

На правах рукописи



Крюков Иван Александрович

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА КСЕНОНА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ
ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.3.3. Патологическая физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научно–клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Ершов Антон Валерьевич**

Официальные оппоненты:

Григорьев Евгений Валерьевич - доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе, ведущий научный сотрудник лаборатории анестезиологии, реаниматологии и патофизиологии критических состояний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Шакова Фатимат Мухамедовна - доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «5» декабря 2024 г. в 15:00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.246.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно–клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР), адрес: 107031, г. Москва, ул. Петровка, дом 25, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно–клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР), адрес сайта <https://fnkccr.ru/home/dissertacionnyj-sovetv2/results/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Врио Ученого секретаря
Диссертационного совета 24.1.246.02
доктор медицинских наук, доцент



Кузовлев А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Повреждения центральной нервной системы из-за ишемического воздействия – это серьёзная и актуальная проблема в сфере здравоохранения [Мороз В.В., Поздняков Д.И. и соавт., 2021]. Ишемия и реперфузия являются ведущими патогенетическими факторами при черепно-мозговой травме, ишемическом инсульте, остановке кровообращения [Долгих В.Т., Голубев А.М. и соавт., 2023]., а также при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях головного мозга [Галкин А., Острейков И.Ф. и соавт., 2019]. Среди причин смерти во всем мире инсульт занимает второе место, а число лиц, ставших инвалидами вследствие перенесенного инсульта, приближается к 1 миллиону [Рахматова Д.И., Писарев В.М. и соавт., 2022].

Головной мозг находится в тесной зависимости от уровня энергетического обмена, обусловленного своевременным поступлением глюкозы и кислорода. Нарушение газообмена или кровоснабжения головного мозга приводит к запуску нейрометаболических и нейромедиаторных процессов [Белобородова Н.В., Шевелев О.А. и соавт., 2022], приводящих к ишемическому повреждению нервной ткани, среди которых можно выделить три основных: во-первых, прямое повреждение клеток, вызванное ишемией [Onufriev M.V. et al., 2010], во-вторых, сосудистая обструкция, вызванная ишемией, приводит к чрезмерной продукции активных форм кислорода, воспаление, вызванное ишемией, является дополнительным фактором, который приводит к дальнейшему повреждению нейронов после инсульта [Hu H. et al., 2019].

Фермент гликоген-синтаза киназа-3 β (ГСК-3 β) участвует в развитии патологических реакций, запущенных опосредованной N-метил-D-аспартата (NMDA)-рецепторами, эксайтотоксичности. Данный фермент играет фундаментальную роль в процессах нейропластичности и нейродегенерации [Лихванцев В.В. и соавт., 2022]. Уникальность ГСК-3 β в регуляции клеточных функций обусловлена способностью влиять на активность множества белков, в свою очередь и ее активность опосредована большим количеством внеклеточных стимулов [Иванова С.А., Кузовлев А.Н. и соавт., 2014]. Активация и блокировка ГСК-3 β в глутаматергических синапсах играет важную роль в синаптической пластичности, лежащей в основе сна, процессов обучения и памяти [Brabley C.A. et al., 2012]. Ингибирование данного фермента стимулирует выработку шаперонов, являющихся нейропротективными факторами, и блокирует проапоптотический фермент – каспазу-3, что в целом реализуется как нейропротективный эффект [Поздняков Д.И. и соавт., 2021]. ГСК-

З β регулирует проницаемость митохондриальной поры и защищает клетку от ишемического повреждения [Zorov D.V. et al., 2009].

Кальцийсвязывающий протеин S100b активно изучается учеными всего мира в качестве биомаркера различных повреждений головного мозга [Park D.W. et al., 2019]. В сыворотке крови концентрация белка S100b варьирует в зависимости от активности нейрогенеза, дифференцировки нервных клеток, некротической и апоптотической гибели нейроцитов [Петрова М.В., Сальникова Л.Ф. и соавт., 2021]. В зависимости от концентрации в крови белок S100b проявляет либо нейропротекторную, либо нейротоксическую функцию [Slegina A. et al., 2020]. В низкой концентрации белок S100b проявляет нейропротективные свойства за счет блокировки NMDA-рецепторов и действует как фактор роста и дифференцировки нейронов и глии [Dimopoulos C. et al., 2019]. В высоких концентрациях S100b оказывает токсические и провоспалительные эффекты [Michetti F. et al., 2019]. Существуют предположения об участии белка S100b в развитии когнитивного дефицита за счет активации RAGE-рецепторов и последующего увеличения экспрессии фактора некроза опухоли α [Moulin S. et al., 2015].

Уже в первые минуты и часы после перенесенной ишемии реализуется патологический каскад глутаматной эксайтотоксичности. На протяжении 72 часов в зоне пенумбры развиваются апоптотические процессы в нейронах и глиоцитах, что в дальнейшем может приводить к развитию неврологического дефицита, когнитивных нарушений, постишемической энцефалопатии [Laitio T. et al., 2018]. Данные факты подчеркивают необходимость изучения молекулярных механизмов нейропротекции и поиск фармакологических средств коррекции. В настоящее время основными стратегиями лечения пациентов с острым ишемическим инсультом являются реперфузионная терапия и нейропротекция [Танащян А.А. и соавт., 2022].

Известно, что благородные газы проявляют широкий спектр биологических эффектов, таких как антиадгезивные свойства, защита тканей, анестезия, нейропротекция, влияние на память, обезболивание и ингибирование апоптоза [Kulesh A. et al., 2018]. Одним из газов, широко изучающийся исследователями, является ксенон. Он обладает противовоспалительным, ноотропным, нейропротекторным, иммуностимулирующим, вазодилатирующим, антиаритмическим, кардиотоническим действием, применяется в лечении психических расстройств [Потиевская В.И. соавт., 2017].

Основной механизм действия анестезии и нейропротекции ксенона заключается в антагонизме NMDA-рецепторов [Maze M. et al., 2020]. Результаты исследований демонстрируют наличие нейропротективных свойств у ксенона. Сообщается, что ксенон способен защитить нейрональные культуры клеток от повреждений, вызванных NMDA,

глутаматом, или кислородно-глюкозной депривацией [Гребенчиков О.А. соавт., 2022]. Ксенон ингибирует эффекты эксайтотоксичности, ограничивая область распространения оксидативного стресса в тканях, путем блокирования чрезмерной стимуляции NMDA-рецепторов [Lavaur J. et al., 2016]. Таким образом, изучение механизмов действия и эффективности инертного газа ксенона при ишемическом повреждении головного мозга в результате инсульта является перспективным направлением.

Цель исследования:

Определить влияние различной длительности ингаляции ксенона на тяжесть повреждения головного мозга при экспериментальном ишемическом инсульте.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние ингаляции ксенона 0,5 МАК при различной экспозиции на объем повреждения и отек головного мозга при экспериментальном инсульте.
2. Определить влияние ксенона 0,5 МАК при различной экспозиции на содержание фермента гликоген-синтазы киназы-3 β и уровень фосфорилирования фермента гликоген-синтазы киназы-3 β в перифокальной зоне ишемического инсульта.
3. Определить влияние ксенона 0,5 МАК при различной экспозиции на концентрацию белка S100b в сыворотке крови в динамике постишемического периода.
4. Подобрать наиболее эффективную продолжительность ингаляции ксенона 0,5 МАК для снижения выраженности неврологических и когнитивных нарушений при ишемическом инсульте.

Научная новизна

Проведен сравнительный комплексный анализ результатов лучевой диагностики и морфологических исследований влияния ингаляций ксенона 0,5 МАК различной экспозиции после перенесенной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). Изучено воздействие кратковременной (30 минут) и длительной (60 и 120 минут) ингаляции ксенона 0,5 МАК на объем ишемического повреждения и содержание фермента гликоген-синтазы киназы-3 β и ее фосфорилированной формы в головном мозге крыс. Установлена динамика концентрации белка нейронального повреждения S100b в сыворотке крови в постишемическом периоде. Проведено исследование неврологического дефицита и когнитивных способностей животных, не получавших и получавших ингаляции ксенона 0,5 МАК различной продолжительности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что ОСМА приводит к развитию ишемического инсульта, увеличению концентрации белка S100b и снижению активности фосфорилированной формы фермента гликоген-синтазы киназы-3 β . Структурно-метаболические изменения при ОСМА приводят

к значительному неврологическому дефициту и снижению способности к обучению. Ингаляция ксенона 0,5 МАК при экспозиции 30 минут после восстановления кровотока оказывает положительное влияние на течение постишемического периода, однако изменения изученных показателей не являются статистически значимыми и носят характер тенденции. Увеличение продолжительности ингаляции до 60 минут оказывает значительный выраженный положительный эффект на структурно-метаболические показатели, способствует уменьшению размеров ишемического повреждения, нормализации концентрации белка S100b и повышению активности фосфорилированной формы фермента гликоген-синтазы киназы-3β. Дальнейшее увеличение экспозиции ксенона 0,5 МАК до 120 минут оказывает сопоставимый эффект, снижает неврологический дефицит и улучшает когнитивные способности.

Полученные сведения о функционально-метаболических изменениях под влиянием ксенона в концентрации 0,5 МАК в постишемическом периоде имеют важное значение для патофизиологических исследований. Данные могут быть использованы в образовательных программах медицинских вузов для изучения процессов повреждения и восстановления нервной системы при нарушениях мозгового кровообращения. Кроме того, полученные сведения могут являться теоретической базой для изучения нейропротективного влияния ингаляций ксенона 0,5 МАК в клинической практике.

Методология и методы работы

В исследование включено 190 крыс-самцов линии Wistar весом 300–350 г. Протокол исследования утвержден на заседании Локального этического комитета. Все эксперименты на лабораторных животных проведены в строгом соответствии с существующими международными и российскими нормативными правовыми актами. Моделирование фокальной ишемии проводили по методу Лонга с незначительными модификациями. В качестве анестезии использовали 12% раствор хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг веса животного, введенный внутривентриально. В контрольной группе подавали кислородно-воздушную смесь, а в группах исследования – ксенон 0,5 МАК при экспозиции 30, 60 и 120 мин. Ложнооперированные животные подвергались тем же манипуляциям, за исключением введения силиконовой нити в наружную сонную артерию и создания окклюзии, также они не получали ингаляционной терапии.

На 1-е сутки оценивали объем очага ишемического инсульта и перифокального отека по данным МРТ, а также объем очага ишемического инсульта на 7-е сутки по данным TTC-метода. У крыс забор венозной крови проводился на 1-й, 3-й и 7-й день из хвостовой вены.

На 7-е сутки после моделирования ишемии забирали образцы ткани головного мозга в количестве 500 мг в перифокальной зоне ишемического инсульта для определения

активности фермента ГСК-3 β и его фосфорилированной формы. Неврологический дефицит и когнитивные функции исследовались на 14-е сутки.

В ходе выполнения экспериментальной работы было оценено влияние ксенона 0,5 МАК при экспозиции 30, 60 и 120 мин. на выраженность когнитивных нарушений и неврологического дефицита, объём очага ишемического инсульта и перифокального отёка головного мозга, активность фермента ГСК-3 β и его фосфорилированной формы, а также динамику концентрации белка S100b.

Статистическая обработка данных производилась с использованием прикладного программного обеспечения Excel 2019 («Microsoft», США), Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.), MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba).

Положения, выносимые на защиту:

1. При экспериментальном инсульте по методу Лонга наблюдаются нарушения в виде ишемического повреждения головного мозга, перифокального отека, что клинически проявляется неврологическим дефицитом, снижением когнитивных способностей, а также приводит к снижению уровня фосфорилированной формы гликоген-синтазы киназы-3 β в перифокальной зоне ишемического инсульта и увеличению концентрации белка S100b в сыворотке крови в течение постишемического периода.

2. Ингаляция ксенона 0,5 МАК в течение 60 и 120 минут оказывает нейропротективное действие, способствует уменьшению объема ишемического повреждения и перифокального отека, уменьшению неврологического и когнитивного дефицита, нормализации уровня фосфо-ГСК 3 β в перифокальной зоне ишемического инсульта, менее выраженному повышению концентрации белка S100b и его нормализации в динамике постишемического периода.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность научной работы подтверждают: достаточное суммарное количество лабораторных животных, исследуемые группы и дизайн исследования грамотно сформированы и соответствуют поставленным задачам, методическая идентичность моделирования патологии; широкий спектр выполненных исследований, каждое из которых ранее применялось в мировой и российской практике.

Материалы и основные положения диссертации представлены в виде докладов на Всероссийском конгрессе с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (г. Москва, Россия, 1–3 июня 2023 года); на Форуме анестезиологов и реаниматологов России «XXI Съезд федерации анестезиологов и реаниматологов» (Санкт-Петербург, Россия, 14–16 октября, 2023 года); Юбилейной XXV Всероссийской конференции с международным участием

«Жизнеобеспечение при критических состояниях» (г. Москва, Россия, 10–11 ноября 2023 года).

Апробация работы

Апробация диссертации состоялась «11» апреля 2024г. на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно–клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР) (№ 05/24 от «11» апреля 2024г.).

Внедрение результатов исследования

Основные положения диссертации внедрены в образовательный процесс кафедр анестезиологии и реаниматологии, общей патологии Института высшего и дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Личный вклад автора

Результаты исследования получены при непосредственном участии диссертанта. Проведена обработка литературных данных отечественных и иностранных источников по теме диссертации. Автором был предложен ряд методологических и технических решений, способствующих получению наглядных и достоверных результатов. Также автором самостоятельно выполнялась статистическая обработка полученного материала, подготовка научных публикаций по теме исследования и представление результатов в рамках докладов на конференциях.

Объём и структура диссертации

Материалы изложены в 4 главах: актуальность работы рассмотрена в литературном обзоре, в главе 2 подробно описаны материалы и методы, в главе 3 представлены результаты собственных исследований, глава 4 содержит обсуждение полученных данных с привлечением современных литературных источников. Работа включает 111 страниц, проиллюстрирована 4 таблицами и 25 рисунками. В список литературы вошли 209 источников, из которых 69 отечественных и 140 иностранных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует шифру научной специальности: 3.3.3. Патологическая физиология. Диссертация соответствует формуле специальности и области исследования согласно пункту 11: разработка новых путей этиотропной и патогенетической терапии с учетом взаимодействия лечебных мероприятий с защитно–приспособительными реакциями организма.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включено 190 крыс-самцов линии Wistar весом 300–350 г. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

При проведении эксперимента моделировали фокальную ишемию, используя метод Лонга с незначительными модификациями. В качестве анестезиологического пособия применяли внутрибрюшинное введение 12%-го раствора хлоралгидрата из расчета 300 мг/кг веса животного. После обработки операционного поля 0,05%-м раствором хлоргексидина делали срединный разрез в области шеи с правой стороны и выделяли общую сонную артерию, наружную сонную артерию и внутреннюю сонную артерию. После пережатия сосудистой клипсой общей сонной артерии на внутреннюю сонную артерию накладывали лигатуру из викрила № 3 (Рисунок 2).

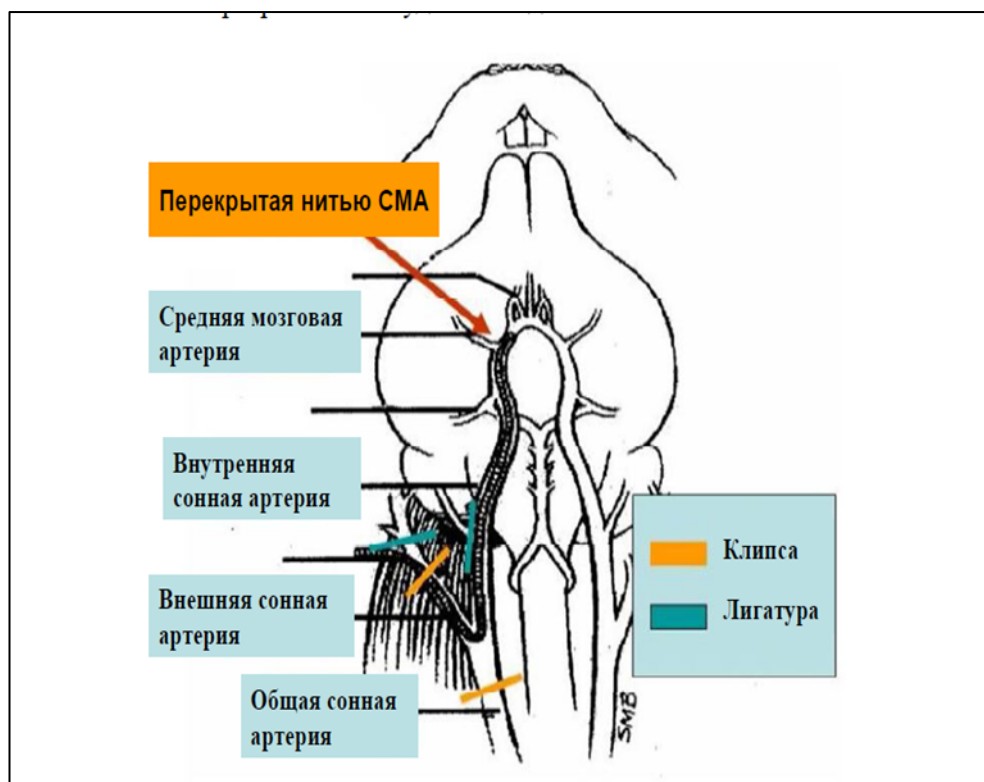


Рисунок 2 – Моделирование фокальной ишемии головного мозга крыс по методу Лонга

Наружную сонную артерию пересекали сосудистыми ножницами на расстоянии 3–5 мм от ее бифуркации. Через отрезок наружной сонной артерии во внутреннюю сонную артерию вводили нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, покрытую силиконом и смоченную в растворе гепарина, на глубину 19–21 мм до перекрытия СМА с последующей фиксацией сосудистой клипсой на внутренней сонной артерии, тем самым создавая ОСМА на 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне СМА.

После операции животные помещались в герметичную камеру, где животным контрольной группы подавали кислородно-воздушную смесь, а животным в группах исследования – ксенон 0,5 МАК с экспозицией 30, 60 или 120 минут. Ложнооперированные животные подвергались тем же манипуляциям, за исключением введения силиконовой нити в наружную сонную артерию и создания окклюзии, также они не получали ингаляционной терапии.

Распределение животных по группам эксперимента и методам исследования представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Распределение животных по группам эксперимента и методам исследования

| Группы | Количество животных | | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-------|
| | Нейровизуализация (МРТ, ТТС-метод) | Неврологический и когнитивный статус | Лабораторные исследования | Всего |
| Ложнооперированные | 10 | 10 | 10 | 30 |
| Контроль (воздушно-кислородная смесь) | | | | |
| 30 минут | 10 | 10 | – | 20 |
| 60 минут | 10 | 10 | – | 20 |
| 120 минут | 10 | 10 | 10 | 30 |
| Ксенон 0,5 МАК | | | | |
| 30 минут | 10 | 10 | 10 | 30 |
| 60 минут | 10 | 10 | 10 | 30 |
| 120 минут | 10 | 10 | 10 | 30 |
| Всего: | 70 | 70 | 50 | 190 |

Для нейровизуализации использовалась магнитно-резонансная томография. Для проведения анестезии использовали внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозировке 300 мг/кг массы тела. Исследование головного мозга проводилось по стандартному протоколу МРТ с получением T2-взвешенных изображений. После получения T2-взвешенных МР-томографических изображений проводили морфометрический анализ объема ишемического инсульта и зоны перифокального отека.

Макроскопическое исследование головного мозга проводили с использованием специального красителя – 2,3,5-трифенилтетразолия гидрохлорида (ТТС). Используя специальную форму с пазами для точной резки, делали корональные срезы толщиной 2 мм. С целью получения изображений срезы сканировали с обеих сторон с разрешением 2400 dpi на сканере hp scanjet 4500c. Проводилось морфометрическое измерение площади очага и объема ишемического повреждения. Расчет объема ишемического инфаркта (V) производили, используя формулу:

$$V = \sum A \times d,$$

где $\sum A$ – сумма площадей всех срезов; d – ширина срезов.

Для изучения уровня ГСК-3 β и ее фосфорилированной формы головной мозг извлекали, забирали образцы ткани головного мозга в количестве 500 мг в перифокальной зоне ишемического инсульта. Белки разделяли в 12% полиакриламидном геле и переносили

на PVDF-мембраны. Визуализацию проводили блоттинг-панелью SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США) на спектрофотометре Hitachi-557 (Hitachi Ltd., Япония). Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ. Содержание ГСК-3 β и фосфо-ГСК-3 β выражали в условных единицах хемилюминесценции (у. е. л.).

Для определения концентрации белка S100b забор венозной крови проводился на 1-й, 3-й и 7-й день исследования из хвостовой вены. Методом ИФА определялась концентрация белка в постиншемическом периоде.

Для оценки когнитивных функций, таких как обучение и пространственная память, применялся тест «Водный лабиринт Морриса» на 14-й день после моделирования ишемии. Тест длился в течение 60 секунд, регистрировалось время, за которое животное попадало в сектор SW, где ранее на момент обучения располагалась платформа (Рисунок 3).

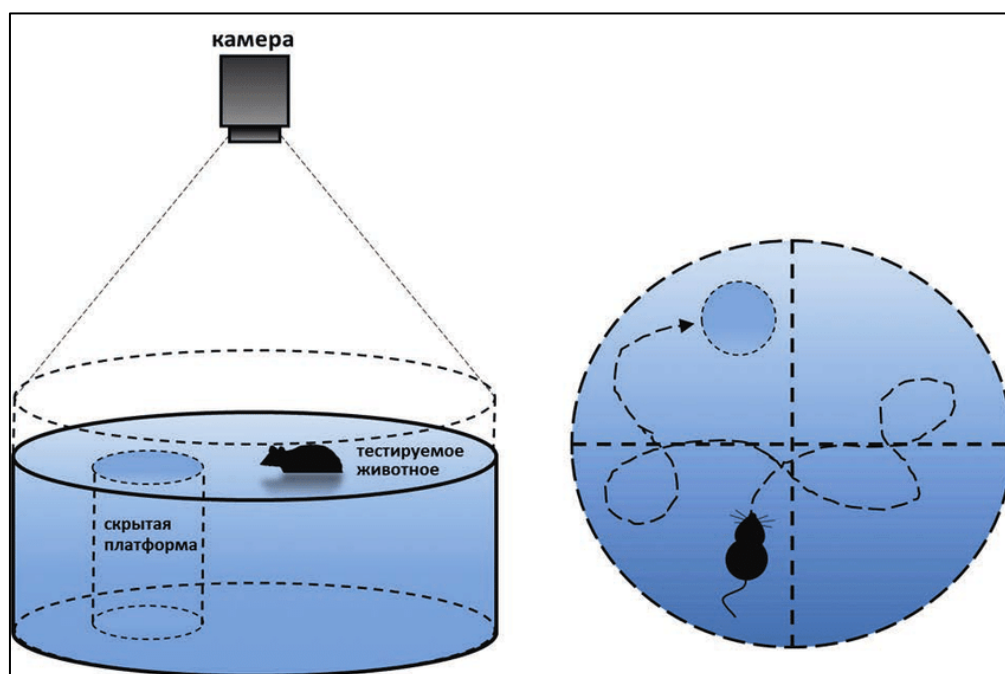


Рисунок 3 – Проведение тестирования в водном лабиринте Морриса

С целью оценки функционального дефицита в конечностях применялся тест «Постановка конечности на опору». Тестирование включало семь испытаний, оценивающих сенсомоторную интеграцию передних и задних конечностей в ответ на зрительную, тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Тест оценивался по следующим критериям:

- 2 балла – испытание выполнено в полном объеме;
- 1 балл – испытание выполнено с промедлением (> 2 с) и/или не полностью;
- 0 баллов – испытание не выполнено.

Для каждого животного вычислялась сумма баллов. На основании полученных сумм баллов вычисляли медиану для каждой группы тестируемых животных.

Статистическая обработка данных производилась с использованием прикладного программного обеспечения Excel 2019 («Microsoft», США), Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.), MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba).

Проверка распределения количественных показателей на нормальность проводилась с использованием критерия Шапиро – Уилка. Учитывая отличие распределения от нормального, для описания данных использовали медиану, нижний и верхний квартиль (Me [LQ; HQ]). Для оценки межгрупповых различий количественных показателей в двух независимых группах использовали критерий Манна – Уитни, в трех группах – критерий Краскела – Уоллиса. Для анализа повторных измерений в двух выборках использовали тест Вилкоксона. В трех и более – критерий Фридмана. Уровень статистической значимости при проверке гипотез был зафиксирован на уровне $p < 0,05$. Контроль уровня ошибки первого рода при проведении попарных межгрупповых сравнений выполнялся с помощью поправки Бонферрони.

Результаты исследования и их обсуждения

Анализируя полученные данные МРТ, в группе ложнооперированных животных ишемические повреждения отсутствовали. После применения ксенона 0,5 МАК выявлялось сокращение объема перифокального отека и объема ишемического очага в головном мозге экспериментальных животных относительно контрольной группы. (Таблица 2).

Таблица 2 - Результаты измерений объема ишемического инсульта и перифокального отека с помощью МРТ при экспозиции ксенона 0,5 МАК различной продолжительности, Me (LQ; HQ)

| Группа животных | Время экспозиции | | | Метод Краскелла – Уоллиса |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 30 мин | 60 мин | 120 мин | |
| Объем очага ишемического инсульта, мм ³ | | | | |
| Контроль (воздушно-кислородная смесь) | 245,0 (186,0; 271,0) | 243,5 (179,0; 269,0) | 241,5 (170,0; 267,0) | p = 0,92 |
| Ксенон 0,5 МАК | 203,0 (178,0; 245,0) | 178,0 (158,0; 205,0)* | 169,0 (151,0; 191,0)* | p = 0,041 |
| Объем перифокального отека, мм ³ | | | | |
| Контроль (воздушно-кислородная смесь) | 117,0 (100,5; 128,0) | 111,0 (101,5; 121,0) | 108,0 (99,5; 120,0) | p = 0,97 |
| Ксенон 0,5 МАК | 99,5 (79,0; 118,0) | 83,5 (71,0; 91,0)* | 82,0 (73,0; 92,0)* | p = 0,048 |
| Примечание – * – выявлены статистически значимые различия относительно контрольной группы, p < 0,05, критерий Манна – Уитни | | | | |

Результаты МРТ продемонстрировали, что 30-минутная экспозиция ксенона 0,5 МАК в экспериментальной группе практически не оказывала влияния на размеры очага ишемического инсульта и перифокального отека головного мозга, в то время как 60-минутная экспозиция приводила к сокращению объема перифокального отека головного мозга и очага ишемического инсульта. При этом дальнейшее увеличение продолжительности ингаляции до 120 минут оказывало сопоставимый эффект в отношении размеров ишемического повреждения головного мозга.

При анализе макропрепаратов, окрашенных TTC-методом, в группе ложнооперированных животных ишемические повреждения отсутствовали. Результаты исследования продемонстрировали, что 30-минутная экспозиция ксенона 0,5 МАК после перенесенной ОСМА практически не влияла на размеры очага ишемического инсульта по сравнению с контрольными животными. Увеличение продолжительности ингаляции ксенона с 30 до 60 минут приводила к сокращению объема очага ишемического повреждения, а дальнейшее увеличение экспозиции с 60 до 120 минут снижала объем ишемического инсульта всего на 2,5% (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты измерения объема ишемического инсульта по данным TTC-метода при экспозиции ксенона 0,5 МАК различной продолжительности, Me (LQ; HQ)

| Группа животных | Время экспозиции | | | Метод Краскелла – Уоллиса |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 30 мин | 60 мин | 120 мин | |
| Контроль (воздушно-кислородная смесь) | 188,0 (165,5; 235,0) | 203,0 (185,5; 225,0) | 207,5 (180,5; 227,0) | p = 0,85 |
| Ксенон 0,5 МАК | 179,0 (158,0; 240,0) | 162,0 (151,0; 213,0)* | 158,0 (141,0; 198,0)* | p = 0,047 |
| Примечание – * – выявлены статистически значимые различия относительно контрольной группы, p < 0,05, критерий Манна – Уитни | | | | |

В перифокальной зоне ишемического инсульта после ОСМА происходила активация фермента ГСК-3 β , на что указывает значительное снижение фосфорилированной (инактивированной) формы ГСК-3 β . 30-минутная ингаляция ксенона 0,5 МАК не оказывала статистически значимого влияния на фосфорилирование фермента ГСК-3 β , в то время как увеличение времени экспозиции до 60 или 120 минут сопровождалось возрастанием фосфорилирования фермента ГСК-3 β при неизменном уровне основной ГСК-3 β , что изменяло соотношение фосфорилированной и активной форм и, вероятно, могло

свидетельствовать о торможении апоптоза нервных клеток в перифокальной зоне ишемического инсульта (Рисунок 4).

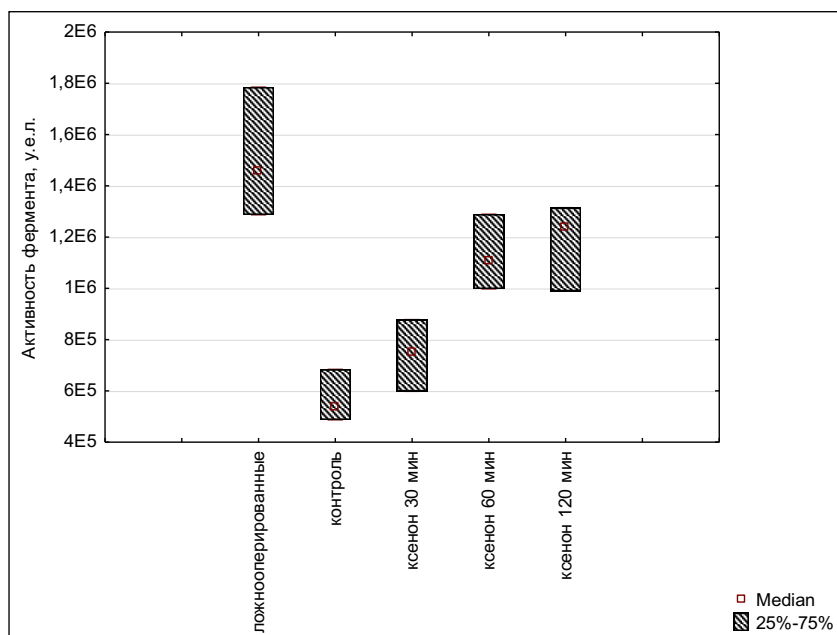


Рисунок 4 – Активность фосфорилированной формы гликоген-синтазы киназы-3 β в головном мозге крыс в экспериментальных группах по данным денситометрического анализа Вестерн-блотов

Показано, что 60-минутная или 120-минутная ингаляция ксенона 0,5 МАК после ишемии/реперфузии снижала концентрацию белка нейронального повреждения S100b в сыворотке крови животных статистически значимо относительно контрольной группы (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты анализа концентрации белка нейронального повреждения S100b в сыворотке крови крыс на 1-е, 3-и и 7-е сутки послеоперационного периода, Me (LQ; HQ)

| Группа | Концентрация S100b, мкг/л | | | Метод Фридмана |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| | 1-е сутки | 3-и сутки | 7-е сутки | |
| Ложнооперированные животные (n = 10) | 0,04 (0,03; 0,05) | 0,04 (0,03; 0,06) | 0,04 (0,03; 0,05) | p = 0,79 |
| Контрольные животные (n = 10) | 0,48 (0,39; 0,59) [^] | 0,16 (0,09; 0,29) ^{*^} | 0,14 (0,08; 0,23) [^] | p = 0,012 |

Продолжение таблицы 4

| | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| Ксенон 0,5 МАК 30 минут (n = 10) | 0,44 (0,35; 0,51) [^] | 0,18 (0,09; 0,27) ^{*^} | 0,16 (0,08; 0,19) [^] | p = 0,02 |
| Ксенон 0,5 МАК 60 минут (n = 10) | 0,25 (0,19; 0,39) ^{#^} | 0,1 (0,05; 0,13) ^{*^} | 0,07 (0,03; 0,11) | p = 0,01 |
| Ксенон 0,5 МАК 120 минут (n = 10) | 0,22 (0,12; 0,35) ^{#^} | 0,12 (0,08; 0,21) ^{*^} | 0,05 (0,02; 0,1) [*] | p = 0,005 |
| Критерий Краскелла – Уоллиса | p = 0,001 | p = 0,051 | p = 0,048 | |

Примечание – [^] – выявлены статистически значимые различия по сравнению с ложнооперированными животными, p < 0,05, критерий Манна – Уитни; # – выявлены статистически значимые различия относительно контрольной группы, p < 0,05, критерий Манна – Уитни; * – выявлены статистически значимые различия относительно предыдущего срока наблюдения, p < 0,05, критерий Вилкоксона

Концентрация белка нейронального повреждения S100b значительно возрастала после ишемии/реперфузии, вызванной ОСМА. Ингаляция ксеноном 0,5 МАК в течение 30 минут после фокальной ишемии статистически значимо не изменяла уровень белка S100b. Увеличение экспозиции способствовало снижению данного показателя и тенденции к его нормализации на 7-е сутки эксперимента.

Результаты после тестирования в «Водном лабиринте Морриса» показали, что ложнооперированные животные быстро находили платформу со средним латентным периодом 8 (7; 9) секунд. Ишемия/реперфузия головного мозга приводила к увеличенному времени поиска платформы. Ингаляции ксеноном 0,5 МАК способствовали улучшению когнитивных способностей и сокращению латентного периода нахождения платформы (рисунок 6).

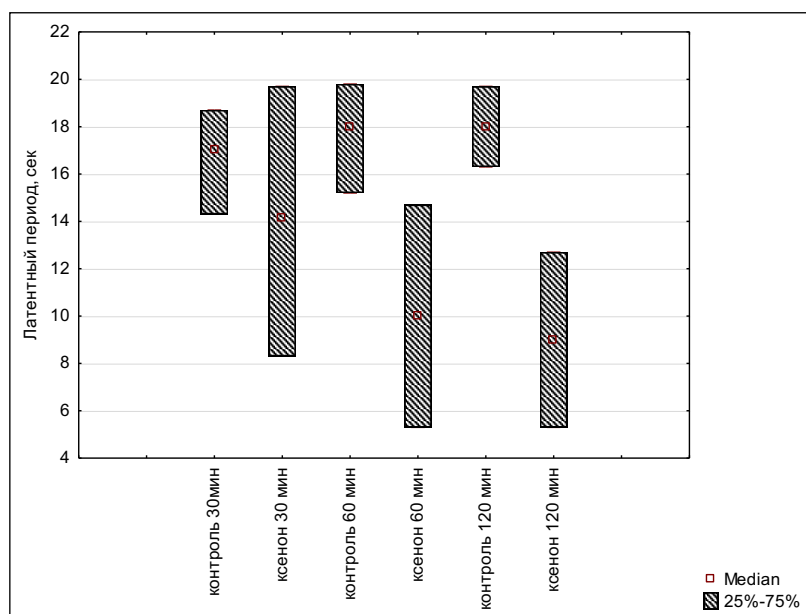


Рисунок 6 – Продолжительность латентного периода при тестировании в «Водном лабиринте Морриса» в экспериментальных группах

В тесте «Постановка конечности на опору» ложнооперированные животные набрали максимальное количество баллов (14 баллов). В группе животных, перенесших фокальную ишемию и получивших ингаляцию воздушно-кислородной смесью различной экспозиции (контрольная группа), зафиксирован выраженный неврологический дефицит. Ингаляция ксенона 0.5 МАК после перенесенной фокальной ишемии способствовала снижению неврологического дефицита (рисунок 7).

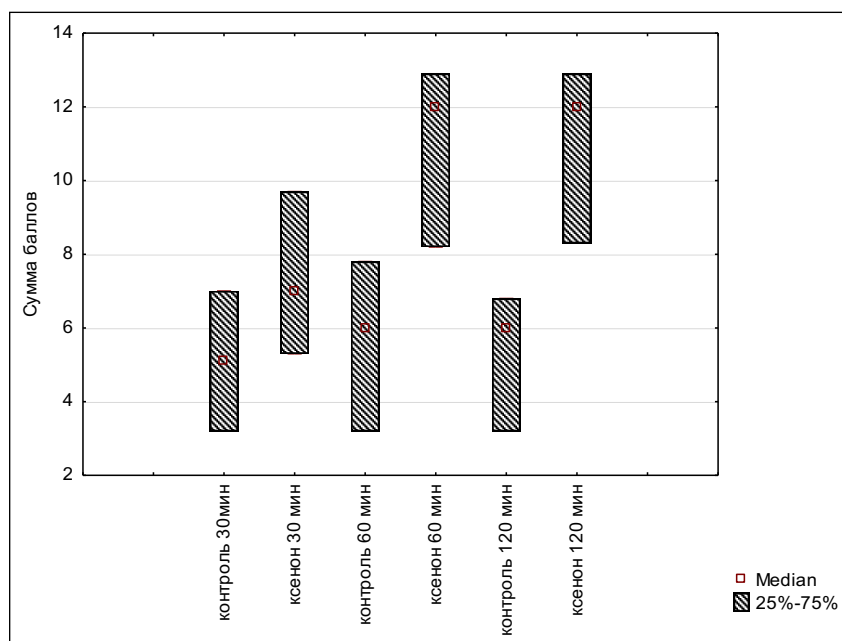


Рисунок 7 – Сумма баллов по результатам теста «Постановка конечности на опору» в экспериментальных группах

Данные по оценке неврологического дефицита и когнитивных функций показали, что ишемия/реперфузия головного мозга, смоделированная путем ОСМА по методу Лонга, приводит к значительному неврологическому и когнитивному дефициту. Ингаляция ксенона 0,5 МАК продолжительностью 30 минут не оказывает значимого влияния на неврологический статус животных и их способности к обучению. Увеличение экспозиции ксенона до 60 минут статистически значимо снижает неврологический и когнитивный дефицит в экспериментальной группе, а дальнейшее увеличение времени экспозиции до 120 минут оказывает сопоставимый эффект.

ВЫВОДЫ

1. Ингаляция ксенона 0,5 МАК в течение 30 минут практически не оказывает влияния на объем очага ишемического инсульта и перифокального отека головного мозга при моделировании фокальной ишемии головного мозга по методу Лонга, при этом увеличение экспозиции до 60 минут способствует значимому снижению данных показателей. Дальнейшее увеличение экспозиции до 120 минут не оказывает на них существенного влияния.

2. Ингаляция ксенона 0,5 МАК при экспозиции 30 минут статистически значимо не влияет на фосфорилирование (инактивацию) фермента ГСК-3 β , в то время как ингаляция ксенона в течение 60 и 120 минут приводит к увеличению фосфорилирования фермента ГСК-3 β , снижению отношения фосфорилированной и активной форм и, вероятно, торможению апоптоза нейронов в перифокальной зоне ишемического инсульта.

3. 30-минутная экспозиция ксенона 0,5 МАК после ишемии/реперфузии не оказывает статистически значимого влияния на концентрацию белка S100b. Увеличение экспозиции до 60 и 120 минут способствует снижению концентрации белка S100b и тенденции к его нормализации на 7 сутки перенесенной фокальной ишемии.

4. Ингаляция ксенона 0,5 МАК при экспозиции 30 минут не приводит к значительному улучшению неврологического статуса животных и их способности к обучению. Увеличение экспозиции ксенона до 60 минут значимо уменьшает неврологический и когнитивный дефицит, а дальнейшее увеличение времени экспозиции до 120 минут оказывает сопоставимый эффект.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Крюков, И. А.**, Ершов, А. В., Черпаков, Р. А., Гребенчиков, О. А. Выраженность когнитивных и неврологических нарушений у крыс после ишемического инсульта на фоне применения ксенона 0,5 МАК // Вестник РГМУ. 2022. №3. С. 91–97.
2. **Крюков И. А.**, Ершов А. В., Лобанов А. В., Гребенчиков О. А. Влияние продолжительности экспозиции ксенона на объем ишемического повреждения головного мозга в эксперименте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022. Т. 66. № 4. С. 73–78.
3. Ершов А. В., **Крюков И. А.**, Антонова В. В., Баева А. А. Влияние ксенона на активность гликоген-синтазы киназы-3 β в перифокальной зоне ишемического инсульта (экспериментальное исследование) // Общая реаниматология. 2023;19(2): С. 60-67.

Результаты доложены на конференциях:

1. Перспективы применения нейропротективных свойств ксенона в педиатрии. Крюков И. А., Ершов А. В., Гребенчиков О. А. Всероссийский конгресс с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» 1-3 июня 2023г, г. Москва.
2. Влияние продолжительности экспозиции ксенона 0.5 МАК на концентрацию белка S100b в сыворотке крови после ишемического повреждения головного мозга. Крюков И. А., Рыбакова М. А., Ершов А. В., Гребенчиков О. А. Форум анестезиологов и реаниматологов России. «XXI Съезд федерации анестезиологов и реаниматологов» 14-16 октября, 2023г, г. Санкт-Петербург.
3. Влияние длительности ингаляции ксенона 0.5 МАК на реализацию его нейропротекторных свойств. Кузовлев А. Н., Крюков И. А, Ершов А. В. Юбилейная XXV Всероссийская конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» 10-11 ноября 2023г, г. Москва.
4. Нейропротекция ксеноном, экспериментальное исследование. Белок S100b как современный маркер повреждения головного мозга. Кузовлев А. Н., Гребенчиков О. А., Крюков И. А. Школа по детской нейроонкологии и нейрохирургии с международным участием. 28-29 марта 2024г. г. Москва.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГМП – гигантская митохондриальная пора

ГСК-3 β – гликоген-синтаза киназа-3 β

МАК – минимальная альвеолярная концентрация

МРТ – магнитно-резонансная томография

ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии

САК – субарахноидальное кровоизлияние

СМА – средняя мозговая артерия

ТТС – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид

фосфо-ГСК-3 β – фосфорилированная гликоген-синтаза киназа-3 β

ЧМТ – черепно-мозговая травма

NMDA – N-метил-D-аспартат

WSO – Всемирная организация по борьбе с инсультом