100-балльной шкале Katz [Katz L., 1995] или по 18-балльной шкале NSS [Chen J. et al., 2001].

Шкала Katz et al. [1995] часто используется зарубежными исследователями в моделях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга и неврологических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, таких как, например, асфиксическая остановка сердца. Ее достоинствами являются высокая чувствительность и возможность определения дефицита по большому числу неврологических критериев. В шкале представлено 5 пунктов, каждый из которых соответствует 20-ти баллам: состояние сознания и дыхательной функции, сохранность рефлексов черепных нервов, сенсомоторный дефицит и координационные нарушения.

Максимальная степень неврологического повреждения по данной шкале соответствует 100 баллам.

NSS – современная международная шкала неврологического дефицита для моделей церебральной ишемии у крыс. В шкале представлены тесты по оценке моторной и сенсорной функции, рефлексов и патологической двигательной активности, а также по оценке равновесия на балансире. Нормальный неврологический статус приравнивается к 0 баллов, умеренному повреждению соответствует сумма баллов от 1 до 6, повреждению средней степени 7-12 баллов, а 13-18 баллов говорят о выраженном неврологическом повреждении.

Двигательно-координационные нарушения оценивали при помощи ротарод-теста с вращающимся стержнем диаметром 70 мм и длиной 200 мм, располагавшемся на высоте 800 мм [Balduino W., 2000]. Крыса выдерживается на вращающемся стержне в течение 5 минут или до момента падения, либо удерживания на стержне без попытки хождения по нему. Скорость вращения нарастает от 4 до 40 оборотов в минуту. За 3 дня до операции все животные дрессируются на стержне, а за один день до операции измеряется средняя (из трех попыток) продолжительность удерживания в секундах, которая служит внутренним контролем.

2.7 Методика гистологического исследования препаратов головного мозга

2.7.1 Гистологическая обработка тканей головного мозга

Препараты головного мозга были тщательно извлечены и препарировались в течение 24 часов в растворе 10% забуференного параформальдегида, 96-% этанола и ледяной уксусной кислоты, в соотношении компонентов – 2:7:1 (ООО «Первая лабораторная компания», Россия).

2.7.2 Окраска по Нислю

После фиксации мозги обезвоживались при помощи стандартного протокола проводки в виде последовательного помещения в растворы этанола увеличивающейся концентрации и заливались в парафиновые блоки. После этого блоки секционировались на ротационном микротоме (толщина среза 10 мкм) в области, содержащей инфаркт с интервалом 300 мкм. Срезы окрашивались толуидиновым синим (ООО «Первая лабораторная компания», Россия) по методу Ниссля и запаивались при помощи среды для заключения под покровное стекло для наблюдения под оптическим микроскопом МИКМЕД 6, вар. 7 (ООО «ЛОМО», Россия).

2.7.3. Объем инфаркта.

Срезы фотографировались, а площадь ишемического повреждения измерялась на каждом срезе исследователем, не знающим о назначении группы. Микрофотографии обрабатывались при помощи программы ImageJ 1,41 (Scion Inc., USA). Объем инфаркта вычислялся по формуле: $V = x * t * S$, где x – периодичность взятия срезов, t – толщина серийного среза, S – сумма площадей очагов ишемического повреждения [De Ryck M. et al., 1989; Keiner S. et al., 2008].

2.8 Методика определения содержания HSP-70 и S-100 β в сыворотке крови у крыс

У крыс под наркозом производили забор крови из нижней полой вены в вакуумные пробирки с активатором свертывания. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 3000 об./мин через 30 минут после забора. В сыворотке исследовали содержание HSP-70 и белка S-100 β методом иммуноферментного анализа на планшетном фотометре «Multiskan Ascent» (ThermoFisher Scientific, Финляндия). Для определения белка теплового шока HSP-70 использовался набор «HSP70 high sensitivity EIA kit» (ENZO LIFE

SCIENCES GmbH, Германия), а для определения S-100 β – набор CanAg S100 EIA (Fujirebio Diagnostics Inc, Швеция).

2.9 Исследование роли митоK⁺_{ATФ}-каналов и аденозиновых A₁-рецепторов методом применения активатора/блокатора механизма

В качестве блокатора митоK⁺_{ATФ}-каналов использовался 1,2% раствор 5-гидроксидеканоата (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 40 мг/кг (растворитель – 0,9% NaCl), а блокатора аденозиновых A₁-рецепторов – 0,1% раствор 1,3-дипропил-8-фенилксантина (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 4,5 мг/кг (растворитель – DMSO).

В качестве активатора митоK⁺_{ATФ}-каналов использовался 0,3-% раствор диазооксида (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 10 мг/кг (растворитель – DMSO), а активатора аденозиновых A₁-рецепторов – 0,1% раствор 2-хлораденозина (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 4 мг/кг (растворитель – DMSO). Инъекции препаратов производились внутривенно.

2.10 Статистическая обработка экспериментальных данных

Размер общей выборки и размер выборки каждой группы рассчитывался исходя из результатов наших предыдущих исследований на аналогичных моделях по методу количественной шкалы [Dell R.B. et al., 2002]. Статистический анализ выполнялся с использованием программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Гипотеза о нормальности распределения проверялась по критерию Шапиро-Уилка. Часть данных во всех сериях исследования не соответствовала закону нормального распределения, поэтому сравнение между группами производилось по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Статистическая мощность исследования составила 80% ($\beta \leq 0,2$). Достоверными считались различия, для

которых уровень p был меньше 0,05. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили или как среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). Статистическому анализу подвергались только те данные, которые были получены по животным, полностью прошедшим все экспериментальные процедуры.

2.11 Дизайн экспериментального исследования эффективности изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии в повышении резистентности к острому дефициту кислорода и ишемии головного мозга

2.11.1 Исследование по оценке резистентности крыс к острой гипоксии после изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии

Исследование по оценке резистентности к острой гипоксии включало 4 серии экспериментов с равным количеством групп и животных. В серии № 1 крысы помещались в камеру для респираторных воздействий однократно на 20 минут. В серии № 2 крысы помещались в камеру для респираторных воздействий три раза по 20 минут, с интервалом 24 часа. В серии № 3 крысы помещались в камеру для респираторных воздействий семь раз по 20 минут, с интервалом 24 часа. В серии № 4 крысы помещались в камеру для респираторных воздействий пятнадцать раз по 20 минут, с интервалом 24 часа. За 14 суток до начала экспериментов у всех животных производилась оценка исходного уровня резистентности к острой гипоксии. Повторная оценка резистентности производилась у крыс через 24 часа после последнего респираторного воздействия.

В каждой серии было 4 группы животных по 15 крыс. Группы различались по парциальному давлению кислорода (PO_2) и парциальному давлению углекислого газа (PCO_2): 1) группа крыс, подвергавшихся

воздействию нормобарической гипоксии; 2) группа крыс, подвергавшихся воздействию пермиссивной гиперкапнии; 3) группа крыс, подвергавшихся воздействию гиперкапнической гипоксии; 4) контрольная группа крыс.

2.11.2 Исследование по оценке толерантности головного мозга крыс к ишемии после изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии

Экспериментальная серия по оценке толерантности головного мозга к субтотальной ишемии проводилась на 60 крысах, разделенных на 4 группы: 1) группа крыс, подвергавшихся воздействию нормобарической гипоксии; 2) группа крыс, подвергавшихся воздействию пермиссивной гиперкапнии; 3) группа крыс, подвергавшихся воздействию гиперкапнической гипоксии; 4) контрольная группа крыс.

Тренировки животных в проточной камере проводились в течение 15 дней по 20 минут ежедневно. Использованное количество экспозиций было выбрано нами на основании проведенной ранее экспериментальной серии, в которой была продемонстрирована максимальная эффективность сочетания гипоксии и гиперкапнии именно после 15-кратного воздействия. На следующие сутки после окончания тренировок у всех животных под наркозом создавалась экспериментальная модель ишемии головного мозга, путём перевязки правой общей сонной артерии. В конце 10-дневного послеоперационного периода проводилась оценка неврологического дефицита по 100-балльной шкале Katz и двигательного-координационных нарушений в ротарод-тесте.

Экспериментальная серия по оценке толерантности головного мозга к фокальной ишемии проводилась на 4 группах крыс по 15 животных в каждой: 1) группа крыс, подвергавшихся воздействию нормобарической гипоксии; 2) группа крыс, подвергавшихся воздействию пермиссивной гиперкапнии; 3) группа крыс, подвергавшихся воздействию

гиперкапнической гипоксии; 4) контрольная группа крыс. Крысы во всех группах прошли 15-кратный курс респираторных воздействий, соответственно назначению группы. 20-минутная продолжительность одного сеанса воздействия была принята в связи тем, что такое время экспозиции продемонстрировало высокую эффективность для профилактики экспериментальной субтотальной ишемии у крыс.

На следующие сутки после завершения курса респираторных воздействий у всех животных моделировалось фокальное ишемическое повреждение головного мозга. Через 72 часа после создания фокального инсульта у крысы проводилась оценка неврологических нарушений при помощи ротарод-теста и шкалы неврологического дефицита NSS. Затем головной мозг крыс извлекался для гистологической обработки и морфометрического анализа объема ишемического инфаркта.

2.12 Дизайн экспериментального исследования механизмов, увеличивающих толерантность головного мозга к ишемии/гипоксии, при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии

2.12.1 Исследование роли HSP-70 и S-100 β в механизме потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии

Экспериментальная серия проводилась на 60 крысах, разделенных на 4 равные группы по 15 крыс, в зависимости от концентрации кислорода и углекислого газа в газовой смеси: 1) группа крыс, подвергавшихся воздействию нормобарической гипоксии; 2) группа крыс, подвергавшихся воздействию пермиссивной гиперкапнии; 3) группа крыс, подвергавшихся воздействию гиперкапнической гипоксии; 4) контрольная группа крыс.

Животные всех групп проходили курсы респираторных воздействий в течение 15 дней по 20 минут ежедневно. На следующие сутки после окончания тренировок у всех животных под наркозом создавали

экспериментальную модель ишемии головного мозга путём перевязки правой общей сонной артерии.

В конце 10-дневного послеоперационного периода у всех крыс под наркозом производили забор крови для определения концентрации HSP-70 и белка S-100 β .

2.12.2 Исследование роли митоK⁺_{АТФ}-каналов и A₁-рецепторов к аденозину в механизме потенцирования гиперкапнией протекторного эффекта гипоксии

Экспериментальное исследование проводилось на 390 белых мышах. Животные были рандомизированы и разделены на 2 равные серии: первая – для изучения роли митоK⁺_{АТФ}-каналов; вторая – для изучения роли аденозиновых A₁-рецепторов. Каждая серия включала 13 групп мышей по 15 самцов в каждой:

Группа 1 (5-HD и DPCPX) – группы животных, получавшие блокатор;

Группа 2 (Diaz и 2-CADO) – группы животных, получавшие активатор;

Группа 3 (DMSO) – группы животных, получавшие растворитель препаратов диметилсульфоксид;

Группа контроля – группы интактных животных, получавшие инъекции физиологического раствора;

Группы животных, подвергавшихся воздействию нормобарической гипоксии (НГ) (O₂ – 13%, CO₂ – 0%; остальное – N₂), пермиссивной гиперкапнии (ПГ) (O₂ – 21%, CO₂ – 7%; остальное – N₂) или гиперкапнической гипоксии (ГГ) (O₂ – 13%, CO₂ – 7%; остальное – N₂), сочетанную с применением блокатора/активатора либо без них.

Животные всех опытных групп через 15 минут после введения подвергались процедуре однократного респираторного воздействия в течение 30 минут в проточной камере. Воздействия проводилось через 30 минут после введения активатора/блокатора митоK⁺_{АТФ}-каналов и через 15 минут

после введения активатора/блокатора A_1 -рецепторов к аденозину. Контрольные животные и животные из групп, получавших активатор или блокатор, также помещались в камеру при аналогичных условиях, но вместо газовой смеси компрессором нагнетался атмосферный воздух.

Через 24 часа после процедуры прекондиционирования у всех животных оценивалась резистентность к ОНБГ.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии в повышении резистентности к острому дефициту кислорода

Первая часть диссертационной работы представлена исследованием по оценке резистентности к острой гипоксии, которое состояло из 4 экспериментальных серий с равным количеством групп (Контроль, НГ, ПГ и ГГ) и животных (60 крыс). Серии эксперимента различались только по кратности сеансов воздействия: 1-, 3-, 7- и 14-кратное. Тренировочные воздействия были представлены 20-минутными сеансами с интервалом 24-часа. За две недели до начала экспериментов у всех животных производилась оценка исходного уровня резистентности к острой гипоксии. Повторная оценка резистентности производилась у крыс через 24 часа после последнего респираторного воздействия.

Масса тела и исходные параметры ВПП и ВЖ не отличались среди всех групп крыс. В контрольных группах крыс всех серий исследования резистентность к острой гипоксии не увеличивалась.

В серии № 1 (однократное 20-минутное дыхание газовой смесью) в группах ГГ и ПГ показатель ВПП был выше чем в контрольной группе на 26% ($p < 0,05$) и 31% ($p < 0,01$), а ВЖ – на 25% ($p < 0,05$) и 28% ($p < 0,01$), соответственно (рисунок 3.1.1). В группе НГ показатели ВПП и ВЖ не отличались от контрольной группы. Следует отметить, что ВЖ в группе ПГ было значимо выше, чем в группе НГ ($p < 0,05$). Таким образом, разовое воздействие пермиссивной гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии увеличивает резистентность животных к острой гипоксии.

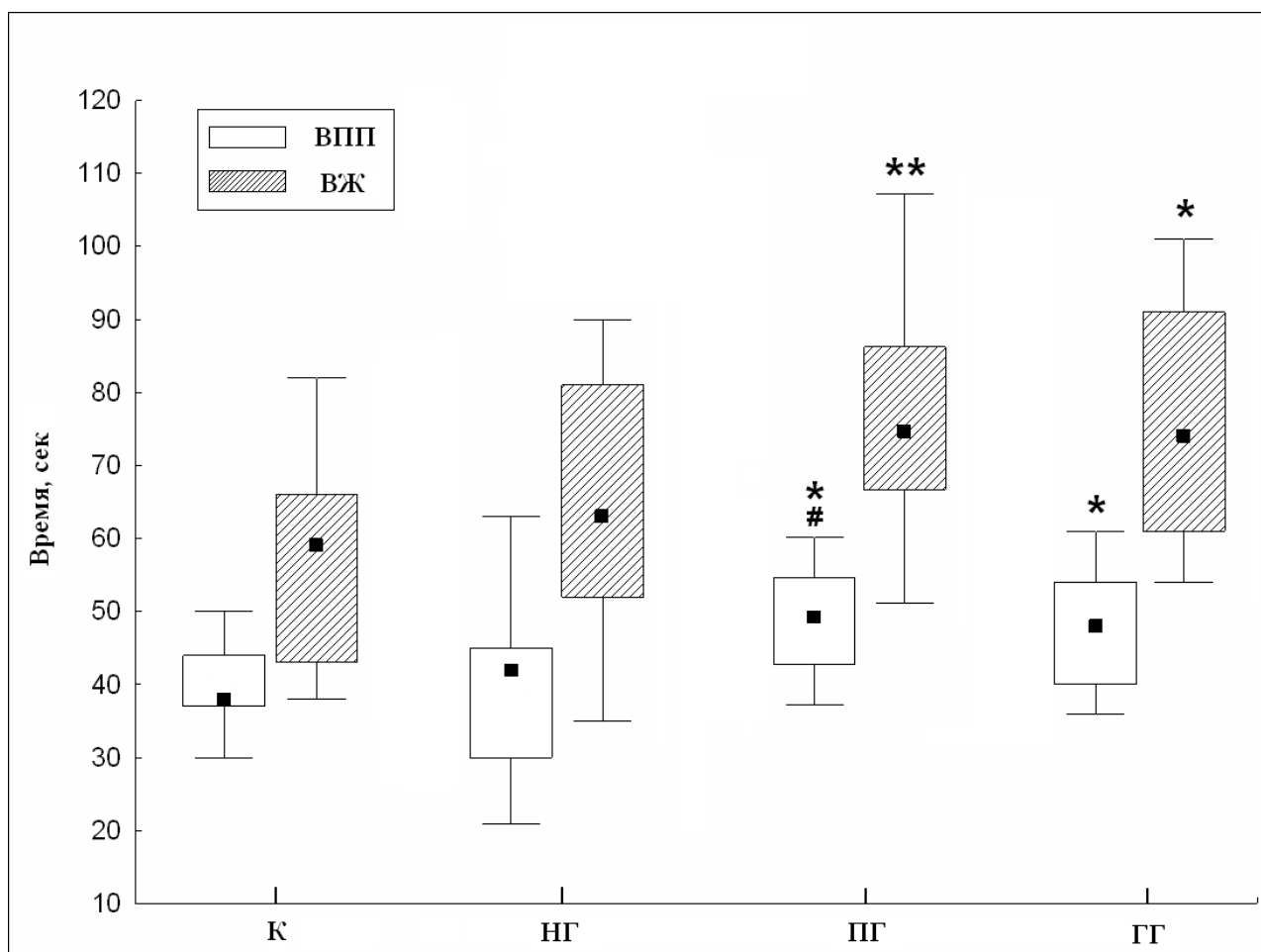


Рисунок 3.1.1 – Резистентность к острой гипобарической гипоксии у крыс после 1-кратного респираторного воздействия. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,05$ – различия с группой К. ** $p < 0,01$ – различия с группой К. # $p < 0,05$ – различия с группой НГ. ВПП – время потери позы. ВЖ – Время жизни. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

В серии № 2 (трехкратное 20-минутное дыхание газовой смесью с интервалом 24 часа) в группах ГГ и ПГ показатель ВПП был выше, чем в контрольной группе на 49% ($p < 0,05$) и 42,5% ($p < 0,01$), а ВЖ – на 51% ($p < 0,05$) и 80% ($p < 0,01$), соответственно (рисунок 3.1.2). В группе НГ показатели ВПП и ВЖ не отличались от контрольной группы, однако были значимо ниже групп ПГ и ГГ ($p < 0,05$). Таким образом, трехкратное 20-минутное респираторное воздействие пермиссивной гиперкапнии и

гиперкапнической гипоксии увеличивает резистентность животных к острой гипоксии.

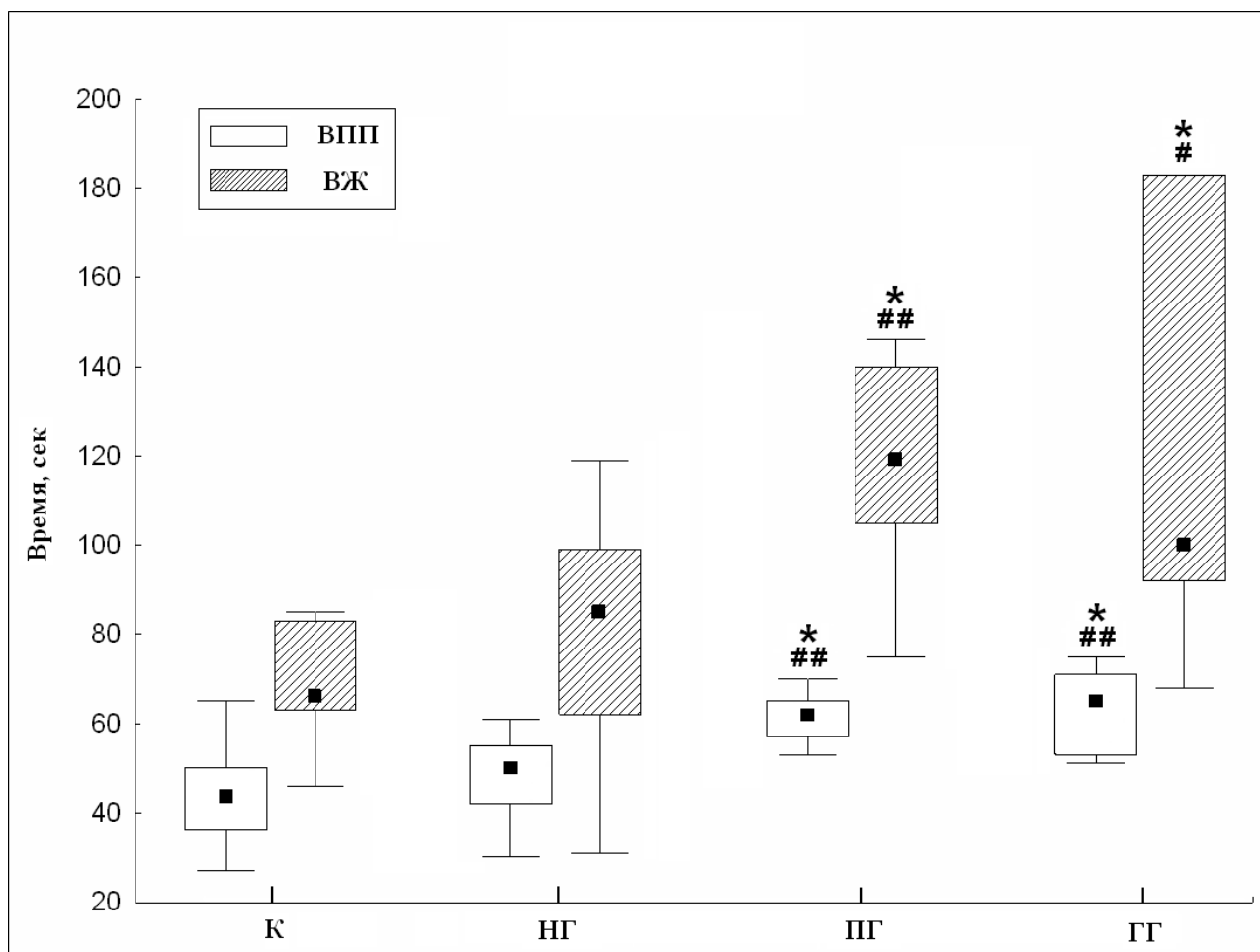


Рисунок 3.1.2 – Резистентность к острой гипобарической гипоксии у крыс после 3-кратных респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,01$ – различия с группой К. # $p < 0,05$ – различия с группой НГ. ## $p < 0,01$ – различия с группой НГ. ВПП – время потери позы. ВЖ – Время жизни. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

В серии № 3 (семикратное 20-минутное дыхание газовой смесью с интервалом 24 часа) в группах ГГ, ПГ и НГ показатель ВПП был выше, чем в контрольной группе на 104% ($p < 0,01$), 96% ($p < 0,01$) и 61% ($p < 0,01$), а ВЖ – на 287% ($p < 0,01$), 166% ($p < 0,01$) и 103% ($p < 0,01$), соответственно (рисунок 3.1.3). Следует отметить, что группы ПГ и ГГ по показателям резистентности

были значительно выше группы НГ и отличались на 21% ($p < 0,01$) и 26% ($p < 0,01$) для ВПП и на 31% ($p < 0,05$) и 91% ($p < 0,01$) для ВЖ, соответственно. Наибольшее увеличение резистентности достигнуто при воздействии гиперкапнической гипоксии, по сравнению с группой ПГ ($p < 0,05$).

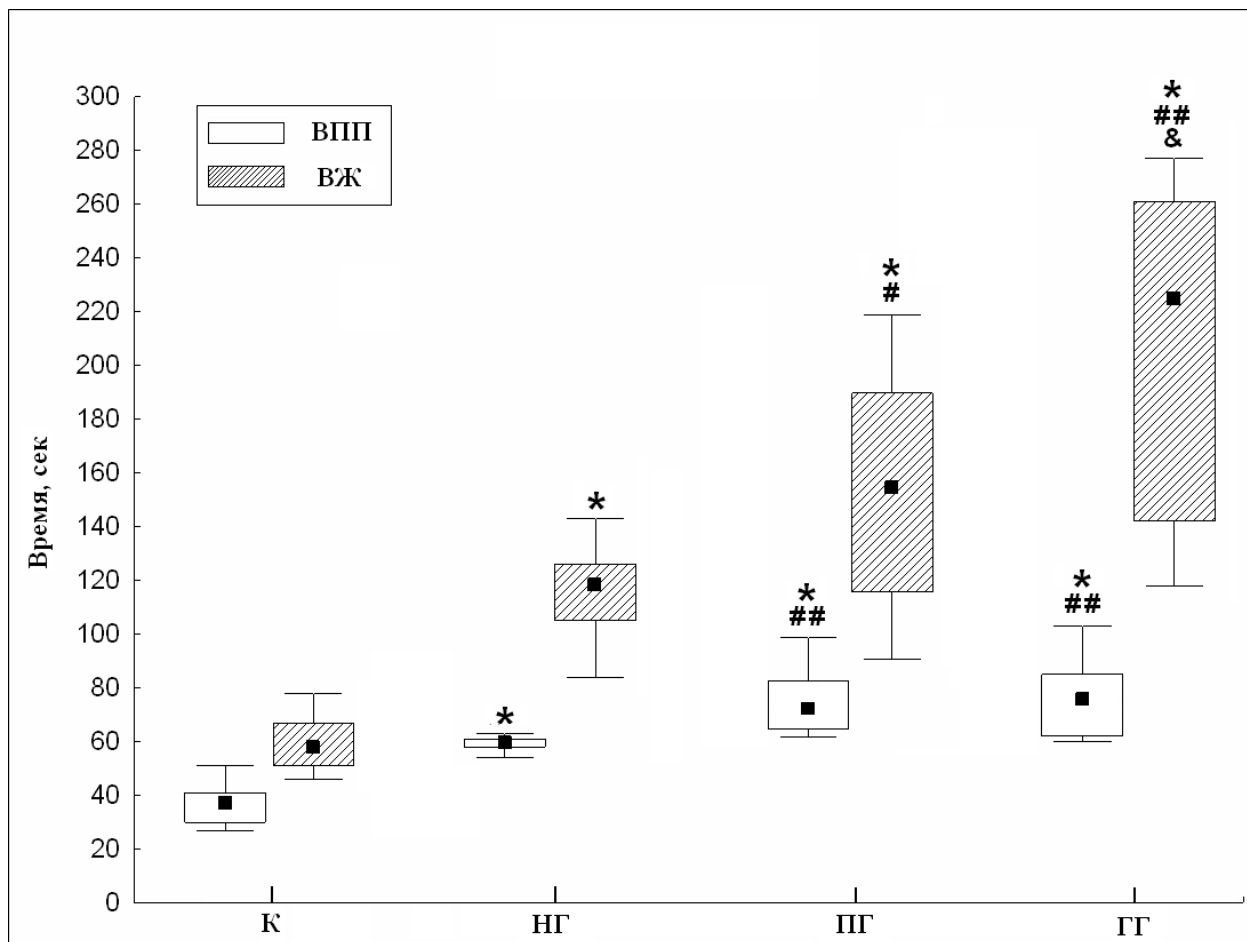


Рисунок 3.1.3 – Резистентность к острой гипобарической гипоксии у крыс после 7-кратных респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,01$ – различия с группой К. # $p < 0,05$ – различия с группой НГ. ## $p < 0,01$ – различия с группой НГ. & $p < 0,05$ – различия с группой ПГ. ВПП – время потери позы. ВЖ – Время жизни. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

В серии № 4 у всех экспериментальных групп существенно увеличились ВПП и ВЖ (рисунок 3.1.4). Самый низкий прирост ВПП и ВЖ, по отношению к контролю, был в группе НГ. Показатель ВПП в этой группе

возрос почти на 30%, а ВЖ – в 1,5 раза ($p < 0,01$). В группе ПГ ВПП был выше контрольного почти в 2,5 раза, а ВЖ – в 3,5 раза ($p < 0,01$). Респираторное воздействие гиперкапнической гипоксии показало наибольшее увеличение резистентности среди экспериментальных групп. ВПП в этой группе было больше контрольного в 3,5 раза, а ВЖ – более 5,5 раза ($p < 0,01$). Все показатели экспериментальных групп значительно отличались между собой ($p < 0,01$).

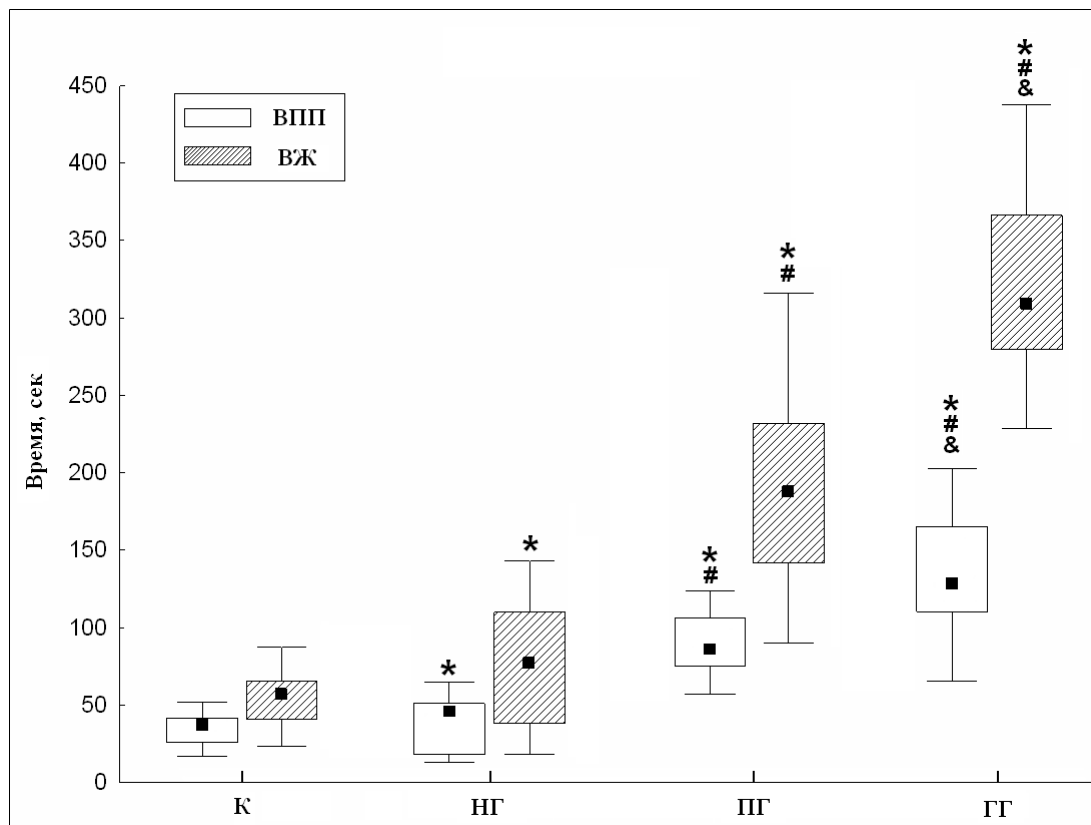


Рисунок 3.1.4 – Резистентность к острой гипобарической гипоксии у крыс после 15-кратных респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,01$ – различия с группой К. # $p < 0,01$ – различия с группой НГ. & $p < 0,01$ – различия с группой ПГ. ВПП – время потери позы. ВЖ – Время жизни. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

Динамика формирования резистентности к острой гипоксии различалась среди экспериментальных групп. Показатель ВЖ более наглядно демонстрирует этот факт. Так, уже 1-кратное 20-минутное воздействие в

группах ГГ и ПГ существенно увеличивало резистентность крыс к острой гипобарической гипоксии по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). В группе НГ резистентность значимо увеличивалась лишь в период от 3 до 7 суток воздействия ($p < 0,01$). Кроме того, в период от 7 до 15-суточного воздействия в группе НГ наблюдалось снижение резистентности, чего не наблюдалось в группах ГГ и ПГ. В группах ГГ и ПГ происходило выраженное увеличение резистентности по сравнению с группой НГ ($p < 0,01$), а в группе ГГ – по сравнению с группой ПГ ($p < 0,01$).

Таким образом, результаты первой части диссертационной работы подтверждают гипотезу о том, что гиперкапническая гипоксия имеет максимальную эффективность для повышения резистентности к острой гипобарической гипоксии по сравнению с нормобарической гипоксией и перmissiveй гиперкапнией в эквивалентных концентрациях кислорода и углекислого газа. Также они свидетельствуют о том, что увеличение кратности гиперкапнически-гипоксических воздействий сопровождается пропорциональным возрастанием резистентности, а эффективность перmissiveй гиперкапнии при любой кратности воздействия оказывается выше эффективности нормобарической гипоксии

3.2 Нейропротекторная эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии при ишемии головного мозга

Вторая часть диссертационной работы, посвященная изучению нейропротекторной эффективности изолированной гиперкапнии и гипоксии и их сочетания, представлена двумя экспериментальными сериями.

3.2.1 Неврологические нарушения после моделирования экспериментальной ишемии головного мозга у крыс после 15-кратного сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии

В 1-ой серии проводилось исследование эффективности сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии на модели экспериментальной субтотальной ишемии головного мозга у крыс. Эксперимент проводился на 60 крысах, разделенных на 4 равные группы, аналогично первой части: Контроль, НГ, ПГ и ГГ. После 15-кратного курса 20-минутных тренировок у животных моделировалась субтотальная ишемия головного мозга путем перевязки правой общей сонной артерии, и после 10-дневного послеоперационного периода проводилась оценка неврологического дефицита и двигательного-координационных нарушений.

В данной серии наблюдался выраженный неврологический дефицит у животных контрольной группы (рисунок 3.2.1.1). В отличие от них у крыс опытных групп, прошедших курс дыхательных тренировок, ишемия головного мозга сопровождалась значительно меньшим неврологическим дефицитом. Так, в группе ГГ неврологический дефицит был в среднем в 3 раза меньше, чем в контрольной группе. У животных, прошедших курс воздействий нормобарической гипоксии и перmissive гиперкапнии, выраженность неврологического дефицита после экспериментальной ишемии мозга не различалась между этими группами. При этом выраженность неврологического дефицита в группе ГГ была на 45% меньше, чем в группе НГ, но значимо не различалась с группой ПГ.

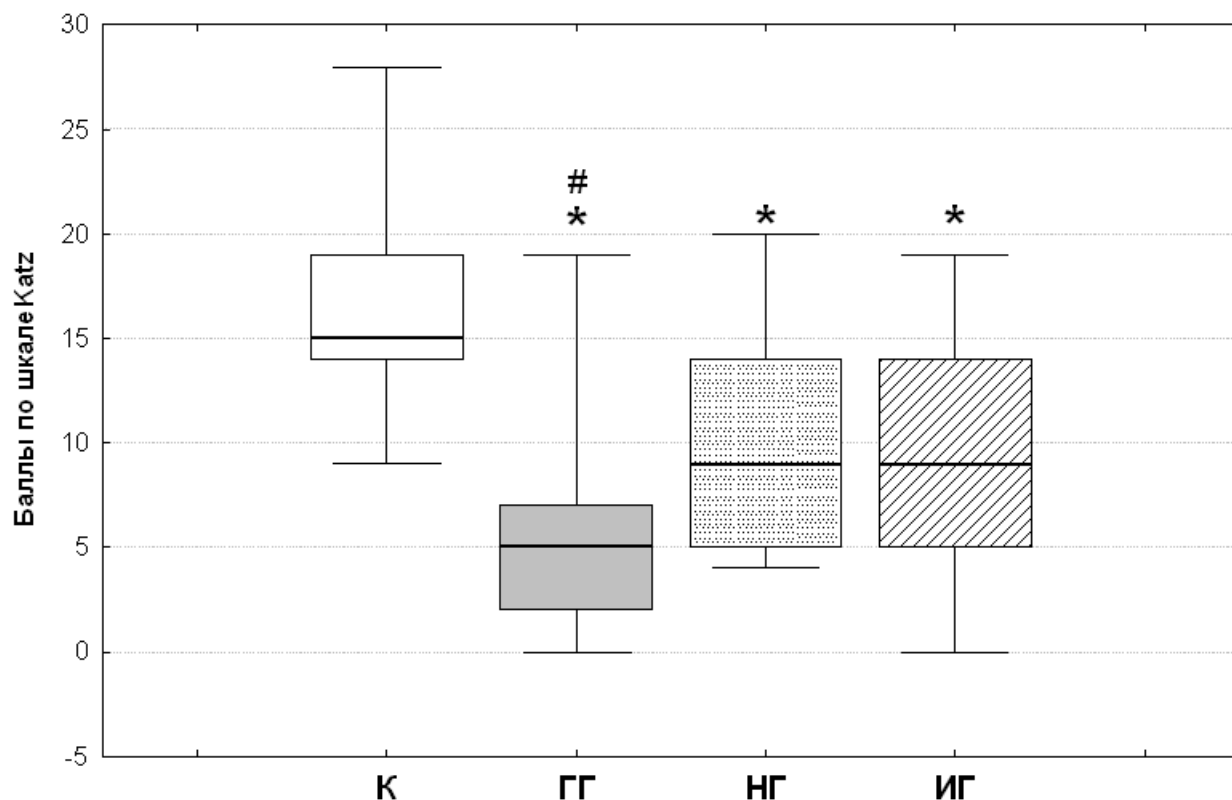


Рисунок 3.2.1.1 – Показатели неврологического дефицита по шкале Katz. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – пермиссивная гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия. * $p < 0,01$ - различия с группой К; # $p < 0,05$ – различия с группой НГ

Двигательно-координационные нарушения были наиболее выражены в контрольной группе (рисунок 3.2.1.2). В группе ГГ время удержания животных на вращающемся стержне в ротарод-тесте почти в 3 раза превышало показатель группы контроля. Это время в группах НГ и ПГ было больше контроля в 2 и 2,5 раза, соответственно. Между опытными группами значимых различий в двигательных нарушениях выявлено не было.

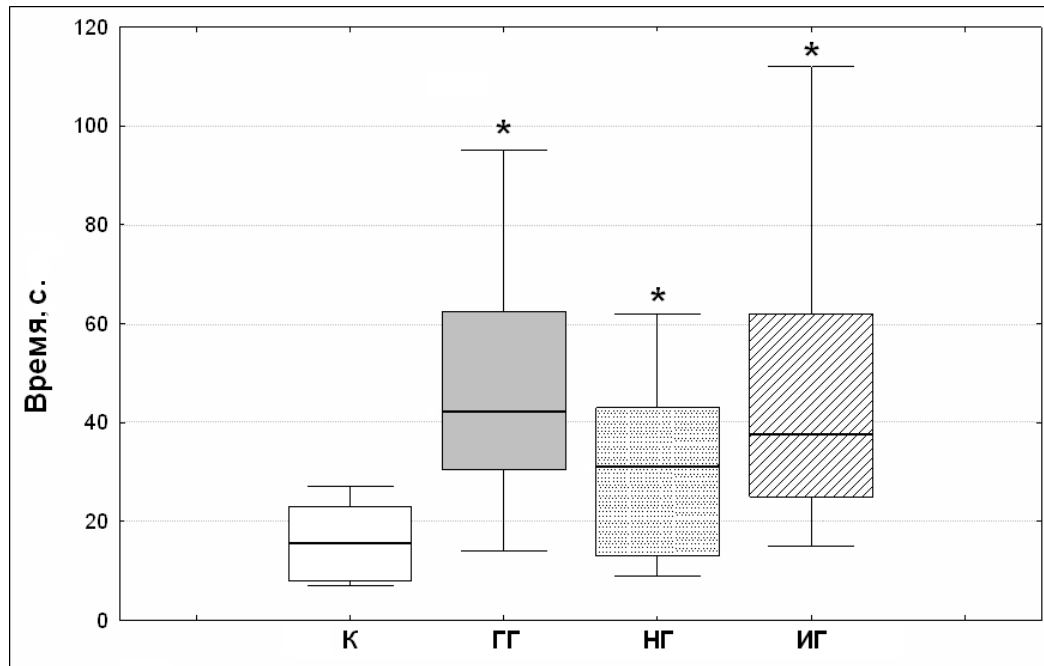


Рисунок 3.2.1.2 – Время удерживания животных на вращающемся стержне в ротарод-тесте. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – пермиссивная гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия. * $p < 0,01$ – различия с группой К

3.2.2 Нейропротекторная эффективность сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии после моделирования фокального ишемического повреждения

Во 2-ой серии по оценке толерантности головного мозга к фокальной ишемии после проведения 15-кратного курса 20-минутного изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии эксперимент проводился на 4 группах крыс, включающих по 15 животных. Группы животных формировались по принципу аналогично предыдущим сериям: Контрольная группа, НГ, ПГ и ГГ. На следующие сутки после завершения курса респираторных воздействий у животных моделировалось фокальное ишемическое повреждение головного мозга, а через 72 часа проводилась оценка неврологических нарушений и морфометрия объема ишемического повреждения.

Масса тела до эксперимента, перед операцией и после эксперимента не отличалась среди животных всех групп. Во время проведения операций по моделированию фокального ишемического повреждения погибла часть животных. По результатам вскрытия было установлено, что основной причиной смерти был отек головного мозга. В итоге группы крыс, использованных в исследовании, сформировались следующим образом: К – n – 11; НГ – n – 12; ПГ – n – 12; ГГ – n – 15.

Неврологический дефицит

Неврологический дефицит по шкале NSS показан на рисунке 3.2.2.1. Группа ГГ продемонстрировала наименьший неврологический дефицит по сравнению с группами К и НГ ($p < 0,01$), но не было никаких различий между ГГ и ПГ группами. Крысы из группы НГ не показали различий с контрольной группой. В группе ПГ неврологический дефицит был ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), но не отличался от группы НГ.

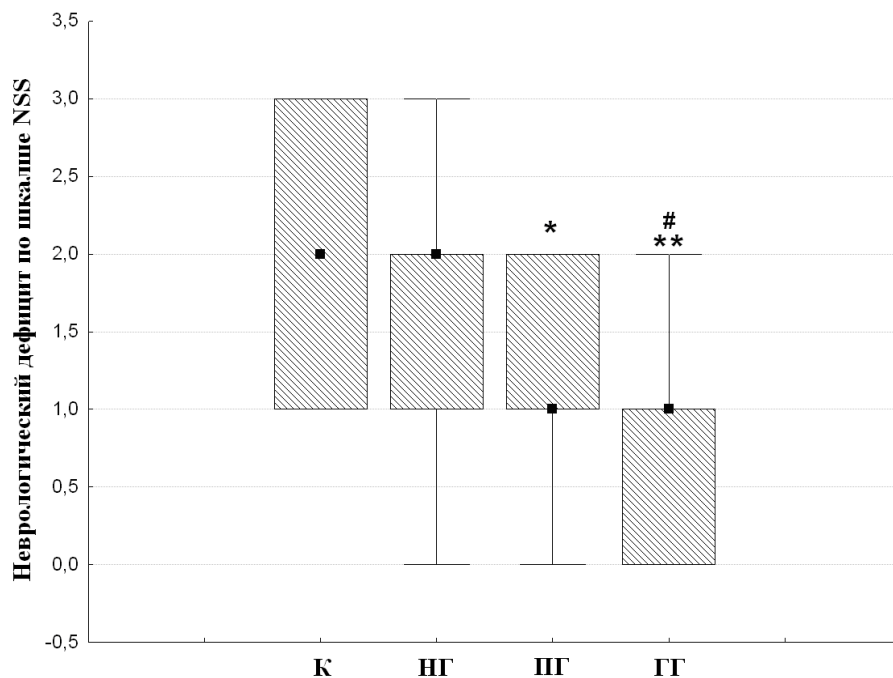


Рисунок 3.2.2.1 – Неврологический дефицит по шкале NSS. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,05$ – различия с группой К. ** $p < 0,01$ – различия с группой К. # $p < 0,01$ – различия с группой НГ. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

Двигательно-координационные нарушения в ротарод-тесте

Во всех опытных группах наблюдалось снижение двигательных координационных нарушений и увеличение времени удержания на вращающемся стержне по сравнению с контрольной группой (рисунок 3.2.2.2). Группы ГГ и НГ демонстрировали наибольшее время по сравнению с группами К и ПГ ($p < 0,01$), но не было никаких различий между ГГ и НГ группами. В группе ПГ время в ротарод-тесте было больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$).

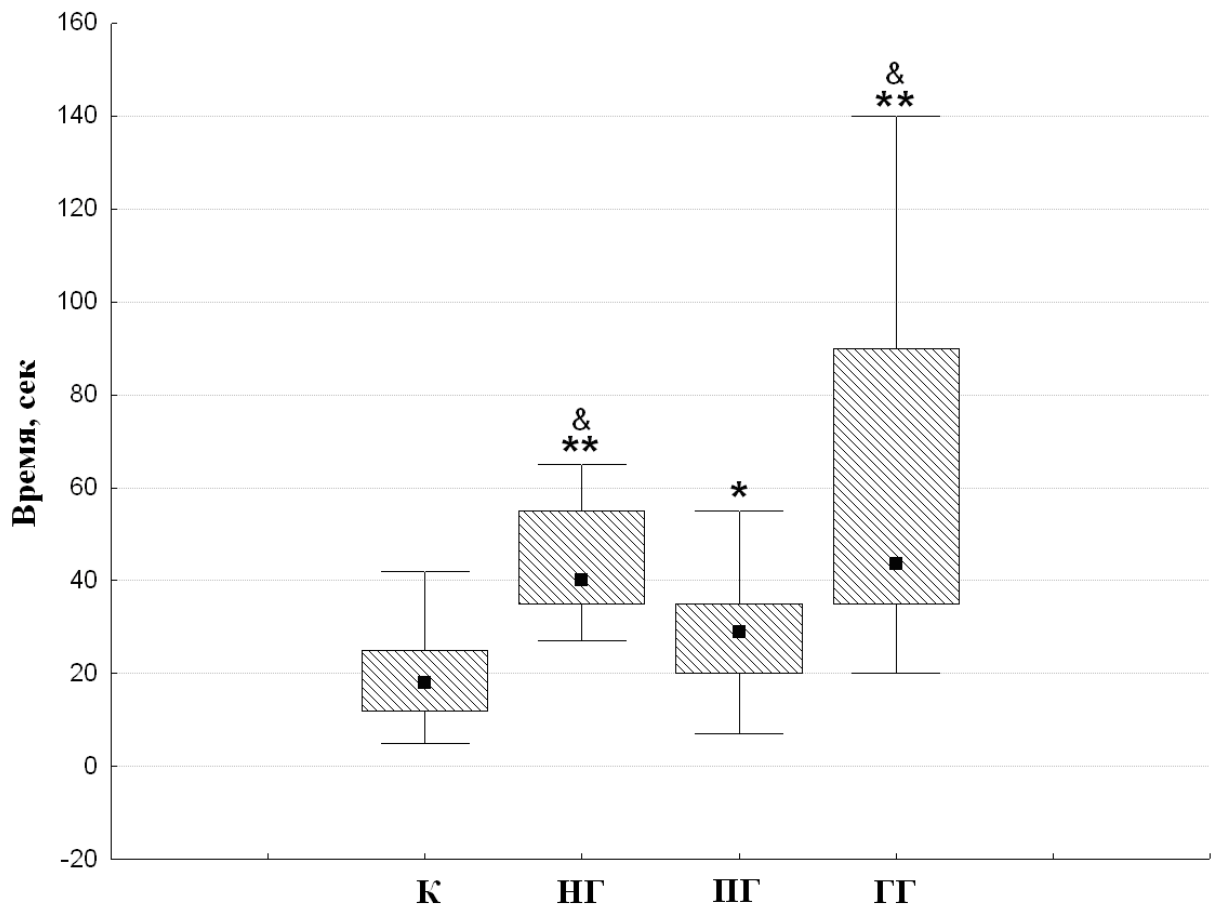
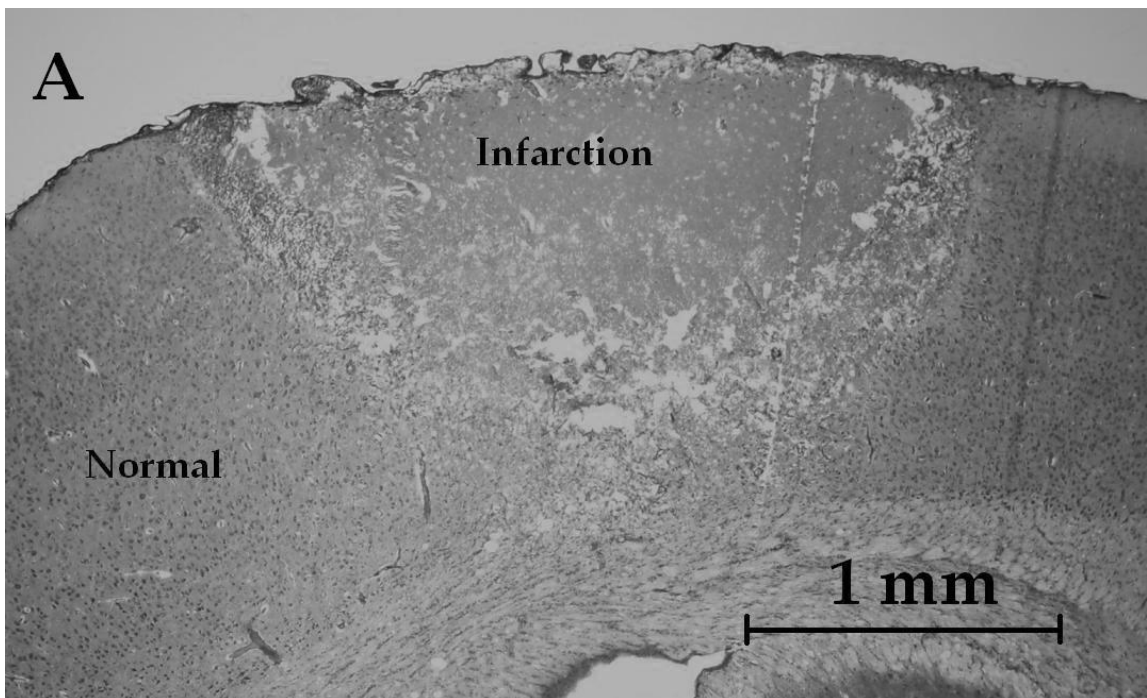


Рисунок 3.2.2.2 – Время удержания крысы на стержне в ротарод-тесте. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,05$ – различия с группой К. ** $p < 0,01$ – различия с группой К. & $p < 0,01$ – различия с группой ПГ. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

Морфология фотохимических инфарктов

На рисунке 3.2.2.3 представлена морфологическая картина зоны некроза коры головного мозга после фокального фотохимического тромбоза. На поперечных срезах головного мозга заметны четкие границы между зоной некроза, переходной зоной и здоровой нервной тканью, что позволило количественно измерить площадь инфаркта на срезах и вычислить объем инфаркта. В контрольной группе (рисунок 3.2.2.3А) зона инфаркта могла достигать мозолистого тела, которое локально смещалось за счет расширения поражения. Переходная зона (пенумбра) была образована гиперхромными нейронами. В группах НГ, ПГ и ГГ была аналогичная морфологическая картина (рисунок 3.2.2.3В), но площадь инфаркта была меньше, и мозолистое тело не смещалось.



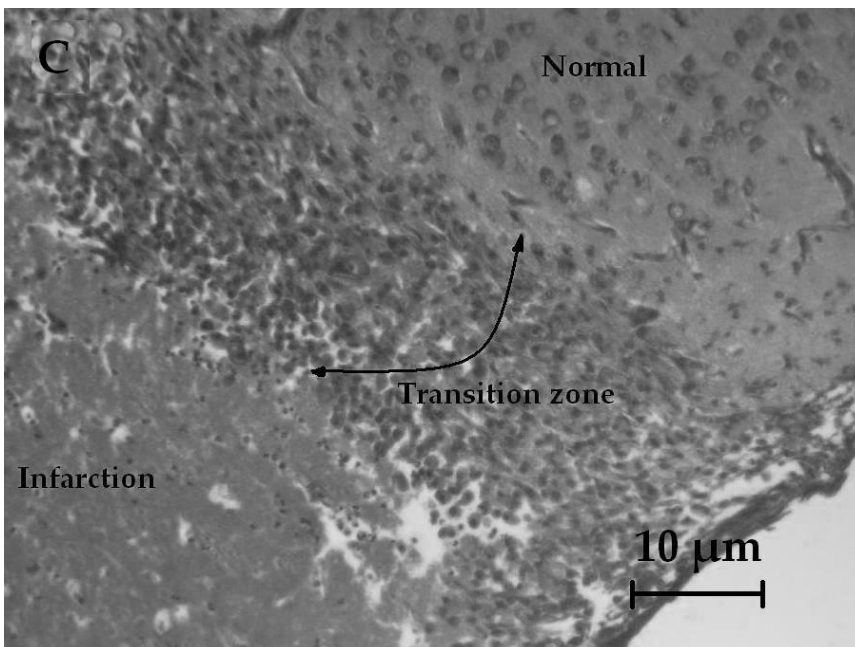
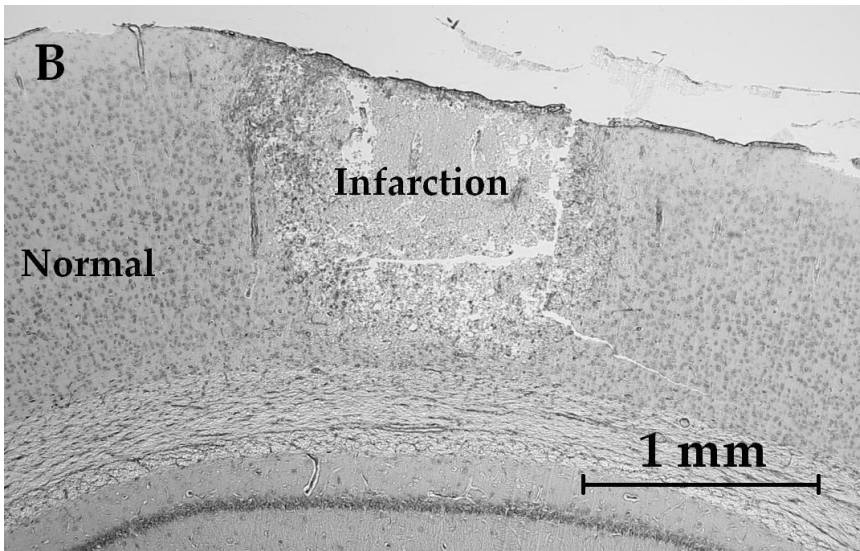


Рисунок 3.2.2.3 – Гистологическая картина. Поперечный срез головного мозга крысы через 72 часа после фокального фотохимического тромбоза. Толщина среза – 10 мм. Окраска по Нислю. (А) Срез головного мозга крысы из контрольной группы (x400). В коре головного мозга отчетливо видна зона инфаркта, мозолистое тело смещено за счет большой области инфаркта. (В) Срез головного мозга крысы из группы ГГ (x400). Морфологические изменения аналогичны, но площадь инфаркта значительно меньше. (С) Микрофотография переходной зоны (x1000). Видна четкая граница между зоной некроза, переходной зоной и здоровой тканью.

Измерение объема инфаркта

Результаты измерения объема инфаркта представлены на рисунке 3.2.2.4. Сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии в группе ГГ продемонстрировало максимальный нейропротекторный эффект и уменьшило объем инфаркта в 1,84 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$), на 31,5% – по сравнению с группой НГ ($p < 0,01$) и на 27% – по сравнению с группой ПГ ($p < 0,05$). Воздействие пермиссивной гиперкапнии и нормобарической гипоксии снизило объем инфаркта в головном мозге на 25% ($p < 0,01$) и на 20,5% ($p < 0,05$) – по отношению с группе К, соответственно, но между группами НГ и ПГ не было никаких различий.

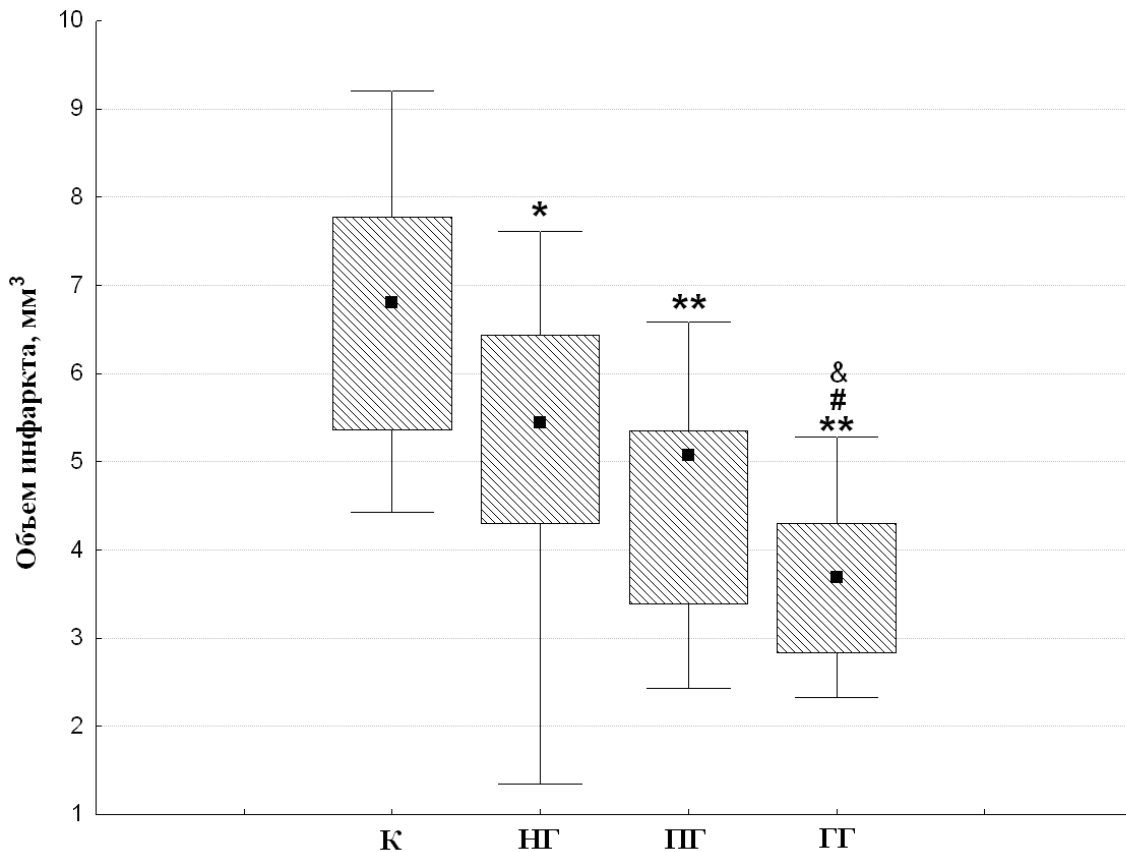


Рисунок 3.2.2.4 – Объем инфаркта головного мозга крыс. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,05$ – различия с группой К. ** $p < 0,01$ – различия с группой К. # $p < 0,01$ – различия с группой НГ. & $p < 0,05$ – различия с группой ПГ. К – контрольная группа. НГ – нормобарическая гипоксия. ПГ – пермиссивная гиперкапния. ГГ – гиперкапническая гипоксия

Результаты, полученные во второй части диссертационной работы, демонстрируют, что сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии оказывает максимальный нейропротекторный эффект, по сравнению с перmissiveй гиперкапнией и нормобарической гипоксией, как при субтотальной ишемии, так и при фокальном ишемическом повреждении головного мозга.

3.3 Участие протекторных белков HSP-70 и S-100 β в механизме формирования ишемической толерантности головного мозга при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии

В третьей части диссертационной работы, посвященной исследованию роли шаперона HSP-70 и белка S-100 β в механизме потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии, было использовано 60 крыс, разделенных на 4 равные группы, прошедших 15-кратный курс 20-минутных воздействий, соответственно группе: контрольная группа, НГ, ПГ и ГГ. Через 24 часа после окончания тренировочного курса у животных под наркозом создавали экспериментальную модель субтотальной ишемии головного мозга путём перевязки правой общей сонной артерии.

В конце 10-дневного послеоперационного периода у всех крыс под наркозом производили забор крови для определения концентрации HSP-70 и белка S-100 β .

Во время проведения операций по моделированию ишемического повреждения погибла часть животных, и, в итоге, группы крыс, использованных в исследовании, сформировались следующим образом: n для НГ = 11; n для ПГ = 15; n для ГГ = 14; n для К = 11.

Исследование показало, что концентрация белка S-100 β в сыворотке крови была выше в группах ПГ и ГГ по отношению к контролю ($p < 0,05$) (рисунок 3.3.1).

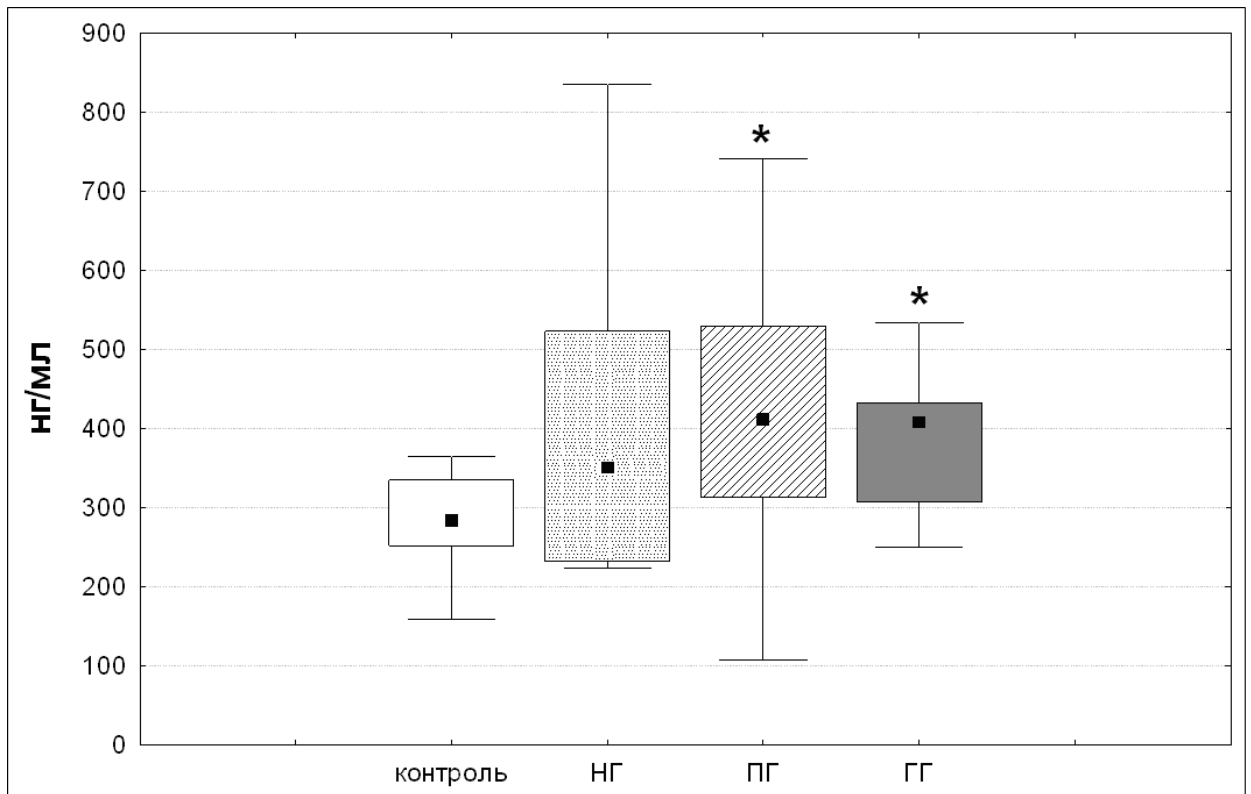


Рисунок 3.3.1 – Содержание белка S-100β в сыворотке крови у крыс после 15-кратного курса респираторных воздействий. Данные представлены как медиана ± 25/75 перцентили. * $p < 0,05$ – различия с контрольной группой. НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – пермиссивная гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия

Содержание белка S-100β в группе крыс, прошедших курс респираторных воздействий пермиссивной гиперкапнии, было на 44% больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). В группе животных, подвергнутых 15-кратным гиперкапнически-гипоксическим воздействиям, количество белка S-100β превышало аналогичный показатель контроля на 43% ($p < 0,05$).

Концентрация белка теплового шока HSP-70 в сыворотке крови была значительно выше в группах НГ и ГГ по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (рисунок 3.3.2). При этом концентрация HSP-70 в группе ГГ была выше, чем в группе ПГ ($p < 0,05$).

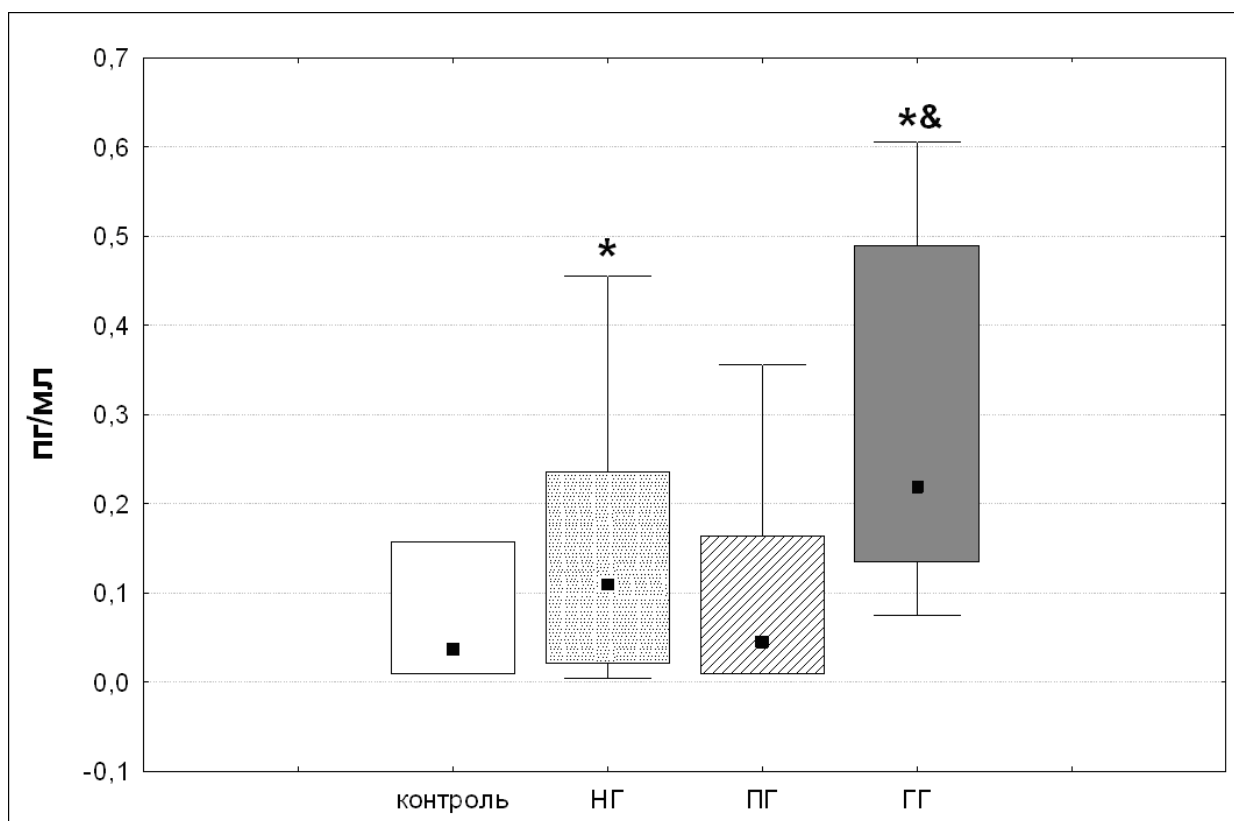


Рисунок 3.3.2 – Содержание HSP-70 в сыворотке крови у крыс после 15-кратного курса респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 перцентили. * $p < 0,05$ – различия с контрольной группой. & $p < 0,05$ – различия с группой ПГ. НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – перmissive гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия

При этом в группе НГ концентрация HSP-70 была почти в 2,7 раза выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$), а в группе ГГ – в 5,5 раза ($p < 0,05$). Также уровень HSP-70 в группе ГГ был значимо выше по сравнению с группой ПГ.

Экспериментальные данные третьей части диссертационной работы показывают, что нейропротекторные эффекты при воздействии гиперкапнической гипоксии, опосредованные увеличением синтеза белка S-100 β , преимущественно обусловлены действием углекислого газа, а не дефицита кислорода. При этом повышение экспрессии HSP-70, в основном, обусловлено действием гипоксии, но при ее сочетании с гиперкапнией этот эффект становится более выраженным.

3.4 Роль митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и А₁-рецепторов к аденозину в механизме нейропротекции при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии

Четвертая часть диссертационной работы, посвященная определению роли митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и А₁-рецепторов к аденозину в механизме нейропротекции при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии, состояла из 2-х экспериментальных серий, состоящих из 13 групп, включающих по 15 мышей в каждой. Группы животных различались по применению активатора или блокатора изучаемого механизма, их комбинации с изолированным и сочетанным воздействием гипоксии и гиперкапнии. Животные всех опытных групп через 15 минут после введения активатора/блокатора или физраствора подвергались процедуре однократного 30-минутного респираторного воздействия, соответственно назначению группы. Через 24 часа после процедуры прекондиционирования у всех животных оценивалась резистентность к ОНбГ.

В первой серии при исследовании роли митоK⁺_{АТФ}-каналов в механизме потенцирования гиперкапнией протекторного эффекта гипоксии получены следующие результаты (рисунок 3.4.1): в группе мышей, тренированных ГГ, значимо повысилась толерантность к ОНбГ ($p < 0,05$), при этом блокатор каналов у группы с аналогичным воздействием снизил эффект до контрольных значений ($p < 0,05$). Активатор каналов при сочетании с ГГ показал наибольшее увеличение параметра ВЖУГ ($p < 0,001$), однако значимых различий с группой изолированного воздействия ГГ не было выявлено. Активатор калиевых каналов при введении животным продемонстрировал повышение толерантности к ОНбГ ($p < 0,05$), но при сочетании с НГ и ПГ не оказал влияния на резистентность мышей. Это может быть обусловлено невысокой активностью препарата в примененной дозировке, однократностью введения и низкой интенсивностью

тренировочного воздействия. При введении животным блокатора каналов ни в одной из групп не зафиксировано повышения ВЖУГ.

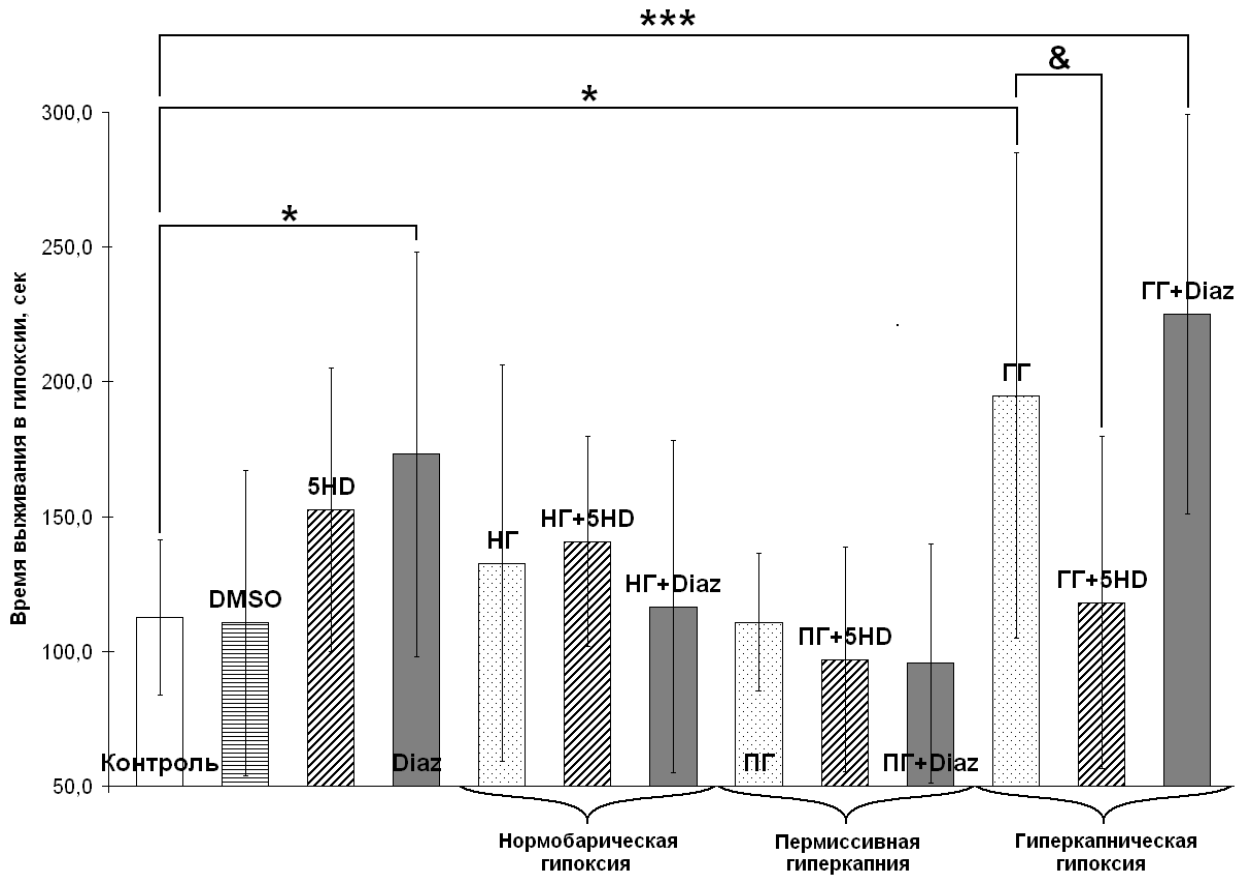


Рисунок 3.4.1 – Результаты первой серии исследования по изучению роли митоK⁺_{АТФ}-каналов. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD). 5-HD – 5-гидроксидеканоат; Diaz – Диазоксид; DMSO – Диметилсульфоксид; НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – пермиссивная гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия; *p<0,05 – различия с группами контроля и DMSO; ***p<0,001 – различия с группами контроля и DMSO; &p<0,05 – различия с группой ГГ

Во второй серии, сосредоточенной на изучении роли аденозиновых A1-рецепторов, получены следующие результаты (рисунок 3.4.2): у группы животных, подвергнутых воздействию ГГ, толерантность к ОНбГ увеличилась (p<0,001), при этом блокатор в сочетании с ГГ нивелировал положительный эффект (p<0,05), а активатор значимо не повлиял на эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии. В группе

НГ не наблюдалось увеличения толерантности к ОНБГ, а сочетание с введением блокатора или активатора не влияло на резистентность животных к гипоксии. В группе, получавшей гиперкапническое воздействие, наблюдалось повышение резистентности к ОНБГ по отношению к контролю ($p < 0,05$), однако введение блокатора не устраняло этот эффект ($p < 0,01$), а применение активатора стимулировало прирост ВЖУГ ($p < 0,01$), аналогично сочетанному воздействию гиперкапнии с гипоксией.

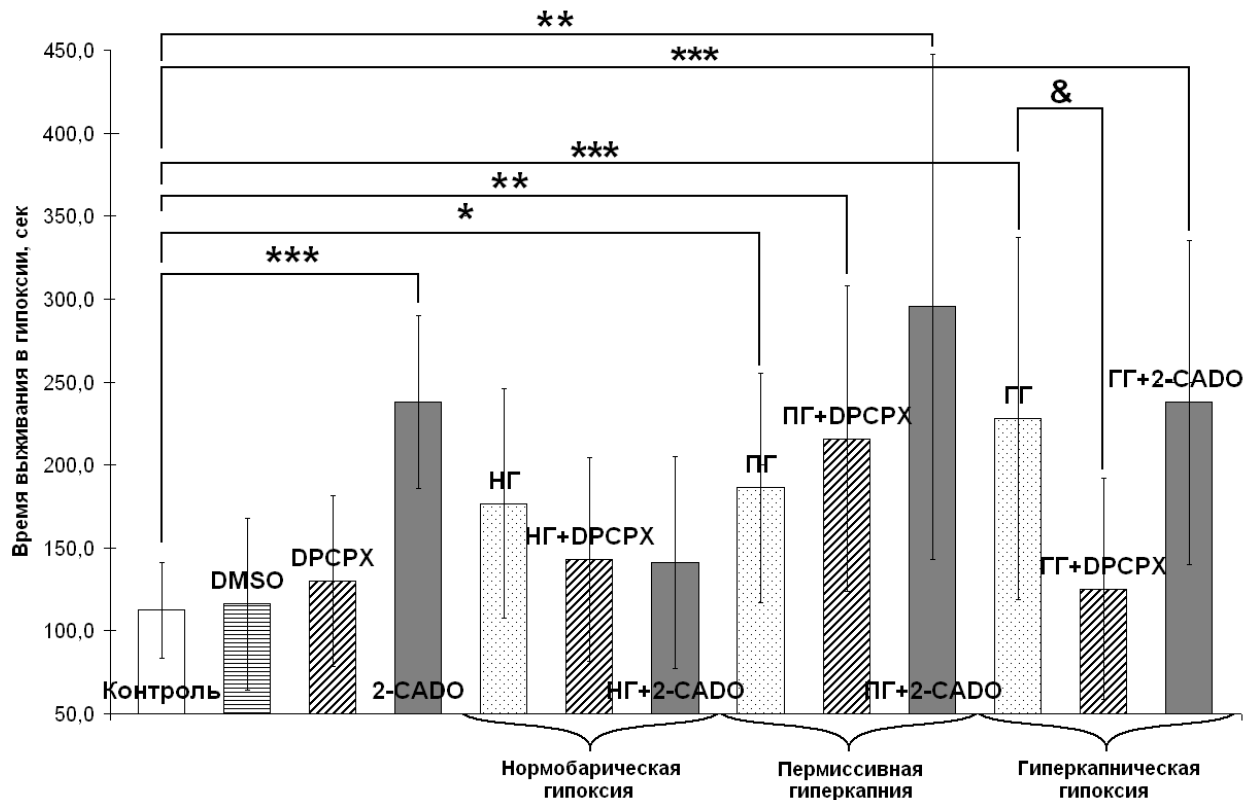


Рисунок 3.4.2 – Результаты второй серии исследования по изучению роли A_1 -аденозиновых рецепторов. Данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD). DPCPX – 1,3-дипропил-8-фенилксантин; 2-CADO – 2-хлораденозин; DMSO – Диметилсульфоксид; * $p < 0,05$ – различия с группой контроля и DMSO; ** $p < 0,01$ – различия с группой контроля и DMSO; *** $p < 0,05$ – различия с группой контроля и DMSO; & $p < 0,05$ – различия с группой ГГ.

Результаты заключительной части диссертационной работы свидетельствуют о том, что митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы и A_1 -рецепторы к аденозину имеют высокое значение в увеличении резистентности к острой гипоксии/ишемии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Однако в отношении аденозиновых рецепторов протекторный эффект сочетания дефицита кислорода и избытка углекислого газа реализуется без участия гиперкапнического компонента.

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Резистентность к острому дефициту кислорода у крыс после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии

В первой части исследования показана сравнительная эффективность гипоксического, гиперкапнического и гиперкапнически-гипоксического воздействия на резистентность крыс к острой гипоксии при различной длительности курса тренировок. Этот эксперимент был проведен с целью проверки гипотезы о возможном увеличении эффективности интервальной гипоксии при ее сочетании с перmissiveй гиперкапнией.

Толерантность к острой гипоксии рассматривается во многих экспериментальных работах. Субъективные критерии оценки применяются многими авторами и обладают значительной информативностью. В своей работе Shrivastava K. et al. [2008] осуществляли моделирование у крыс острой гипобарической гипоксии, эквивалентной высоте 10668 метров. В ходе эксперимента производилась регистрация времени агонального дыхания и времени выживания при гипоксии. Подобная методика применялась также у мышей, где моделировалась высота 10000 метров, со скоростью 50 м/с за 15 минут, и регистрировалось время полной остановки дыхания и смерти. Zhang K. et al. [2009], Lukyanova L.D. et al. [2009], Mironova G.D. et al. [2010] в своих исследованиях моделировали острую гипобарическую гипоксию, соответствующую высоте 11500 метров, и регистрировали время появления агонального дыхания.

В данном эксперименте для оценки резистентности моделировалась острая гипобарическая гипоксия, соответствующая гипоксии на высоте 11500 метров над уровнем моря. Это значение использовалось потому, что является

пороговым для выживания большинства животных [Shrivastava K. et al. 2008].

При гипоксии в первую очередь нарушается функция нейронов СА-1 области гиппокампа и утрачивается способность к сохранению нормальной двигательной активности [Zhao Y.D., Cheng S.Y., Ou S. et al., 2012]. Поэтому показатель ВПП позволяет определить порог чувствительности к тяжелой гипоксии. Известно, что появление патологического дыхания при воздействии острой гипоксии свидетельствует о тяжелых нарушениях функций дыхательного центра и истощении компенсаторных возможностей организма [St. John W.M., Knuth K.V., 1981; St. John W.M., 1996]. Поэтому параметр ВЖ свидетельствует о максимальной устойчивости организма к тяжелой гипоксии.

По данным литературы, используются различные варианты кратности гипоксического воздействия. Существует большое количество работ по исследованию эффективности 1-кратного гипоксического preconditionирования [Miller B.A., Perez R.S., Shah A.R. et al., 2001; XiL., Tekin D., GURSOY E. et al., 2002; Bernaudin M., Sharp F.R., 2004; Beguin P.C. et al., 2005]. По данным этих исследований, preconditionирующий эффект после гипоксического воздействия развивается при дыхании воздухом с PO_2 57-71 мм рт. ст. в течение 1-6 часов. Отсутствие подобного эффекта при 1-кратном воздействии нормобарической гипоксии в первой серии исследования можно объяснить малой длительностью экспозиции (20 мин) и более высокой концентрацией кислорода (PO_2 90 мм рт. ст.). Такие параметры гипоксического воздействия были выбраны в связи с их высокой эффективностью в сочетании с пермиссивной гиперкапнией (PCO_2 50 мм.рт.ст.) для профилактики экспериментального инсульта у крыс [Yakushev N.N., Vespilov A.G., Kulikov V.P. 2008].

В работе Lukyanova L.D et al. 2009] для повышения резистентности к острой гипоксии использовались 3-, 7-, 15- и 21-кратные воздействия нормобарической гипоксии. Описаны также 30-кратные [Neckar J., Parousek

E., Novakova O. et al., 2002; Yang C.C., Lin L.C., Wu M.S., Chien C.T., Lai M.K., 2009], 45-кратные [Meerson F.Z., Ustinova E.E., Orlova E.H., 1987] и 56-кратные [Chen W.J., Chen H.W., Yu S.L., et al., 2005] варианты гипоксического воздействия. В первой части исследования результаты по 3-, 7- и 15-кратному гипоксическому воздействию практически аналогичны данным по курсовому воздействию гипоксии, описанным Lukianova L.D. et al. [2009]. Так же, как и в цитируемой работе, резистентность максимально возрастала к 7 сеансу воздействия и в дальнейшем снижалась.

Использование перmissive гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии как средства увеличения резистентности к острой гипоксии не представлено в научной литературе. Исключение составляет одно более раннее исследование, показавшее увеличение коллатерального резерва мозгового кровообращения под влиянием курса гиперкапнически-гипоксических воздействий [Kulikov V.P., Bespalov A.G., Yakushev N.N., 2009]. Однако доказано, что углекислый газ оказывает протекторное действие на головной мозг при гипоксическом/ишемическом повреждении головного мозга у новорожденных и взрослых крыс [Vannucci R.C, Towfighi J. Et al., 1995]. Имеются статьи, описывающие положительное влияние гиперкапнии на калиевые каналы [Lindauer U., Vogt J., Hofer Schuh-S. et al., 2003], антиоксидантную систему [Zakynthinos S. Katsaounou P., Karatza M.H. et al., 2007] и кровотоков в легких [Chuang I.C., Dong H.P., Yang R.C. et al., 2010]. Также имеются данные, демонстрирующие ингибирование апоптоза при воздействии перmissive гиперкапнии [Zhou Q. et al., 2010]. Эти данные могут свидетельствовать в пользу выдвигаемой гипотезы о потенцировании гиперкапнией эффектов гипоксии, повышающих резистентность к острому гипоксическому воздействию. Основными механизмами этих эффектов гипоксии, вероятно, являются: повышение экспрессии мРНК в семействе ранних генов [Das D.R., Maulink N., 2006], активация K^+ _{АТФ}-канала под действием протеинкиназы С [Murphy E., 2004], активация сукцинатоксидазного пути окисления [De Silva M.M., Sartori A.,

Belisle E. et al., 2003] и репрограммирование генома редокс-чувствительным белком HIF-1 [Lukianova L.D., 2011].

В первых сериях исследования наиболее ранний эффект увеличения резистентности к острой гипоксии достигался уже при 1-кратном воздействии пермиссивной гиперкапнией. При этом резистентность возрастала пропорционально увеличению кратности воздействия. Наиболее выраженное увеличение наблюдалось к 7 и 15 сеансу, значительно превышая эффективность нормобарической гипоксии.

Использование 1- и 3-кратного воздействия гиперкапнической гипоксии для увеличения резистентности показало сходную динамику с пермиссивной гиперкапнией. Но к 7 сеансу воздействия гиперкапнической гипоксии резистентность значительно превысила показатели в других экспериментальных группах. Этот феномен может свидетельствовать о потенцировании гиперкапнией протекторных эффектов гипоксии. При этом доминирующим фактором является гиперкапния, так как ее эффективность при любой кратности воздействия была выше эффективности нормобарической гипоксии.

Все вышеизложенное свидетельствует в пользу сформулированной гипотезы о максимальной эффективности сочетания гиперкапнии и гипоксии в повышении резистентности организма к острому дефициту кислорода по сравнению с их изолированным воздействием в эквивалентных концентрациях кислорода и углекислого газа.

4.2 Формирование ишемической толерантности головного мозга крыс после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии

Во второй части исследования экспериментальная субтотальная ишемия головного мозга приводила к выраженному неврологическому дефициту у животных контрольной группы. В отличие от них у крыс

опытных групп, прошедших курс дыхательных тренировок, ишемия головного мозга сопровождалась значительно меньшим неврологическим дефицитом. Так, в группе гиперкапнической гипоксии неврологический дефицит был в среднем в 3 раза меньше, чем в контрольной группе. У животных, прошедших курс тренировок с нормобарической гипоксией и пермиссивной гиперкапнией, выраженность неврологического дефицита после экспериментальной ишемии мозга не различалась между этими группами. При этом неврологический дефицит после сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии был значительно меньше, чем после воздействия нормобарической гипоксии, но не различался с группой, подвергавшейся воздействию пермиссивной гиперкапнии.

Двигательно-координационные нарушения были наиболее выражены в контрольной группе. У животных из группы сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии время удержания животных на вращающемся стержне почти в 3 раза превышало показатели группы контроля. Это время в группах нормобарической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии было больше контроля в 2 и 2,5 раза, соответственно. Между опытными группами значимых различий в двигательных нарушениях выявлено не было.

Таким образом, проведенная экспериментальная серия исследования показала, что все виды дыхательных тренировок обладают значительной нейропротекторной эффективностью при экспериментальной ишемии головного мозга. Важнейшими механизмами нейропротекторных эффектов гиперкапнической гипоксии в данном случае могут быть: модулирование реактивности церебральных сосудов и увеличение перфузии головного мозга [Kulikov V.P. et al., 2009], активация антиоксидантной системы [Zakynthinos. S. et al., 2007], активация АТФ-зависимых K^+ -каналов на плазматической мембране клеток и внутренней мембране митохондрий [Lindauer. U. et al., 2003], активация антиапоптотических механизмов посредством ингибирования каспазы-3 [Zhou. Q. et al., 2010], ингибирование МРТ-поры

(mitochondrial permeability transition pore) [Gao X. et al., 2006], активация синтеза защитных внутриклеточных белков (HSP) [Sun Y. et al., 2011], активация репарации ДНК и подавление воспалительного процесса [Obrenovitch T.P., 2008], репрограммирование генома [Stenzel-Poore M.P. et al., 2007].

В литературе преобладают работы, посвященные эффективности гипоксического и ишемического прекондиционирования. В то же время нейропротекторная эффективность перmissive гиперкапнии исследовалась в режиме посткондиционирования [Zhou Q. et al., 2010]. Формирование отсроченной адаптации с помощью гиперкапнической гипоксии изучалось в ранних работах, где показано выраженное увеличение толерантности головного мозга к ишемии [Беспалов А.Г. и соавт., 2004]. Сравнительные исследования дыхательных тренировок в основном посвящены изучению эффективности различных вариантов гипоксических воздействий [Лукьянова Л.Д. и соавт., 2008]. В настоящем эксперименте при сравнительной оценке гипоксических, гиперкапнических и гиперкапнически-гипоксических тренировок показано, что гиперкапническая гипоксия оказывает наиболее выраженный нейропротективный эффект. Снижение неврологического дефицита при экспериментальной ишемии головного мозга вследствие изолированного гиперкапнического и гипоксического воздействия позволяет сделать вывод о том, что гиперкапния и гипоксия потенцируют нейропротекторные эффекты друг друга.

Сравнительное исследование нейропротекторной эффективности сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии, предшествующих фокальному ишемическому повреждению головного мозга крысы, было проведено с целью проверки гипотезы о возможном увеличении защитного эффекта нормобарической гипоксии при ее сочетании с permissive гиперкапнией на модели фокального инсульта.

В настоящее время предпочтение при выборе модели экспериментальной ишемии головного мозга отдается методикам фокального

ишемического повреждения, наиболее адекватно воспроизводящим клиническую картину ишемического инсульта [Pevsner P.H. et al., 2001; Jackman K. et al., 2011]. Основное требование, предъявляемое к подобным моделям, состоит в создании воспроизводимого из опыта в опыт постоянного по локализации и объему ишемического очага, что необходимо для количественной оценки степени повреждения мозга и защитного эффекта при использовании препаратов и методик, оказывающих нейропротекторный эффект. Этому требованию соответствует неинвазивный, позволяющий выбрать нужную локализацию, метод фотохимического тромбоза сосудов коры головного мозга [Watson B. et al., 1985]. Для оценки размеров ишемического повреждения при использовании данной модели пользуются в равной степени как количественным измерением объема инфаркта [Keiner S. et al., 2008; Liebigt S. et al., 2012], так и определением соотношения объема здоровой ткани к некротизированной [Pevsner P.H. et al., 2001; Kleinschnitz C. et al., 2008].

У всех животных в настоящей серии исследования были сформированы типичные фотохимические инфаркты 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 [Watson B.D. et al., 1985; Pevsner P.H. et al., 2001; Barth A.M. et al., 2011]. Морфологическая картина была сходной во всех экспериментальных группах, а отличия были обусловлены размером зоны инфаркта в головном мозге.

Неврологические проявления фокального инфаркта головного мозга у животных проявлялись неоднозначно в экспериментальных группах, подвергнутых сочетанному и изолированному воздействию гиперкапнии и гипоксии. Эффективнее других неврологический дефицит снижался у крыс, прошедших курс воздействия перmissiveй гиперкапнией и гиперкапнической гипоксией, а нормобарическая гипоксия не оказала

влияния на неврологический статус животных. Различная смертность в экспериментальных группах животных в целом отражает различную выраженность защитного эффекта сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии. В группе ГГ смертность была наименьшей, а в контрольной группе от отека головного мозга погибло больше всего животных.

Из литературных данных известно, что гипоксия снижает неврологические нарушения при ишемическом повреждении головного мозга. Но в исследованиях, где это было продемонстрировано ранее [Neckar J. et al., 2002; Chen W.J. et al., 2005; Yang C.C. et al., 2009], использовались более высокие уровни гипоксии (57-71 мм рт. ст.), а время воздействия было намного дольше (1-6 часов), чем в текущем эксперименте. При этом в планировании экспериментальной серии был учтен факт, что снижения неврологических нарушений 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 в предыдущей серии исследования. По результатам оценки неврологического статуса можно заключить, что положительные эффекты пермиссивной гиперкапнии доминируют над эффектами гипоксии при их сочетанном воздействии. С другой стороны, двигательные-координаторные нарушения были минимальны при воздействии нормобарической гипоксии и гиперкапнической гипоксии, а в группе пермиссивной гиперкапнии снижение нарушений было меньше, чем при других респираторных воздействиях. Этот факт может быть связан с меньшим влиянием углекислого газа, по сравнению с дефицитом кислорода, на координационную функцию головного мозга, так как гипоксическое воздействие раньше активирует протекцию наиболее чувствительных к кислородному голоданию областей гиппокампа [Yang C., et al., 2009]. Существуют данные о том, что большая гипоксическая чувствительность

отдельных тканей обуславливает их бОльшую восприимчивость к эффекту preconditionирования и повышению резистентности к гипоксии/ишемии [Lukyanova L.D. et al., 2011]. Как известно, в головном мозге гиппокамп является наиболее восприимчивым к острой гипоксии/ишемии [Barth A.M. et al., 2011]. Также известно, что гиппокамп является важнейшим звеном для хранения и обработки пространственной информации и координации [O'Keefe J. et al., 1971.], поэтому можно предположить, что метаболические и структурные изменения в этом органе объясняют улучшенную координацию движений крыс в ротарод-тесте после гипоксических воздействий. Кроме того, различный защитный эффект от применения нормобарической гипоксии и пермиссивной гиперкапнии при улучшении неврологического статуса и координации движений показывает, что наибольший защитный эффект при сочетании этих факторов требует дальнейшего изучения и является сложным природным явлением.

Все респираторные воздействия снижали объем инфаркта в очаге ишемического повреждения головного мозга крыс. Наименьшие объемы инфарктов были зарегистрированы в зоне фотохимического тромбоза у крыс группы гиперкапнически-гипоксического воздействия, а воздействия нормобарической гипоксией и пермиссивной гиперкапнией не показали взаимных различий. Это позволяет сделать вывод о потенцировании нейропротекторных эффектов этих воздействий при их сочетании.

Использование гиперкапнической гипоксии в качестве нейропротектора не представлено в научной литературе. Исключением является одно исследование, показавшее снижение неврологических нарушений при ишемии головного мозга под влиянием курса гиперкапнически-гипоксических воздействий [Якушев Н.Н. и соавт., 2008]. Доказано, что углекислый газ оказывает протекторное действие на головной мозг при гипоксическом/ишемическом повреждении [Vannucci RC. et al., 1995], ишемически-реперфузионном повреждении [Zhou Q. et al., 2010; Tao T. et al., 2013]. Имеются данные, свидетельствующие о положительном

влиянии гиперкапнии на митоK⁺_{АТФ}-каналы [Lindauer U. et al., 2003], антиоксидантную систему [Zakynthinos S. et al., 2007], ангиогенез [Siafakas N.M., et al., 2001] и кровотоков в легких [Chuang I.C. et al., 2010]. Также имеются данные, демонстрирующие ингибирование апоптоза при воздействии пермиссивной гиперкапнии [Zhou Q. et al., 2010; Тао Т. et al., 2013]. Эти данные могут свидетельствовать в пользу гипотезы о потенцировании гиперкапнией эффектов гипоксии, повышающих нейропротекторную эффективность при фокальном ишемическом повреждении головного мозга. Основными механизмами этих эффектов гипоксии, вероятно, являются: повышение экспрессии мРНК в семействе ранних генов [Das D.R. et al., 2006], активация митоK⁺_{АТФ}-каналов под действием протеинкиназы С [Murphy E., 2004], активация сукцинатоксидазного пути окисления [De Silva M.M. et al., 2003], репрограммирование генома редокс-чувствительным белком HIF-1 [Lukianova L.D., 2011], модулирование цереброваскулярной реактивности и увеличение перфузии в мозге [Kulikov V.P. et al., 2009].

Гиперкапническая гипоксия имеет больший нейропротекторный потенциал по сравнению с изолированным воздействием гиперкапнии и гипоксии. Этот феномен может свидетельствовать о потенцировании гиперкапнией протекторных эффектов гипоксии. При этом доминирующим фактором, по всей видимости, является гиперкапния, так как ее защитный эффект при оценке неврологических нарушений был выше защитного эффекта нормобарической гипоксии. Показанное в этой серии исследования отсутствие различий между гиперкапнической гипоксией и нормобарической гипоксией в ротарод-тесте не противоречит этому утверждению, т.к. результаты ротарод-теста менее значительны для интерпретации, чем результаты оценки неврологического статуса и измерения объема инфаркта головного мозга. Ротарод-тест показывает нарушения только двигательной координационной деятельности, в то время как определение неврологического статуса включает оценку нервной чувствительности,

рефлексы, двигательную и поведенческую активность, а снижение размеров зоны некроза наглядно демонстрирует эффект нейропротекции.

Таким образом, можно заключить, что сочетание гипоксии и гиперкапнии при респираторных воздействиях обладает максимальной нейропротекторной эффективностью по сравнению с их изолированным воздействием, а доминирующим фактором, по всей видимости, является гиперкапния, так как ее защитный эффект при оценке неврологических нарушений был выше защитного эффекта нормобарической гипоксии.

4.3 Механизмы формирования толерантности головного мозга крыс к гипоксии/ишемии после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии

В третьей части исследования было показано, что концентрация белка S-100 β в сыворотке крови крыс была выше, по отношению к контролю, после изолированного воздействия гиперкапнии и в сочетании с гипоксией.

Известно, что S-100 β высвобождается при структурных повреждениях клеток мозга и рекомендуется для использования в качестве раннего биомаркера повреждения [Ramlawi B., et al., 2006]. Увеличение S-100 β коррелирует с выраженностью и тяжестью инсульта [Jauch E.C. et al., 2006]. В клетках нервной системы S-100 β участвует в регуляции энергетического метаболизма [Acheson A., et al., 1996], кальциевого гомеостаза и дифференцировки клеток [Sorci G., et al., 2010], стимулирует репарацию и блокирует апоптоз [Donato R. et al., 2009], а также уменьшает активацию глиии нейротоксическими факторами [Bianchi R. et al., 2011]. В ряде экспериментальных работ показан нейропротекторный эффект белка S-100 β [Huttunen H. J. et al., 2004; Rickmann M. et al., 2006; Lin H.J. et al., 2011]. Исходя из этого, увеличение концентрации S-100 β в сыворотке крови крыс, подвергнутых гиперкапническому и гипоксически-гиперкапническому

воздействию, свидетельствует об активации вышеуказанных механизмов под влиянием гиперкапнии.

Концентрация белка теплового шока HSP-70 в сыворотке крови была значительно выше, по сравнению с группой контроля, после изолированного воздействия гипоксии и в сочетании с гиперкапнией.

HSP-70 необходим для клеточной репарации, выживания и обеспечения нормальных клеточных функций [Yellon D.M. et al., 1992]. Он является молекулярным шапероном, который предотвращает денатурацию белков и восстанавливает поврежденные белки в ответ на клеточный стресс [Willis M.S. et al., 2010]. Белок HSP-70 является важнейшим звеном нейропротекции при индуцированной толерантности головного мозга к ишемическому повреждению [Yenari M.A., 2002].

В работе [Lin H.J., et al., 2011] показано значительное усиление экспрессии белка HSP-70 под воздействием нормобарической гипоксии. Текущая экспериментальная серия исследования также показала рост концентрации HSP-70 в сыворотке крови животных, подвергнутых воздействию нормобарической гипоксии перед моделированием ишемического повреждения головного мозга. Однако перmissive гиперкапния не повлияла на увеличение концентрации этого белка. В то же время сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии показало значительное увеличение синтеза HSP-70. Это свидетельствует о выраженном нейропротекторном потенциале именно гиперкапнической гипоксии, превосходящем по эффективности изолированное воздействие гипоксии. Интересно, что перmissive гиперкапния не приводит к увеличению концентрации HSP-70, однако усиливает эффект гипоксии при их сочетании, что требует дальнейшего изучения.

Таким образом, нейропротекторные эффекты при воздействии гиперкапнической гипоксией, опосредованные увеличением синтеза белка S-100 β , преимущественно обусловлены действием углекислого газа, а не дефицита кислорода. Нейропротекторные эффекты HSP-70 обусловлены

гипоксией, но сочетанное воздействие гипоксией и гиперкапнией дает значительное увеличение синтеза HSP-70 по сравнению с изолированным воздействием гипоксией. Это свидетельствует о доминирующем влиянии гиперкапнии, по сравнению с гипоксией, в механизмах нейропротекции, связанных с белком S-100 β , и о потенцировании гиперкапнией нейропротекторной эффективности гипоксии, связанной с белком HSP-70.

В первой серии заключительной части исследования, посвященной изучению роли митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов, было продемонстрировано, что в группе мышей, тренированных ГГ, значимо повысилась толерантность к ОНБГ, при этом блокатор каналов у группы с аналогичным воздействием снизил эффект до контрольных значений. Активатор каналов при сочетании с ГГ показал наибольшее увеличение параметра ВЖУГ, однако значимых различий с группой изолированного воздействия ГГ не было выявлено. Активатор калиевых каналов при введении животным продемонстрировал повышение толерантности к ОНБГ, но при сочетании с НГ и ПГ не оказал влияния на резистентность мышей. Это может быть обусловлено невысокой активностью препарата в примененной дозировке, однократностью введения и низкой интенсивностью тренировочного воздействия. При введении животным блокатора каналов ни в одной из групп не зафиксировано повышения ВЖУГ.

Известно, что появление агонального дыхания при воздействии острой нормобарической гипоксии свидетельствует о тяжелых нарушениях функций дыхательного центра и истощении компенсаторных возможностей организма [St. John W.M., 1996]. Поэтому параметр ВЖУГ свидетельствует о максимальной устойчивости организма к тяжелой гипоксии.

Во второй серии, сосредоточенной на изучении роли аденозиновых A₁-рецепторов, показано, что у группы животных, подвергнутых воздействию ГГ, толерантность к ОНБГ увеличилась, при этом блокатор в сочетании с ГГ нивелировал положительный эффект, а активатор значимо не повлиял на эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии. В группе

НГ не наблюдалось увеличения толерантности к ОНБГ, а сочетание с введением блокатора или активатора не влияло на резистентность животных к гипоксии. В группе, получавшей гиперкапническое воздействие, наблюдалось повышение резистентности к ОНБГ по отношению к контролю, однако введение блокатора не устраняло этот эффект, а применение активатора стимулировало прирост ВЖУГ, аналогично сочетанному воздействию гиперкапнии с гипоксией.

В описанных экспериментальных сериях исследования показана роль митоK⁺_{АТФ}-каналов и A₁-рецепторов к аденозину в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии после гипоксического, гиперкапнического и гиперкапнически-гипоксического прекондиционирования.

Считается, что защитный эффект прекондиционирования является трехступенчатым и включает в себя последовательные триггерные и эффекторные механизмы [Yellon D.M. et al., 2003; Петрищев Н.Н., 2005]. В целом феномен прекондиционирования определяют три ключевые составляющие: аденозин – как основной триггер процесса, протеинкиназа С – как ведущий внутриклеточный мессенджер и АТФ-зависимые калиевые каналы – как конечный эффекторный белок [Liu Y. et al., 1998]. Влияние на эти составляющие тем или иным способом может либо угнетать, либо стимулировать прекондиционирование.

Митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы осуществляют вход калия в митохондрии по электрохимическому потенциалу и имеют большое значение в нормальной физиологии клеток, регулируя объем митохондрий и продукцию активных форм кислорода [Inagaki N., Gonoï T., Clement J.P., et al., 1996]. Многие авторы сходятся во мнении, что активация митоK⁺_{АТФ}-каналов играет важную роль в механизме гипоксического и ишемического прекондиционирования, благодаря стабилизации митохондриальных мембран, снижению метаболизма клетки и ингибированию апоптоза [Heurteaux C. et al., 1995; Garlid K.D. et al., 1997; Blondeau N. et al., 2000].

В 1999 г. Li и Roth установили, что для стимуляции preconditionирования необходима активация аденозиновых A_1 -рецепторов, а использование их антагониста блокирует формирование ишемической толерантности [Li B. et al., 1999]. При этом аденозиновый путь в механизме preconditionирования является самым коротким и реже повреждается, что позволяет считать его одним из базисных механизмов в формировании толерантности к ишемии/гипоксии [Heurteaux C. et al., 1995; Елисеев В.В. и соавт., 2007] .

Проведенная экспериментальная серия позволяет сделать заключение о том, что митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы и A_1 -рецепторы к аденозину, являющиеся важнейшими механизмами preconditionирования, имеют высокое значение в увеличении резистентности к острой гипоксии/ишемии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Однако в отношении аденозиновых рецепторов, этот механизм реализуется без участия гиперкапнического компонента, который, по всей видимости, запускает нейропротекцию без активации аденозиновых A_1 -рецепторов.

Таким образом, анализируя результаты третьей и четвертой части настоящей работы, направленные на изучение механизмов нейропротекции при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии, можно утверждать, что важнейшую роль в этом феномене играют: повышение синтеза шаперона HSP-70 и нейротрофического белка S-100 β , активация митохондриальных АТФ-зависимых K^+ -каналов и аденозиновых A_1 -рецепторов .

ВЫВОДЫ

1. Гиперкапническая гипоксия максимально повышает резистентность к острой гипобарической гипоксии по сравнению с нормобарической гипоксией и перmissiveй гиперкапнией в эквивалентных концентрациях кислорода и углекислого газа. Причем увеличение кратности предварительных гиперкапнически-гипоксических воздействий сопровождается пропорциональным возрастанием резистентности, а эффективность перmissiveй гиперкапнии при любой кратности воздействия оказывается выше эффективности нормобарической гипоксии.

2. Сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии перед моделированием субтотальной ишемии и фокального ишемического повреждения мозга оказывает максимальный нейропротекторный эффект по сравнению с перmissiveй гиперкапнией и нормобарической гипоксией.

3. Нейропротекторные эффекты при воздействии гиперкапнической гипоксии, опосредованные увеличением концентрации белка S-100 β , преимущественно обусловлены действием углекислого газа, а не дефицита кислорода. При этом повышение концентрации HSP-70 в основном обусловлено действием гипоксии, однако при ее сочетании с гиперкапнией этот эффект становится более выраженным.

4. Митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы и A₁-рецепторы к аденозину играют важную роль в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии/ишемии после сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии. Однако в отношении аденозиновых рецепторов протекторный эффект сочетания дефицита кислорода и избытка углекислого газа реализуется без участия гиперкапнического компонента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЖ – время жизни

ВЖУГ – время жизни в условиях гипоксии;

ВПП – время потери позы и двигательной активности;

ИФА – иммуноферментный анализ;

митоКАТФ-каналы – митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы;

ОГбГ – острая гипобарическая гипоксия;

ОНбГ – острая нормобарическая гипоксия;

2-CADO – 2-хлораденозин;

5-HD – 5-гидроксидеканоат;

DMSO – диметилсульфоксид;

DPCPX – 1,3-дипропил-8-фенилксантин;

Diaz – диазоксид;

NSS – Neurological Severity Score (Шкала тяжести неврологического дефицита);

PaCO₂ – парциальное давление углекислого газа в артериальной крови;

PCO₂ – парциальное давление углекислого газа во вдыхаемом воздухе;

PO₂ – парциальное давление кислорода во вдыхаемом воздухе;

HSP-70 – белок теплового шока с молекулярной массой 70 килодальтон;

S-100β – белок астроцитарной глиии

S-100-бета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян, Н.А. Горы и резистентность организма. / Н.А. Агаджанян, М.М. Миррахимов. // М. Медицинская книга. 1970. – 184 с.
2. Агаджанян, Н.А. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия (исторические предпосылки, теоретическое обоснование и результаты применения). / Н.А. Агаджанян, Р. Б. Стрелков, А. Я. Чижов // Прерывистая нормобарическая гипокситерапия. – 1997 . – Т. 1.
3. Агаджанян, Н.А. Адаптация к гипоксии как метод лечения и профилактики поражений слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки / Н.А. Агаджанян, О.Г. Степанов, Ю.В. Архипенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Т. 132, № 9. – С. 358-360.
4. Агаджанян, Н.А. Использование адаптации к гипоксии при окклюзии магистральных сосудов головного мозга. / Н.А. Агаджанян // Экспер. хирургия и анестезиол. – 1973. – № 5. – С. 59-62.
5. Баев, В.И. Адаптация крыс к острой гипоксии при дыхании воздухом с высоким парциальным давлением CO_2 и низким парциальным давлением O_2 . Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 150-летию со дня рождения академика Ивана Петровича Павлова, Санкт-Петербург, 15-17 сент., 1999 / В.И. Баев // Материалы конференции. –1999. – С. 84- 85.
6. Беспалов, А.Г. Тренировки с гиперкапнической гипоксией как средство увеличения толерантности головного мозга к ишемии. / А.Г. Беспалов, В.П. Куликов, А.В. Лепилов // Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2004. – № 3. – С. 60-63.
7. Блинков Н.А., Агаджанян Н.А., Арутюнова А.С. Влияние адаптации к высотной гипоксии на внутримозговую капиллярную сеть и на острое нарушение мозгового кровоснабжения после перевязки сонной артерии //

Нейрохирургическая патология сосудов головного мозга: Труды ин-та нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. – М. 1974. – С. 37-43.

8. Газенко, О.Г. Влияние космического полета на организм / О.Г Газенко, Б.С. Алякринский // Вестник АН СССР. – 1970. – № 11. – С. 40-46.
9. Глазачев, О.С. Особенности микроциркуляции у практически здоровых людей при острой гипоксии и в курсе интервальной гипоксической гипоксической тренировки / О.С. Глазачев, О.В. Бобылева // Физиология человека. – 2008. – № 6. – С. 92-99.
10. Глазкова, В.А. Кислотно–щелочное состояние крови при дыхании гиперкапническими газовыми смесями / В.А. Глазкова, И.Н. Черняков // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1975. – Т. 9, № 2. – С. 20-27.
11. Годухин, О.В. Роль Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов большой проводимости в прекондиционирующих эффектах гипоксии и постгипоксической гипервозбудимости нейронов поля CA1 гиппокампа *In vitro* / О.В. Годухин, С.Г. Левин // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2009. – № 5. – С. 622-629.
12. Горанчук, В.В. Гипокситерапия. / В.В. Горанчук Н.И. Сапова, А.О. Иванов. – СПб ЭЛБИ. – 2003. – 536 с.
13. Гусев, В.И. Ишемия головного мозга. / В.И. Гусев, В.И. Скворцова // М. Медицинская книга. – 2001.
14. Гусев В.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина. – 2001. – 328 с.
15. Гусев, Е.И. Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных совместных действий / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская. // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2007. – Т. 107, № 6. – С. 4-10.
16. Елисеев, В.В. Роль аденозина в регуляции физиологических функций организма. / В.В. Елисеев, Г.М. Полтавченко // СПб: Наука. – 2011.
17. Емельянова, Т.В. Ишемическое прекондиционирование как фактор защиты миокарда при проведении кардиохирургических операций. / Т.В.

- Емельянова, Д.А. Прут /Сиб. мед. жур. (Томск). –2009. – Vol. 24. – № 1. – Р 120-122.
18. Зверькова, Е.Е. Изменение общей резистентности крыс под влиянием повторяющихся гипоксически–гиперкапнических воздействий. / Е.Е. Зверькова // Физиологический журнал СССР. – 1980. – № 10. – С. 1575-1578.
 19. Зверькова, Е.Е. Повышение резистентности миокарда к питуитриновому повреждению путем адаптации к гипоксии. / Е.Е. Зверькова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1982. – № 5. – С. 42-44.
 20. Косицкий Г.И. Резервы нашего организма. – Москва: Просвещение. – 1993. – 159 с.
 21. Кошелев, В.Б. Влияние кратковременной адаптации к гипоксии на развитие острых нарушений мозгового кровообращения у крыс, генетически предрасположенных к эпилепсии. / В.Б. Кошелев // Бюлл. exper. биол. мед. – 1987. – Т. 103, № 3. – С. 373-376.
 22. Крушинский, А.Л. Кратковременная гипоксическая стимуляция повышает устойчивость крыс линии КМ в условиях акустического стресса. / А.Л. Крушинский // Вестн. Моск. Ун-та. – 2001. – № 3. – С. 46-49.
 23. Крушинский, А.Л. Оксид азота участвует в осуществлении механизмов кратковременной адаптации к гипоксии и реализации протекторного действия при развитии стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского–Молодкиной. / А.Л. Крушинский. // Изв. РАН. – Серия: Биологич. – 2007. – № 3. – С. 329-335.
 24. Куликов, В.П. Эффективность тренировок с гиперкапнической гипоксией в реабилитации ишемического повреждения головного мозга в эксперименте. / В.П. Куликов, А.Г. Беспалов, Н.Н. Якушев // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – № 2. – С. 59-61.
 25. Куликов, В.П. Влияние гипоксически–гиперкапнического прекондиционирования на гемостаз, гемореологию и толерантность головного мозга к ишемии. / В.П.Куликов, М.Г. Полухина, А.Г.Беспалов и

- др. // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – Т. 3, № 11. – С. 27-32.
26. Кулинский, В.И. Новые пути защиты головного мозга от глобальной ишемии / В.И. Кулинский, Л.Н. Минакина, С.С. Гаврилов и др. // Журнал неврологии и психиатрии. Инсульт. – 2006. – № 17. – С. 77-86.
27. Липовецкий Б.М. Инфаркт, инсульт, факторы риска. – М.: Наука. – 2007. – 301 с.
28. Лукьянова Л.Д., Ушаков И.Б. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. – Воронеж, Истоки. – 2004. – С. 590.
29. Лукьянова, Л.Д. Методические рекомендации к экспериментальному изучению препаратов, предназначенных для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. – М. Медицина, 1990.
30. Лукьянова, Л.Д. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. / Л.Д. Лукьянова, Э.Л. Германова, Р.А. Копаладзе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 4. – С. 380-384.
31. Лукьянова, Л.Д. Эффективность и механизм действия различных типов гипоксических тренировок. Возможность их оптимизации. / Л.Д. Лукьянова, Э.Л. Германова, Т.А. Цыбина и др. // Патогенез. – 2008. – № 3. – С. 32-36.
32. Маслов, Л.Н. Гипоксическое прекодиционирование, как новый подход в профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и сердца / Л.Н. Маслов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Том 17, № 3. – С. 27-36.
33. Пат. 2398600 РФ. Способ защиты жизненно важных органов кардиохирургических пациентов, оперированных в условиях искусственного кровообращения / Ю.К. Подоксенов, Т.В. Емельянова, В.М. Шипулин и др. / Приоритет изобретения. – 05 ноября 2008 г.

34. Петрищев, Н.Н. Сравнительная оценка эффективности локальной и дистантной ишемической адаптации миокарда у крыс. / Н.Н. Петрищев // Кардиология. – 2001. – Т. 41, № 10. – С. 53-56.
35. Петрищев, Н.Н. Новые способы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения: молекулярные механизмы и перспективы клинического применения. / Н.Н. Петрищев, Е.В. Шляхто, М.М. Галагудза // Кардиология. – 2007. – № 5. – С. 179-184.
36. Портниченко, А.Г. Роль калиевых каналов в сфекторных механизмах сердца. / А.Г. Портниченко, М.И. Василенко, О.О. Мойбенко // Патология. – 2008. – Vol. 5. – № 3. – P. 61- 62.
37. Семенов, Д.Г. Влияние гипоксического preconditionирования крыс *in vivo* на динамику содержания внутриклеточного кальция, индуцируемую долговременной аноксией в срезах мозга / Д.Г. Семенов, О.Л. Миллер, М.О. Самойлов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2004. – Vol. 138. – № 10. – С. 382-384.
38. Шахматов, И.И. Общие закономерности гемостатических реакций на однократные стрессорные воздействия. / И.И. Шахматов, В.М. Вдовин, В.И. Киселёв // Гемостазиология. – 2011. – № 2. – С. 61-65.
39. Шахпаронова, Н.В. Восстановление речи при ишемическом инсульте / Н.В. Шахпаронова, А.С. Кадыков // Вестник практической неврологии. – 2008. – № 6. – С. 57-59.
40. Шишнева, Е.В. Оптимизация защиты головного мозга путем применения методики гипоксического preconditionирования и анестезии ксеноном у кардиохирургических пациентов. / Е.В. Шишнева, Ю.К. Подоксенов, Т.В. Емельянова и др. // Патология кровообр. и кардиохирургия. – 2010. – № 3. – P. 40-44
41. Якушев, Н.Н. Профилактика инсульта с помощью гиперкапнически-гипоксического preconditionирования в эксперименте. / Н.Н. Якушев, А.Г. Беспалов, В.П. Куликов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 9. – С. 261-264.

42. Acheson, A. Non target-derived roles of the neurotrophins. / A. Acheson, R.M. Lindsay. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 1996. – Vol. 351. – № 1338. – P. 417-422.
43. Akca, O. Optimizing the intraoperative management of carbon dioxide concentration. / O. Akca // *Curr Opin Anaesthesiol.* – 2006. – Vol. 19. – P. 19-25.
44. Agadzhanian, N.A. Dynamics of external respiration and gas exchange during combined exposure to hypoxia and hypercapnia. / N.A. Agadzhanian, L.Kh. Bragin, G.A. Davydov et al. // *Hum Physiol.* – 1984. – № 10. – P. 282-288.
45. 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.
46. Amato, M. Effect of a protective ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. / M. Amato, C. Barbas, D. Medeiros // *N Engl J Med.* – 1998. – Vol. 338. – P. 347-354.
47. Atebara, N. Efficacy of anterior chamber paracentesis and carbogen in treating acute nonarteritic central retinal artery occlusion. / N. Atebara, G. Brown, J. Cater // *Ophthalmology.* – 1995. – Vol. 102. – P. 2029-2034.
48. Atkinson, J.L. The effect of carbon dioxide on the diameter of brain capillaries / J.L. Atkinson, R.E. Anderson, T.M. Sundt // *Brain Res.* – 1990. – Vol. 517. – P. 333-340.
49. 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.
50. Balduini, W. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. / W. Balduini, V. De Angelis, E. Mazzoni et al. // *Brain Res.* – 2000. – Vol. 859. – P. 318-325.
51. Barth, A.M. Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. / A.M. Barth, I. J.Mody // *Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. – P. 851-860.

52. 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.
53. Beguin, P.C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. / P.C.Beguin, M. Joyeux-Faure, D.Godin-Ribuot et al. // *J. Appl. Physiol.* – 2005. – Vol. 99. – № 3. – P. 1064-1069.
54. Bemaudin, M. Methods to detect hypoxia-induced ischemic tolerance in the brain. / M. Bemaudin, F.R. Sharp // *Methods Enzymol.* – 2004. – Vol. 381. – P. 399-416.
55. Bianchi, R. S100B Protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. / R. Bianchi, E. Kastrisianaki, I. Giambanco et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – № 9. – P. 7214-7226.
56. Blondeau, N. KATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. / N. Blondeau, H. Plamondon, C. Richelme et al. // *Neuroscience.* – 2000. – Vol. 100. – P. 465-474.
57. Blondeau, N. Cerebral tolerance: a promising choice towards new treatments for neurologic diseases / N. Blondeau, C. Heurteaux. // *Med Sci (Paris).* – 2004. – Vol. 20. – № 12. – P. 1109-1114.
58. Boscia, F. Permanent focal brain ischemia induces isoform-dependent changes in the pattern of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene expression in the ischemic core, periinfarct area, and intact brain regions. / F .Boscia, R. Gala, G. Pignataro et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – Vol. 26. – P. 502-517.
59. Brian, J.E. Jr. Recent insights into the regulation of cerebral circulation / J.E. Brian, F.M. Faraci, D.D. Heistad // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1996. – № 23. – P. 449-457.
60. 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. – P. 411-417.
61. Bruckner, B.A. Regulation of brain glucose transporters by glucose and oxygen deprivation. / B.A. Bruckner, C.V. Ammini, M.P. Otal et al. // *Metabolism.* – 1999. – Vol. 48. – P. 422-431.
62. Campochiaro, P.A. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. / P.A. Campochiaro. // *Prog Retin Eye Res.* – 2015. – № 49. – P. 67-81.
63. Chan, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. / P.H. Chan // *Stroke* — 1996. – Vol. 27. – P. 1124-1129.
64. Chen, J. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. / J. Chen, Y. Li, L.Wang et al. // *Stroke.* – 2001. – Vol. 32. – P. 1005-1011.
65. 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.
66. Chen, F. Rat cerebral ischemia induced with photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: a stroke model for MR imaging research. / F. Chen, Y. Suzuki, N. Nagai et al. // *MAGMA.* – 2004. – № 17. – P. 103-108.
67. 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.
68. Cho, H. Cerebral monitoring by means of oximetry and somatosensory evoked potentials during carotid endarterectomy. / H. Cho, E. Nemoto, H. Yonas et al. // *J Neurosurg.* – 1998. – Vol. 89. – P. 533-538.
69. 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. – P. 1493-501.

70. 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. – Vol. 188. – № 3. – P. 199-207.
71. Costalat, G. Cardio-ventilatory responses to poikilocapnic hypoxia and hypercapnia in trained breath-hold divers. / G. Costalat, A. Pichon, J.Coquart et al. // Respir Physiol Neurobiol. – 2014. – Vol. 1. – № 192. – P. 48-54.
72. Cui, J. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. / J. Cui, E.H. Holmes, T.G. Greene et al. // FASEB. – 2000. – № 14. – P. 955-967.
73. 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. – P. 169-181.
74. Danbolt, N.C. Glutamate uptake. / N.C. Danbolt // Prog Neurobiol. – 2001. – Vol. 65. – P. 1-105.
75. Das, D.R. Cardiac-genomic response following preconditioning stimuli. / D.R. Das, N. Maulink. // Cardiovasc Res. – 2006. – Vol. 70. – P. 254-263.
76. Das, S. Effects of chronic hypercapnia in the neonatal mouse lung and brain. / S. Das, Z. Du, S. Bassly et al. // Pediatr Pulmonol. – 2009. – Vol. 44. – P. 176-182.
77. Dell, R.B. Sample Size Determination. / R.B. Dell, S. Holleran, R. Ramakrishnan. // ILAR J. – 2002. – Vol. 43. – P. 207-213.
78. De Silva, M.M. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increase H₂O₂ release, and enhances K⁺ transport. / M.M. De Silva, A. Sartori, E. Belisle et al. // Am J Physiol Heart Cric Physiol. – 2003. – Vol. 285. – P. 1154-1162.
79. De Ryck, M. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. / M. De Ryck, J. Van Reempts, M. Borgers et al. // Stroke. – 1989. – Vol. 20. – P. 1383-1390.
80. Donato, R. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. / R. Donato, G. Sorci, F. Riuzzi et al. // Biochim. Biophys. – 2009. – Vol. 1793. – № 6. – P. 1008-1022.

81. Douen, A.G. Preconditioning with cortical spreading depression decreases intraischemic cerebral glutamate levels and down-regulates excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 from rat cerebral cortex plasma membranes. / A.G. Douen, K. Akiyama, M.J. Hogan et al. // *J Neurochem.* – 2000. – Vol. 75. – P. 812-818.
82. Douglas, R.M. Intermittent hypoxia and hypercapnia induce pulmonary artery atherosclerosis and ventricular dysfunction in low density lipoprotein receptor deficient mice / R.M. Douglas, K. Bowden, J. Pattison // *J Appl Physiol.* – 2015. – Vol. 115. – № 11. – P. 1694-1704.
83. Edmunds, N.J. Oxygen delivery and oxygen consumption in rat hindlimb during systemic hypoxia: role of adenosine. / N.J. Edmunds, J.M. Marshall // *The Journal of Physiology.* – 2001. – Vol. 536. – P. 927-935.
84. Faraco, C.C. The cumulative influence of hyperoxia and hypercapnia on blood oxygenation and R2 /C.C. Faraco, M.K. Strother, J.C. Siero et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2015. – Vol. 10. – № 168.
85. 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. – № 21. – P. 379-392.
86. 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. – P. 1076-1084.
87. 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. – P. 816–824.
88. Garlid, K.D. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of

- cardioprotection. / K.D. Garlid, P. Paucek, V. Yarov-Yarovoy et al. // *Circ. Res.* – 1997. – Vol. 81. – P. 1072-1082.
89. Gao, X. Effect of hypoxic preconditioning on neural cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in cerebral ischemia-reperfusion in rats. / X. Gao, C. Chang, D. Duan et al. // *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog Med. Sci.* – 2006. – № 26. – P. 17-20.
90. 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.
91. Gores, G.J. Intracellular pH during «chemical hypoxia» in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. / G.J. Gores, A.L. Nieminen, B.E. Wray et al. // *J Clin Invest.* – 1989. – Vol. 83. – P. 386-396.
92. 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 et al. // *Nitric Oxide.* – 2010. – Vol. 23. – № 4. – P. 289-299.
93. Glazier, S.S. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. / S.S. Glazier, D.M. O'Rourke, D.I. Graham et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1994. – № 14. – P. 545-553.
94. Glazychev, O.S. Optimization of clinical application of interval hypoxic training. / O.S. Glazychev // *Med Tekh.* – 2013. – № 3. – P. 21-24.
95. Grubb, R. The effects of changes in PaCO₂ on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time. / R. Grubb, M. Raichle, J. Eichling et al. // *Stroke.* – 1974. – Vol. 5. – P. 630-633.
96. Haubrich, C. Doppler flow velocity and intra-cranial pressure: responses to short-term mild hypocapnia help to assess the pressure-volume relationship after head injury. / C. Haubrich, L.A. Steiner, R.R. Diehl et al. // *Ultrasound Med Biol.* – 2013. – Vol. 39. – № 9. – P. 1521-1526.

97. Haubrich, C. Short-term moderate hypocapnia augments detection of optimal cerebral perfusion pressure. / C .Haubrich, L .Steiner, M .Kasprowicz et al. // J Neurotrauma. – 2011. – Vol. 28. – № 7. – P. 1133-1137.
98. Heurteaux, C. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. / C. Heurteaux, .I Lauritzen, C. Widmann et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 4666-4670.
99. Hickling, K. Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low volume, pressure limited ventilation with permissive hypercapnia: A prospective study. / K .Hickling, J .Walsh, S.Henderson et al. // Crit Care Med. – 1994. – Vol. 22. – P. 1568-1578.
100. 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. – P. 391-401.
101. Huang, P.L. Nitric oxide and cerebral ischemic preconditioning. / P.L. Huang // Cell Calcium. – 2004. – Vol. 36. – P. 323-329.
102. Huckstepp, R.T. CO₂-dependent opening of an inwardly rectifying K⁺ channel. / R.T. Huckstepp, N. Dale // Pflugers Arch. – 2011. – Vol. 461. – № 3. – P. 337-344.
103. Huttunen, H. J. Coregulation of Neurite Outgrowth and Cell Survival by Amphoterin and S100 Proteins through Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Activation. / H. J .Huttunen, J. Kuja-Panula, G. Sorci et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – № 275. – P. 40096-40105.
104. 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.
105. Inagaki, N. A family of sulfonylurea receptor determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. / N. Inagaki, T. Gono, J.P. Clement, et al. // Neuron. – 1996. – № 5. – P. 1011-1017.

106. Jackman, K. Modeling focal cerebral ischemia in vivo. / K. Jackman, A. Kunz, C. Iadecola. // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 793. – P. 195-209.
107. Jauch, E.C. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the national institute of neurological disorders and stroke recombinant tissue plasminogen activator stroke study. / E.C. Jauch, C. Lindsell, J. R. Broderick et al. // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37. – № 10. – P. 2508-2513.
108. 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. – P. 2867-2878.
109. Kavanagh, B.P. Anemia, hypoxia and hypercapnia thresholds. Lessons from physiological limits in critically ill patients. / B.P. Kavanagh // *Can J Anaesth.* – 1999. – Vol. 46. – P. 145-155.
110. Katz, L. Outcome model of asphyxial cardiac arrest in rats / L. Katz, U. Ebmeyer, P. Safar et al. // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 1995. – Vol. 15. – № 6. – P. 1032-1039.
111. Keiner, S. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. / Keiner S, Wurm F, Kunze A, et al. // *Glia.* – 2008. – Vol. 56. – P. 516-527.
112. Keynes, R.G. Garthwaite J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. / R.G. Keynes // *Curr Mol Med.* – 2004. – № 4. – P. 179-191.
113. 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 et al. // *J. Neurotrauma.* – 2004. – Vol. 21. – № 5. – P. 541-547.
114. Kleinschnitz, C. Blocking of platelets or intrinsic coagulation pathway-driven thrombosis does not prevent cerebral infarctions induced by photothrombosis. / C. Kleinschnitz, S. Braeuninger, M. Pham et al. // *Stroke.* – 2008. – Vol. 39. – P. 1262-1268.

115. Kontos, H. Regulation of cerebral circulation. / H .Kontos // *Annu Rev Physiol* – 1981. – Vol. 43. – P. 397-407.
116. Komori, M. Microcirculatory Responses to Acupuncture Stimulation and Phototherapy / M. Komori, K. Takada, Y. Tomizawa et al. // *Anesthesia & Analgesia*. – 2009. – Vol. 1108. – № 2. – P. 635-640.
117. 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. – Vol. 170. – P. 43-49.
118. Kulikov, V.P. The State of Cerebral Hemodynamics in Conditions of Prolonged Adaptation to Hypercapnic Hypoxia. / V.P. Kulikov, A.G .Bespalov, N.N. Yakushev // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2009. – Vol. 39. – № 3. – P. 269-273.
119. 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.
120. Kwasiborsk, P.J. Selected, biochemical markers of hypoxia. / P.J. Kwasiborski, P. Kowalczyk et al. // *Przeegl Lek*. – 2012. – Vol. 69. – № 3. – P. 115-119.
121. Laffey, J. Biological effects of hypercapnia. / J. Laffey, B. Kavanagh // *Intensive Care Med*. – 2000. – Vol. 26. – P. 133-138.
122. Laffey, J.G. Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury. / J.G. Laffey, D. Engelberts, B.P. Kavanagh // *Am J Resp Crit Care Med*. – 2000. – Vol. 161. – P. 141-146.
123. Li, B. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. / B. Li, S.Roth// *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 1999. – № 6. – P. 1200-1216.
124. Li, Y. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. / Y. Li, J.Wang, J.G. Sheng et al. // *J. Neurochem*. – 1998. – Vol. 71. – P. 1421-1428.

125. Liu, Y. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection. / Y. Liu, T. Sato, B. O'Rourke, E. Marban // *Circulation*. – 1998. – Vol. 97. – P. 2463-2469.
126. 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. – Vol. 26. – P. 181-198.
127. Lichtenwalner, R.J. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. / R.J. Lichtenwalner, J.M. Parent // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2006. – Vol. 26. – P. 1-20.
128. Liebigt, S. Effects of rehabilitative training and anti-inflammatory treatment on functional recovery and cellular reorganization following stroke. / S. Liebigt, N. Schlegel, J. Oberland et al. // *Exp Neurol*. – 2012. – Vol. 233. – P. 776-782.
129. 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. Niu et al. // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2011. – Vol. 121. – № 5. – P. 223-231.
130. Lindauer, U. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca²⁺-activated potassium channels. / U. Lindauer, J. Vogt, S. Schuh-Hofer et al. // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab*. – 2003. – № 10. – P. 1227-1238.
131. Lindauer, U. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca²⁺-activated potassium channels. / U. Lindauer, J. Vogt, S. Schuh-Hofer et al. // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2003. – Vol. 23. – P. 1227-1238.
132. 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. – Vol. 239. – P. 18-30.

133. Lucas, S.J. Alterations in cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity during 14 days at 5050 m. / S.J. Lucas, K.R. Burgess, K.N. Thomas et al. // *J Physiol.* – 2011. – № 1. – P. 741-753.
134. Lukyanova, L.D. Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in system regulation. / L.D. Lukyanova // *Patol Fiziol Eksp Ter.* – 2011. – Vol. 1. – P. 3-19.
135. Lukyanova, L.D. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. / L.D. Lukyanova, E.L. Germanova, R.A. Kopaladze // *Bull Exp Biol Med.* – 2009. – Vol. 147. – № 4. – P. 400-404.
136. Lukyanova, L.D. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. / L.D. Lukyanova, Y.I. Kirova // *Bull Exp Biol Med.* – 2011. – Vol. 15. – P. 1292-1296.
137. Lyons, O.D. Heart Failure and Sleep Apnea. / O.D. Lyons, T.D. Bradley // *Can J Cardiol.* – 2009. – Vol. 31. – № 7. – P. 898-908.
138. 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.* – 2001. – Vol. 93. – P. 173-179.
139. Manley, G. Cerebral oxygenation during hemorrhagic shock: Perils of hyperventilation and therapeutic potential of hypoventilation. / G .Manley, J. Hemphill, D. Morabito et al. // *J Trauma.* – 2000. – Vol. 48. – P. 1025-1033.
140. Manukhina, E.B. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. / E.B. Manukhina, H.F. Downey, R.T. Mallet // *Exp. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 231. – P. 343-365.
141. Mayanagi, K. The mitochondrial KATP channel opener BMS-191095 reduces neuronal damage after transient focal cerebral ischemia in rats. / K. Mayanagi, T. Gaspar, P.V. Katakam et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27. – P. 348-355.

142. Meerson, F.Z. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. / F.Z. Meerson, E.E. Ustinova, E.H. Orlova // *Clin. Cardiol.* – 1987. – Vol. 10. – № 12. – P. 783-789.
143. Miller, B.A. Cerebral protection by hypoxic preconditioning in the murine model of focal ischemia-reperfusion. /B.A. Miller // *Neuroreport.* – 2001. – Vol. 12. – № 8. – P. 1663-1669.
144. Miliaru, M. Cardiorespiratory responses to hypoxia and hypercapnia at rest in vocalists /M. Miliaru, I. Koji, K.Keisho et al. // *Jap. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 53. – № 1. – P. 17-24.
145. 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. 473-481.
146. 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. – P. 31-40.
147. Moro, M, A. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. / M.A. Moro, A. Almeida, J.P. Bolaños et al. // *Free Radical Biol Med.* – 2005. – Vol. 39. – P. 1291–1304.
148. Murphy, E. Primary and secondary signaling psthways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. / E. Murphy // *Circulation Research.* – 2004. – Vol. 94. – P. 7-16.
149. 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. – P. 565-572.
150. Neckar, J. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive / J. Neckar, E. Papousek et al. // *Basic Res. Cardiol.* – 2002. – Vol. 97. – № 2. – P. 161–167.

151. Nithianantharajah, J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. / J. Nithianantharajah, A.J. Hannan. // *Nat Rev Neurosci.* – 2006. – № 7. – P. 697-709.
152. Nomura, F. Effects of hypercarbic acidotic reperfusion on recovery of myocardial function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. / F. Nomura, M. Aoki, J.M. Forbess et al. // *Circulation.* – 1994. – Vol. 90. – P. 321-327.
153. Obrenovitch, T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia / T.P. Obrenovitch // *Physiol. Rev.* – 2008. – Vol. 88. – P. 211-247.
154. O’Croinin, D. Bench-to bedside review: Permissive hypercapnia. / D. O’Croinin, M. Chonghaile, B. Higgins et al. // *Crit Care.* – 2005. – Vol. 9. – P. 51-59.
155. 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. – № 16. – P. 915-922.
156. O’Keefe, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat / J. O’Keefe, J. Dostrovsky // *Brain Res.* – 1971. – Vol. 34. – P. 171-175.
157. Perez-Pinzon, M.A. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. / M.A. Perez-Pinzon, K.R. Dave, A.P. Raval // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – № 7. – P. 1150-1157.
158. Pedersen, S.F. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 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. – P. 1- 25.
159. 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. – Vol. 45. – P. 227-233.
160. 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. – P. 2566-2570.
161. Qi, L. Arterial carbon dioxide partial pressure influences CYP4A distribution in the rat brain. / L. Qi, L. Meng, Y. Li et al. // *Histol Histopathol.* –2012. – Vol. 27. – № 7. – P. 897-903.
162. Ramlawi, B. Serologic markers of brain injury and cognitive function after cardiopulmonary bypass. / B. Ramlawi, J.L. Rudolph, S. Mieno et al. // *Ann. Surg.* – 2006. – Vol. 244. – № 4. – P. 593-601.
163. Reddy, G.D. Regional blood flow changes in neonatal pigs in response to hypercapnia, hemorrhage and sciatic nerve stimulation / G.D. Reddy, N. Gootman, N.M. Buckley et al. // *Biol. Neonate.* – 1974. – Vol. 5. – № 6. – P. 249-262.
164. Rickmann, M. Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms. / M. Rickmann, J.R. Wolff, D.L. Meyer // *Brain Res.* – 1995. – Vol. 688. – P. 8-14.
165. Rybnikova, E. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factor pCREB and NF- κ B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia. / E. Rybnikova, T. Gluschenko, E.Tulkova et al. // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 106. – № 2. – P. 1450-1458.
166. Rybnikova, E. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus. / E. Rybnikova, T. Gluschenko, E. Tulkova et al. // *Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 65. – № 4. – P. 360-366.
167. 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. – P. 40-53.
168. Samra, S.K. Evaluation of a cerebral oximeter as a monitor of cerebral ischemia during carotid endarterectomy. / S.K. Samra, E.A. Dy, K .Welch et al. // *ANESTHESIOLOGY.* – 2000. – Vol. 93. – P. 964-970.

169. 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. – Vol. 17. – № 4. – P. 681-687.
170. Simon, R.P. Prior ischemic stress protects against experimental stroke. / R.P. Simon, M. Niiro, R. Gwinn // *Neurosci Lett.* – 1993. – Vol. 163. – P. 135-137.
171. Sharp, F.R. HIF1 and oxygen sensing in the brain. / F.R. Sharp, M.Bernaudin // *Nat Rev Neurosci.* – 2004. – № 5. – P. 437-448.
172. Sharp, F.R. Bernaudin M. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. / F.R. Sharp, R. Ran, A. Lu et al. // *NeuroRx.* – 2004. – Vol. 1. – № 1. – P. 26-35.
173. Shibata, K. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. / K. Shibata, N. Cregg, D. Engelberts et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1998. – Vol. 158. – P. 1578-1584.
174. Shimazaki, K. Reduced calcium elevation in hippocampal CA1 neurons of ischemia-tolerant gerbils. / K. Shimazaki, T. Nakamura, K. Nakamura et al. // *Neuroreport.* – 1998. – № 9. – P. 1875-1878.
175. Shrivastava, K. Cobalt supplementation promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to hypobaric hypoxia in rat brain. / K. Shrivastava, M.S. Ram, A. Bansal et al. // *High Alt Med Biol.* – 2008. – Vol. 9. – № 1. – P. 63-75.
176. Seubert, J. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway. / J. Seubert, B. Yang, J.A. Bradbury et al. // *Circ Res.* 2004. – 3. – Vol. 95. – № 5. – P. 506-514.
177. 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.
178. St. John, W.M. Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals. / W.M. St. John. // *J. Appl. Physiol.* – 1996. – Vol. 81. – P. 1865-1877.

179. Sorci, G. The many faces of S100B protein: when an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one. / G.Sorci, F.Riuzzi, C.Arcuri et al. // *Ital. J. Anat. Embryol.* – 2010. – Vol. 115. – № (1-2). – P. 147-151.
180. St. John, W.M. A characterization of respiratory pattern of gasping. /W.M. St. John, K.V. Knuth // *J. Appl. Physiol.* – 1981. – Vol. 50. – P. 984-993.
181. Steiger, H.J. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications / H.J. Steiger, D. Hanggi. // *Acta Neurochir.* – 2007. – Vol. 149. – № 1. – P. 1-10.
182. Stenzel-Poore, M.P. Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes. / M.P. Stenzel-Poore, S.L. Stevens, J.S. King et al. // *Stroke.* – 2007. – Vol. 38. – P. 680-685.
183. 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. – Vol. 26. P. 937-950.
184. 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. – Vol. 1533. – P. 52-62.
185. 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. – Vol. 95. – №6. – P. 868-874.
186. Vannucci, R.C. Brucklacher RM: Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxicischemic damage: An experimental study in the immature rat. /R.C. Vannucci, J. Towfighi, D.F. Heitjan // *Pediatrics.* – 1995. – Vol. 95. – P. 868-874.
187. Vannucci, S.J. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. / S.J. Vannucci, F. Maher, I.A. Simpson // *Glia.* – 1997. – Vol. 21. – P. 2-21.

188. Vannucci, R.C. Effect of carbon dioxide on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. / R.C. Vannucci, R.M. Brucklacher, S.J. Vannucci // *Pediatr Res.* – 1997. – Vol. 42. – P. 24-29.
189. Vannucci, R.C. Effect of extreme hypercapnia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. / R.C. Vannucci, J. Towfighi, R.M. Brucklacher et al. // *Pediatr Res.* – 2001. – Vol. 49. – P. 799-803.
190. Vannucci, R.C. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat / R.C. Vannucci, J. Towfighi, S.J. Vannucci // *J. Cereb Blood Flow Metab.* – 2004. – № 24. – P. 1090-1097.
191. Vannucci, R.C. Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: Pathologic and metabolic correlates. / R.C. Vannucci, J. Towfighi, S.J. Vannucci // *Neurochem.* – 1998. – Vol. 71. – № 3. – P. 1215-1220.
192. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. – 2000. – Vol. 342. – P. 1301-1308.
193. Verbree, J. Assessment of middle cerebral artery diameter during hypocapnia and hypercapnia in humans using ultra-high-field MRI. / J. Verbree, A.S. Bronzwaer, E. Ghariq et al. // *J Appl Physiol.* – 1985. – Vol. 117. – № 10. – P. 1084-1089.
194. Veselá, A. The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism. / A. Veselá, J. Wilhelm // *Physiol Res.* – 2002. – Vol. 51. – № 4. – P. 335-339.
195. Watson, B.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. / B.D. Watson, W.D. Dietrich, R. Busto et al. // *Ann Neurol.* – 1985. – № 17. – P. 497-504.
196. Willis, M.S. Hold me tight: Role of the heat shock protein family of chaperones in cardiac disease. / M.S. Willis, C. Patterson // *Circulation.* – 2010. – Vol. 122. – № 17. – P. 1740-1751.
197. Wilson, M.H. The Cerebral Venous System and Hypoxia. / M.H. Wilson, C.H. Imray // *J Appl Physiol* (1985). – 2016. – Vol. 120. – № 2. – P. 244-250.

198. XiL., Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced acute systemic hypoxia. *Am. J. Physiol. / XiL. D. Tekin, E. Gursoy et al. // Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – № 1. – P. 5-12.
199. XiL., Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced acute systemic hypoxia. / XiL., D. Tekin, E. Gursoy et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. 145-152.
200. Yakushev, N.N. Prevention of experimental stroke by hypercapnic-hypoxic preconditioning. / N.N. Yakushev, A.G. Bessalov, V.P. Kulikov // *Bull Exp Biol Med.* – 2008. – Vol. 146. – № 3. – P. 289-290.
201. Yan, 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.
202. Yellon, D.M. Stress proteins and myocardial protection. / D.M. Yellon, D.S. Latchman // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1992. – Vol. 24. – № 2. – P. 113-124.
203. Yenari, M.A. Heat shock proteins and neuroprotection. / M.A. Yenari // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2002. – Vol. 513. – P. 281-299.
204. Yellon, D.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. / D.M. Yellon, J.M. Downey // *Physiol Rev.* – 2003. – Vol. 83. – P. 1113-1151.
205. 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. – P. 62-68.
206. Zhang, K. Preinduction of HSP70 promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to acute hypobaric hypoxia in mouse brain. / K. Zhang, T. Zhao, X. Huang et al. // *Cell Stress Chaperones.* – 2009. – Vol. 14. – № 4. – P. 407-415.
207. 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.

208. Zhao, T. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A (1) receptors: evidence from gene-knockout mice / T. Zhao, L. Xi, J. Chelliah et al. // *Circulation*. – 2000. – № 1. – P. 902-907.
209. 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.
210. 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.
211. Zhang, S.X. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. / S.X. Zhang, J.J. Miller, D. Gozal et al. // *J. Appl. Physiol*. – 2004. – Vol. 96. – P. 392-397.
212. 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. – P. 397-404.
213. 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. – Vol. 112. – P. 288-297.
214. Zhou, W. Hypercapnia and hypocapnia in neonates. / W. Zhou, W. Liu // *World J Pediatr*. – 2008. – Vol. 4. – P. 192-196.