

Нейропротективные свойства ингаляционной аргон-кислородной смеси после фотоиндуцированного ишемического инсульта

Е. А. Боева^{1*}, М. В. Сутормин², А. Н. Кузовлев¹, М. А. Любомудров¹,
В. В. Мороз¹, Н. И. Усольцева¹, О. А. Гребенчиков¹

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского,
Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

Для цитирования: Е. А. Боева, М. В. Сутормин, А. Н. Кузовлев, М. А. Любомудров, В. В. Мороз, Н. И. Усольцева, О. А. Гребенчиков. Нейропротективные свойства ингаляционной аргон-кислородной смеси после фотоиндуцированного ишемического инсульта. *Общая реаниматология*. 2025; 21 (5). <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2025-5-2525> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Екатерина Александровна Боева, eboeva@fnkcr.ru

Резюме

Цель исследования — изучение воздействия трехкратной 60-минутной ингаляции аргон-кислородной смеси (Ar 70%/O₂ 30%) на степень неврологического дефицита, размер повреждения мозга, клеточные реакции, а также содержание цитокинов у крыс после фотохимически индуцированного инсульта.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 21 самца крыс линии Wistar массой 250–300 г, которых случайным образом распределили на три группы: контрольная группа с ишемией + ингаляция N₂ 70%/O₂ 30% (группа «Ишемия», $n=10$); опытная группа с ишемией + ингаляция Ar 70%/O₂ 30% (группа «Ишемия + iAr», $n=8$); и группа ложнооперированных животных (группа «ЛО», $n=3$). Неврологический статус оценивали на протяжении 14 дней с использованием теста «Постановка конечности на опору». Через 14 дней после ишемии проводили магнитно-резонансную томографию (МРТ), гистологический и иммуногистохимический анализы, выделяли РНК из ткани мозга и определяли экспрессию генов цитокинов с помощью обратной транскрипции-ПЦР.

Результаты. Получили статистически значимые различия при оценке в тесте ПКО между группой Ишемия и группой Ишемия + iAr на 3-и (7,3 [5,3; 10,4] против 9,9 [10,2; 13,2], $p=0,045$) и 7-е (8,0 [7,3; 9,2] против 10,0 [9,0; 11,5], $p=0,027$) сутки после моделирования инсульта. Объем ишемии по данным МРТ статистически значимо различался между группами (группа Ишемия + iAr 12,5 [8,5; 17,4] мм³ и группа Ишемия 21,0 [17,5; 22,68] мм³, $p=0,01$). Уровни экспрессии генов провоспалительных цитокинов оказались статистически значимо ниже после воздействия аргон-кислородной смеси (IL-1 β : группа Ишемия + iAr 205 [175,5; 247,5] vs группа Ишемия 328,5 [299; 347,5], $p=0,001$; TNF: группа Ишемия + iAr 110,5 [93,5; 113] vs группа Ишемия 149,5 [126,5; 176,5], $p=0,001$).

Заключение. Таким образом, трехкратная 60-минутная ингаляция аргон-кислородной смеси (Ar 70%/O₂ 30%) после фотохимически вызванного инсульта уменьшает степень неврологических нарушений, изменяет уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов и оказывает влияние на клеточные реакции.

Ключевые слова: аргон; ишемия; нейропротективные свойства; фотохимически индуцированный инсульт

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Neuroprotective Properties of Inhaled Argon-Oxygen Mixture after Photochemically Induced Ischemic Stroke

Ekaterina A. Boeva^{1*}, Maxim V. Sutormin¹, Artem N. Kuzovlev¹,
Maxim A. Lyubomudrov¹, Victor V. Moroz¹, Natalia I. Usoltseva¹, Oleg A. Grebenchikov¹

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

² M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute
61/2 Shchepkin Str., 129110 Moscow, Russia

Summary

The aim of this study was to investigate the effects of three 60-minute inhalations of an argon-oxygen gas mixture (Ar 70%/O₂ 30%) on the severity of neurological deficits, brain lesion volume, inflammatory and cellular responses, and cytokine levels in rats after photochemically induced ischemic stroke.

Materials and Methods. The experiment was performed in 21 male Wistar rats (250–300 g) randomly assigned to three groups: (1) ischemia + N₂ 70%/O₂ 30% inhalation (ischemia group, N=10); (2) ischemia + Ar 70%/O₂ 30% inhalation (ischemia + iAr group, N=8); and (3) sham-operated animals (sham group, N=3). Neurological status was assessed over 14 days using the limb placement test. On day 14 post-ischemia, animals underwent magnetic resonance imaging (MRI), histological and immunohistochemical analyses, and RT-PCR using RNA extracted from the liquid homogenate of the entire brain to evaluate the relative levels of IL-1 β , IL-6, and TNF mRNAs.

Results. Significant differences in limb placement test scores were observed between ischemia and ischemia + iAr groups on day 3 (7.3 [5.3; 10.4] vs. 9.9 [10.2; 13.2], $P=0.045$) and day 7 (8.0 [7.3; 9.2] vs. 10.0 [9.0; 11.5], $P=0.027$). MRI showed a significantly smaller ischemia volume in the ischemia + iAr group compared to the ischemia group (12.5 [8.5; 17.4] mm³ vs. 21.0 [17.5; 22.68] mm³, $P=0.01$). Pro-inflammatory cytokine levels were significantly lower following argon-oxygen inhalation: IL-1 β — 205 [175.5; 247.5] in the Ischemia + iAr group vs. 328.5 [299; 347.5] in the Ischemia group ($P=0.001$); TNF — 110.5 [93.5; 113] vs. 149.5 [126.5; 176.5], respectively ($P=0.001$).

Conclusion. Repeated 60 min inhalation of argon-oxygen mixture (Ar 70%/O₂ 30%) after photochemically induced ischemic stroke significantly reduces neurological impairment, modulates pro-inflammatory cytokine levels, and affects inflammatory and cellular responses.

Keywords: *argon; ischemia; neuroprotection; photochemically induced stroke*

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Информация об авторах/Information about the authors:

E. A. Боева/Ekaterina A. Boeva: <http://orcid.org/0000-0002-0422-5018>

M. B. Сутормин/Maxim V. Sutormin: <http://orcid.org/0009-0001-5563-0363>

A. H. Кузовлев/Artem N. Kuzovlev: <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>

M. A. Любомудров/Maxim A. Lyubomudrov: <https://orcid.org/0000-0002-1735-592X>

V. V. Мороз/Victor V. Moroz: <https://orcid.org/0000-0002-5030-5457>

H. I. Усольцева/Natalia I. Usoltseva: <http://orcid.org/0000-0002-7269-6444>

O. A. Гребенчиков/Oleg A. Grebenchikov: <https://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Инсульты являются значимой причиной заболеваемости и смертности. Проведено огромное количество исследований, посвященных этой проблеме, однако, терапевтические возможности для пациентов по-прежнему ограничены [1].

Многочисленные исследования патогенеза ишемического инсульта показали, что нейрональные повреждения вызваны гибелью нейронов, окислительным стрессом и различными иммунными реакциями [2–4]. Восстановление нейрональных повреждений, вызванных ишемическим инсультом, происходит с участием различных молекулярных путей. Выживание нейронов влияет на стабильность и полноту функций мозга, а потеря нейронов напрямую приводит к неврологическому дефициту [5–10]. Таким образом, обеспечение защиты и регенерации нейронов является основным направлением для эффективного восстановления неврологического дефицита.

Кроме того, клеточные реакции, сопровождающиеся экспрессией провоспалительных медиаторов, являются основой ишемического повреждения тканей [7, 8, 10]. Широко признано, что таргетное влияние на активацию микроглии, резидентные иммунные клетки центральной нервной системы может ингибировать повреждение и способствовать восстановлению после инсульта. Чрезмерная активация фагоцитарного фенотипа микроглии ведет к усугублению повреждения мозга за счет фагоцитоза еще жизнеспособных клеток. Микроглия фагоцитарного фенотипа выделяет провоспалительные цитокины, что также усугубляет повреждение. При этом микроглия восстановительного фенотипа выделяет трофические и противовоспалительные факторы. Это свидетельствует о том, что микроглия характеризуется большой гетерогенностью [7, 8, 10].

Известно, что клеточные реакции, сопровождающиеся экспрессией провоспалительных медиаторов, на границе между кровью и эндотелием, включая молекулы адгезии, цитокины, хемокины и лейкоциты, имеют большое значение в патогенезе повреждения тканей при ишемическом инсульте [11]. Очевидно, что интерлейкины также играют важную роль в развитии ишемического инсульта [11]. Интерлейкины относятся к цитокинам, они координируются и взаимодействуют друг с другом, завершая функции кроветворения и иммунной регуляции [12]. Они играют решающую роль в процессах передачи информации, активации и регуляции иммунных клеток, опосредуя активацию, размножение и дифференцировку Т- и В-клеток, а также клеточную реакцию, сопровождающуюся экспрессией провоспалительных медиаторов [11–13]. Существует тесная взаимосвязь между интерлейкинами и патогенезом ишемического инсульта [13, 14]. В частности, IL-1 β стимулирует активацию микроглии, которая представлена основными эффекторными клетками в клеточной реакции, что при-

водит к вторичному повреждению мозга путем секреции и высвобождения ряда потенциально нейротоксических веществ, таких как TNF- α и iNOS [11–15].

Создание препаратов с нейропротективным эффектом является актуальной задачей современной науки. Существенный интерес представляет аргон [16–18]. Однако, результаты исследований нейропротекторов носят противоречивый характер. Кроме того, сила нейропротективного эффекта зависит от используемой модели, времени экспозиции и самого анестетического агента [16–18].

В связи с этим, цель данного исследования — определить, обладает ли аргон-кислородная смесь нейропротективным эффектом при трехкратной 60-минутной ингаляции после моделирования фотоиндуцированного ишемического инсульта, а также выяснить, как предложенный метод ингаляции влияет на клеточную реакцию головного мозга.

Материал и методы

Эксперименты приводили на самцах крыс линии Wistar массой 250–300 г ($n=21$). За 8 ч до начала эксперимента животных лишали корма, но доступ к воде и пище сохраняли. Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (№ 3/22/3 от 14 декабря 2022 г.). Все эксперименты проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по защите животных, используемых в научных исследованиях.

Крыс случайным образом распределили на 3 группы в зависимости от характера вмешательства:

- контрольная группа с инсультом + ингаляция N₂ 70%/O₂ 30% (группа Ишемия), $n=10$;
- опытная группа с инсультом + ингаляция Ar 70%/O₂ 30% (группа Ишемия + iAr), $n=8$;
- группа ложнооперированных животных, подвергнутых анестезии и подготовительным процедурам без моделирования инсульта + ингаляция N₂ 70%/O₂ 30% (группа ЛО), $n=3$.

Моделирование фотоиндуцированного ишемического инсульта. Модель инсульта воспроизводили по стандартной методике [19], в качестве анестетического агента выбрали 6% хлоралгидрат (300 мг/кг, внутривенно). Спустя примерно 42±16 мин после начала инсульта, когда животное приходило в сознание и восстанавливало терморегуляцию, его обезболивали (парацетамол 50 мг/кг, подкожно) и помещали в камеру. В камеру постоянно подавали свежую газовую смесь с потоком 3 л/мин (не менее 0,5 л/мин на животное): для группы Ишемия — кислородно-воздушную (O₂ 30%), для группы Ишемия + iAr — Ar 70%/O₂ 30%. Для дренажа жидкостей на дно камеры клали стандартную древесную

подстилку. Время нахождения животного в камере составляло 60 мин. После этого оценивали общее состояние (бодрствование, подвижность) и повторно обезболивали парацетамолом (50 мг/кг, подкожно). Затем животное помещали в клетку с доступом к воде и пище. В течение всего эксперимента уровни O₂ и CO₂ в камере контролировали с помощью мультигазового датчика ООО «ИнертГаз Медикал». Через 24 ч крыс вновь подвергали ингаляции в течение 60 мин, и повторную процедуру выполняли через 72 ч от начала эксперимента. В исследовании применяли газовую смесь производства ООО АКЕЛА-Н, г. Химки, Россия.

Оценка неврологического статуса. В данном исследовании использовали тест «Постановка конечности на опору (ПКО)», следуя протоколу, основанному на методике М. Де Рика и соавт. [20] и адаптированному Ю. Еолжконеном и соавт. [21].

Оценка объема повреждения мозга. Через 14 дней после моделирования инсульта у крыс проводили магнитно-резонансную томографию на аппарате с магнитным полем 7 Тл и градиентной системой 105 мТл/м (BioSpec 70/30, Bruker, Германия). Анестезию обеспечивали изофлураном (1,5–2 об %). Применяли стандартный протокол визуализации мозга крыс, включающий получение T2-взвешенных изображений. Использовали последовательности импульсов (ИП) на основе спинного эха (RARE) с параметрами: TR=6000 мс, TE=63,9 мс, толщина среза 0,8 мм, шаг 0,8 мм, матрица 256×384, разрешение 0,164×0,164 мм/пиксель. Время сканирования одного животного составляло около 25 мин. Для анализа объема повреждений головного мозга применяли графический анализ изображений в программе ImageJ (National Institutes of Health image software, Bethesda, MD, США). С этой целью площадь интактной ткани в здоровом (S1) и поврежденном (S2) полушариях определяли отдельно, а площадь повреждения рассчитывали по формуле $\Sigma S = S1 - S2$, где ΣS — площадь повреждения на одном срезе (мм²). Объем повреждения головного мозга рассчитывали по формуле $V = \Sigma S n \times d$, где d — толщина среза (0,8 мм), а $\Sigma S n$ — сумма площади повреждения на всех срезах (мм²).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование. На 14-й день после инсульта для гистологического анализа у крыс сразу после эвтаназии (декапитация под анестезией хлоралгидратом) извлекали образцы мозга, которые фиксировали в 10% забуференном формалине на 24 ч, после чего обрабатывали по стандартной парафиновой методике. Фронтальные срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Нисслию. Морфометрический анализ проводили после создания цифровых изображений с использованием микроскопа «Nikon Eclipse Ni-U» (Япония) с объективами ×4, ×10, ×20, ×40 и камерой DS-R12. Измерения выполняли в программе NIS-Elements BR «Nikon» (Япония), анализируя морфологические изменения в зоне инфаркта, пенумбры и определяя площадь повреждения.

Затем срезы депарафинировали в ксилоле и регидратировали через серию этанола. Высокотемпературную демаскировку антигенов проводили в цитратном буфере с pH 6 (Target Retrieval Solution, DAKO, Дания). Охлажденные срезы трижды промывали в фосфатном буфере (PBS IHC Wash Buffer + Tween, Cell Marque, США) по 5 мин. Эндогенную пероксидазу блокировали с помощью 3% перекиси водорода на 10 мин, а для предотвращения неспецифического связывания антител применяли Protein Block Serum-free (Abscam, Великобритания) на 30 мин.

Затем срезы инкубировали при 37°C в течение часа с первичными антителами: кроличьи Iba-1 (ab153696, 1:500) для микроглии, кроличьи NeuN (ab177487, 1:200) для нейронов, Anti Caspase-3 (ab13847, 1:100) для апоптоза и кроличьи anti Von Willebrand factor (ab 9378, 1:200) для ангиогенеза, разведенными в Antibody Diluent (ab64211 Abscam, Великобритания). Вторичные антитела козы против кролика\мышь Dako REAL EnVision Detection System (DAB Dako Antibody Diluent) или ImmPACT® Vector® Red Substrate Kit, Alkaline Phosphatase (AP) (SK-5105) использовали в соответствии с инструкцией. Срезы контрастировали гематоксилином на 1–2 мин, затем дегидратировали в 70, 96 и 100% спирте и дважды просветляли в ксилоле.

Выделение РНК из ткани головного мозга животных. РНК выделяли с использованием набора RNeasy MiniKit (QIAGEN, США) согласно инструкциям производителя. Весь головной мозг животного массой 25 мг измельчали в жидком азоте с использованием пестика и ступки. К полученному гомогенату добавляли 600 мкл буфера RLT (QIAGEN, США) и гомогенизировали при помощи шприца с иглой диаметром 0,8 мм. Полученный лизат центрифугировали в течение 3 мин при 16100g, затем супернатант переносили в новую пробирку. К нему добавляли 450 мкл 96% этанола, после чего раствор наносили на колонку RNeasy. Для очистки РНК последовательно промывали колонку 700 мкл буфера RW1 и 500 мкл буфера RPE дважды. Элюцию проводили с использованием 50 мкл

воды, свободной от РНКаз. Элюированную РНК осаждали с добавлением ацетата натрия (1/10 объема 3М раствора) и 96%-го этанола (2,5 объема) и затем растворяли в 30 мкл деионизованной воды без РНКаз.

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Обратную транскрипцию выполняли с набором SuperScript III от ThermoScientific (США). Готовили смесь из олиго (dT)18 (500 мкг/мл) и 50 нг случайных праймеров в соотношении 1:1 (1 мкл), добавляли 2 мкг тотальной РНК, 1 мкл смеси дезоксирибонуклеотидов (10 мМ) и MQ до объема 12 мкл. Смесь нагревали при 65°C в течение 6 мин и охлаждали на льду. Затем добавляли 4 мкл 5x-буфера, 2 мкл 0,1М ДТТ, 1 мкл обратной транскриптазы (20 ед) и 1 мкл MQ. Инкубировали смесь при комнатной температуре 10 минут для отжига случайных праймеров, затем при 43°C в течение 50 мин, после чего реакцию завершали нагреванием до 70°C на 15 мин для инактивации фермента.

Для подбора праймеров для ПЦР использовали программу Beacon Designer и выбрали соответствующие пары праймеров для анализа (табл. 1).

Согласно условиям, которые указали в табл. 2, ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе BioRad iCycler (производство США), со смесью следующего состава: Смесь Б (интеркалирующий краситель Eva Green + рецессивный краситель ROX + Taq Pol + 25mM dNTP + буфер (предоставлено фирмой «Синтол») — 10 мкл, праймеры (смесь 10 мкМ прямого и обратного праймеров — 0,5 мкл, MQ — 9,5 мкл, продукт обратной транскрипции — 5 мкл).

При статистической обработке результаты анализа экспрессии нормировали на экспрессию гена 18S рРНК.

Статистический анализ проводили с применением программы GraphPad Prizm 8.0. Нормальность распределения признака в выборках оценивали по критерию Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения данные представили в виде среднего значения и стандартного отклонения; при распре-

Таблица 1. Последовательности и основные характеристики праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени.

Ген	Организм	Последовательности праймеров (прямого и обратного), 5'-3'	Температура отжига, °C
18S рРНК	Крыса	GACAGGATTGACAGATTGAT TTATCGGAATTAACCAGACAA	56
TNF	Крыса	TTATCTACTCCCAGGTTCT TGGTATGAAATGGCAAATC	56
IL-1beta	Крыса	AGAACATAAGCCAACAAGT ACACAGGACAGGTATAGAT	56
IL-6	Крыса	TGATTGTATGAACAGCGATGATG CCAGAAGACCAGAGCAGATT	58

Таблица 2. Протокол ПЦР в реальном времени.

Период	Время	Температура, °C	Число циклов
Инициация	5 мин	95	1
Денатурация	1 мин	95	45
Отжиг	20 с	См. табл. 1	
Элонгация	20 с	72	
	1 мин	72	1
Получение кривой плавления	30 с	Каждые 30 с температура повышается на 0,5°C	45

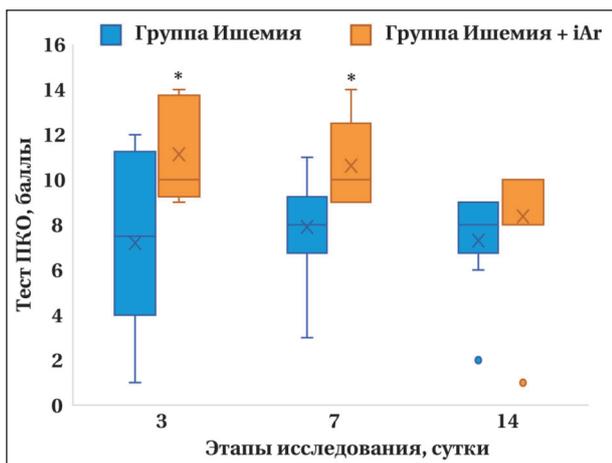


Рис. 1. Тест ПКО. Результаты ПКО на 3-и, 7-е и 14-е сут после моделирования ишемии.

Примечание. * — статистически значимые различия между группами Ишемия и Ишемия + iAg. Данные представили в виде медиан и квартилей [25%; 75%]. Применяли тест ANOVA для сопоставления трех и более групп.

делении, отличном от нормального — в виде медианы и интерквартильного интервала $Me [Q1; Q3]$. Для оценки различий между двумя группами при наличии хотя бы одной выборки с ненормальным распределением применяли непараметрический U -критерий Манна-Уитни. Для сравнения групп более двух использовали критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным (*post hoc*) анализом с помощью критерия Данна. При этом учитывали поправку на множественные сравнения (Dunn's multiple comparisons test). Во всех тестах использовали двусторонний уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Тест постановки конечностей на опору (ПКО). На протяжении 14 дней животных из эксперимента не выводили, гуманная конечная точка не была достигнута во всех случаях. Летальных исходов не было.

При сравнении экспериментальных групп с группой ЛЮ сумма баллов за ПКО на каждом этапе исследования была меньше в экспериментальных группах. Получили статистически значимые различия между группой Ишемия и группой Ишемия + iAg на 3-и сут (7,2 [5,2; 10,5] против 10,0 [9,7; 13,2], $p=0,045$), 7-е сут (8,0 [7,3; 9,2] против 10,0 [9,0; 11,5], $p=0,027$) (рис. 1).

МРТ исследование головного мозга. По данным МРТ-исследования средний объем повреждения в группе Ишемия + iAg и группе Ишемия составил 12,5 [8,5; 17,4] мм³ и 21,0 [17,5; 22,68] мм³, соответственно. Получили статистически значимые различия между группами ($p=0,01$) (рис. 2).

Гистохимическая оценка ишемического повреждения головного мозга. Окрашивание

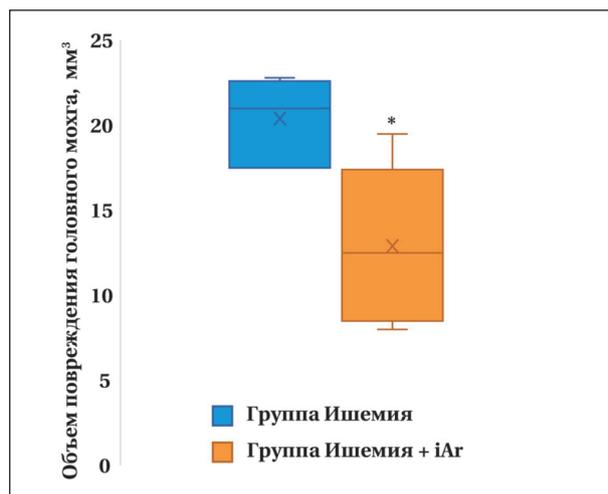


Рис. 2. Объем зоны повреждения головного мозга на 14-е сут наблюдения.

Примечание. Данные представили в виде медиан и квартилей [25%; 75%]. * — статистически значимые различия между группами.

по Нисслию показало, что поражения были различимы, четко ограничены от окружающей области ишемического очага. Лежащее под ним белое вещество было затронуто частично. Новообразованный барьер в виде глиального рубца был более выражен в группе Ишемия + iAg. Также в группе Ишемия + iAg определяли полнокровные капилляры с эндотелиоцитами, а также большое количество фибробластов в зоне клеточного вала. В группе Ишемия капилляров практически не было, а в зоне пенумбры выявили гетерогенные нейроны (темные, с гиперхромным ядром, со смещением ядра и/или ядрышка) (рис. 3, а). Также отметили значимо меньшую среднюю ширину пенумбры в группе Ишемия + iAg ($p=0,039$).

Иммуногистохимический анализ гистологических срезов головного мозга. Согласно литературным данным NeuN может располагаться как в ядрах нейронов, так и в цитоплазме [22, 23].

В обеих группах в области ишемического повреждения присутствовали NeuN-положительные клетки. При этом в зоне пенумбры количество NeuN-положительных клеток было статистически значимо больше в группе Ишемия + iAg (группа Ишемия 43 [35; 46], против группа Ишемия + iAg 60 [51; 73], $p=0,042$) (рис. 3, d). Кроме того, вне ишемического очага количество NeuN-положительных клеток было также статистически значимо больше в группе Ишемия + iAg (150 [45; 200] ед. в группе Ишемия и 250 [215; 353] ед. в группе Ишемия + iAg ($p=0,043$)).

Iba1 является маркером микроглии/макрофагов [24–26]. При этом, в группе Ишемия отметили большую площадь, занимаемую Iba1-позитивными клетками, в сравнении с группой

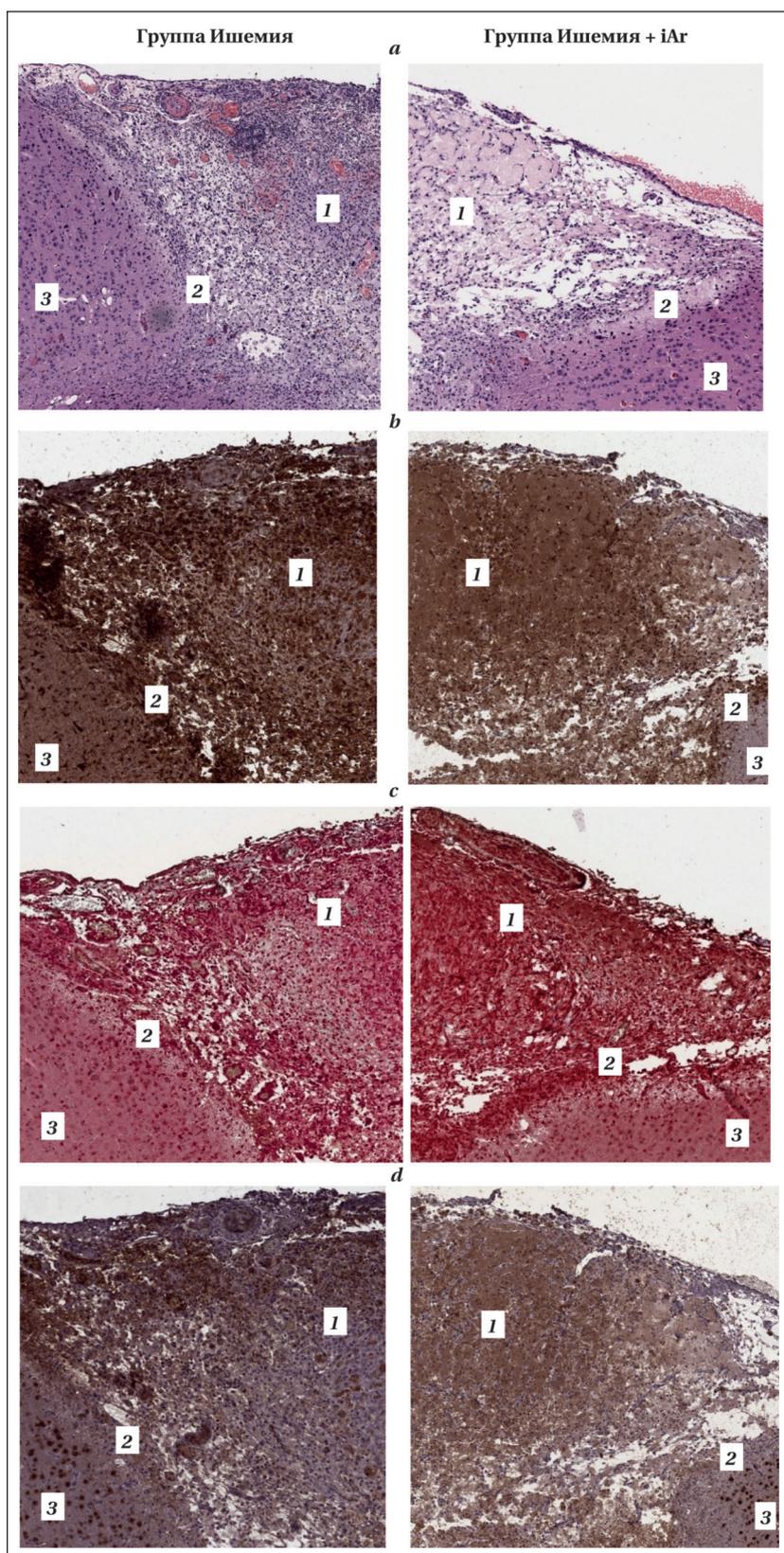


Рис. 3. Репрезентативные изображения гистологических микропрепаратов головного мозга крысы.

Примечание. 1 — очаг повреждения; 2 — пенумбра; 3 — не поврежденная ткань. *a* — окраска гематоксилином и эозином, объектив $\times 20$; *b* — окраска на Iba-1, объектив $\times 20$; *c* — комбинированная окраска на фактор фон Виллибранда (vWF): клетки окрашены красным цветом и каспаза-3 (Cas-3) — коричневым; *d* — NeuN-положительные клетки.

Ишемия + iAr ($p=0,037$). Данные клетки мы не могли дифференцировать от системных макрофагов (рис. 3, *b*). Площадь vWF-позитивной окраски в группе Ишемия + iAr была статистически значимо больше, чем в контрольной группе 0,23 [0,20; 0,29] против 0,15 [0,14; 0,18] ($p=0,034$). При определении Cas-3-положительных клеток отметили снижение Cas-3 позитивных клеток в группе Ишемия + iAr в сравнении с группой Ишемия, однако, различия были незначимы (рис. 3, *c*).

Оценка содержания мРНК IL-1 β , IL-6, TNF в головном мозге. В таблице 3 привели данные обсчета ПЦР в реальном времени для мРНК IL-1 β , мРНК IL-6, мРНК TNF в гомогенатах мозга крыс после моделирования ФИГМ и лечения Аргоксом.

В ходе исследования выявили, что относительное количество мРНК IL-1 β и мРНК TNF было значимо ниже после воздействия аргон-кислородной смеси. При анализе относительного количества мРНК IL-6 значимой разницы между группами не наблюдали.

Впервые показали, что трехкратная 60-минутная ингаляция аргон-кислородной смеси (Ar 70%/O₂ 30%) после ишемического инсульта проявляет нейропротекторные свойства за счет влияния на клеточную реакцию.

Модель ишемического инсульта, вызванного окклюзией просвета средней мозговой артерии, наиболее часто используется в экспериментальных исследованиях, однако данный метод имеет ограничения [1]. Метод фотохимического тромбоза является относительно простой, воспроизводимой моделью с минимальным количеством ограничений и осложнений [27].

Единственно возможной мишенью для препаратов с нейропротекторной активностью является зона пенумбры, и кле-

точная реакция в ней и вокруг нее [28–30]. Наше исследование показало, что трехкратная 60-минутная ингаляция аргон-кислородной смеси на модели фотоиндуцированного ишемического инсульта приводит к значимому снижению неврологического дефицита, уменьшению объема повреждения по данным МРТ, а также уменьшению средней ширины пенумбры по данным гистологического исследования.

Исследований, которые изучают влияние аргон-кислородной смеси на модели фотоиндуцированного ишемического инсульта с применением иммуногистохимического метода немного. В представленной работе оценивали влияние аргон-кислородной смеси на микроглию, нейроны, апоптотические процессы и процессы ангиогенеза.

Во время инсульта или при травматическом повреждении мозга происходит массовая гибель нейронов, частично вызванная апоптотическими процессами. В условиях недостатка кислорода и глюкозы активируются пути апоптоза, что ведет к масштабным нарушениям структуры и функции нервной ткани. Степень повреждения нейронов во время ишемии является одним из факторов, определяющим исход. Окислительный стресс, эксайтотоксичность и клеточная реакция способствуют повреждению нейронов [28].

Показали, что активность процессов апоптоза после влияния аргон-кислородной смеси значимо снижается, на что указывает динамика содержания нейрональной каспазы-3 (Cas-3).

Микроглия играет решающую роль в клеточной пролиферации и формировании глиальных рубцов после ишемического повреждения. Она также является источником про- и прогнатовоспалительных факторов в головном мозге [31]. Для изучения микроглии проводили окрашивание *iba-1*, так как *iba-1* является маркером микроглии/макрофагов [9, 10]. В исследованиях [9, 10] отмечалось, что после ишемии количество клеток *iba-1*+ было максимальным через 4 дня после ишемии и оставалось высоким после 8 сут.

Показали статистически значимое снижение плотности *iba-1*-позитивных клеток в группе Ишемия + iAr, в связи с чем можем предположить, что активность микроглии к концу второй недели после воздействия аргон-кислородной смеси снижена. В пользу данного утверждения также свидетельствует статистически значимо низкий уровень Cas-3-позитивных клеток. Однако, определить тип макрофагов в данном случае крайне затруднительно. В первые сутки после инсульта отмечается активация микроглии, нарастание процессов фагоцитоза [9, 10]. В последующем остается трудной задачей определить, являются ли определяемые макрофаги системными, так

как в ходе ишемии происходит разрушение гематоэнцефалического барьера и выход макрофагов из сосудистого русла [9, 10].

Для дифференциации нейронов от глиальных клеток в срезах мозга используют специфические нейрональные маркеры, такие как нейрон-специфическая енолаза, белки нейрофиламентов и кальбиндин. Белок NeuN является регулятором сплайсинга. В выполненном исследовании, количество NeuN-положительных клеток оказалось статистически значимо выше в группе после ингаляции аргон-кислородной смеси. Эти данные могут говорить о большем количестве сохраненных нейронов в зоне повреждения и в зоне пенумбры, однако, мы не можем судить о функциональности данных нейронов.

Fahlenkamp и соавт. показали, что аргон влияет на активацию микроглии на модели *in vitro* ЛПС-индуцированного воспаления в культурах клеток микроглии [31–33]. Результаты этих исследований показали, что аргон подавляет экспрессию гена провоспалительного цитокина IL-1 β . Другая группа авторов на модели кислородно-глюкозной депривации культур нейрональных клеток коры головного мозга показала, что воздействие аргона уменьшает гибель нейрональных клеток за счет снижения экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 [33]. Интерлейкины играют реверсивную роль при ишемическом повреждении посредством передачи информации, активации и регуляции иммунных клеток. Они также влияют на активацию, размножение и дифференцировку T- и B-клеток, активность клеточной реакции, сопровождающейся экспрессией провоспалительных медиаторов [11]. В выполненном исследовании при использовании аргона также получили статистически значимое снижение экспрессии генов IL-1 β и TNF- α .

IL-1 может вызывать нейротоксичность косвенно через свое действие на эндотелий сосудов, способствуя привлечению лейкоцитов, в частности нейтрофилов, которые повреждают нервно-сосудистую единицу за счет высвобождения ММР и активных форм кислорода (АФК) [11]. Тем не менее, в подострой и хронической фазах после инсульта некоторые эффекты IL-1 могут быть полезными. Например, IL-1 способствует образованию глиального рубца и усиливает ангиогенез, тем самым способствуя восстановлению после ишемического инсульта [11]. IL-1 β — член семейства IL-1. Учитывая, что уровень экспрессии гена IL-1 β оказался выше нормальных значений, можно предполагать его положительное действие в процессе образования рубца и новых капилляров, что подтверждала большая площадь vWF-позитивного окрашивания в группе Ишемия + iAr.

Однако, с другой стороны некоторые исследования показали, что IL-1 β может влиять на активацию пути R1ЗК/АКТ, вследствие чего происходит выработка IL-6 и других цитокинов, которые воздействуют на ишемизированные участки и усиливают эффект повреждения, активируют процессы апоптоза [11]. Но, при сравнении с группой Ишемия экспрессия гена IL-1 β оказалась статистически значимо ниже после воздействия аргон-кислородной смеси, в связи с этим, ее апоптотическое действие выражено слабее, чем действие кислородно-азотной смеси что подтверждалось низким количеством Cas-3 положительных клеток в группе Ишемия + iAg.

В результате данного исследования показали, что уровень экспрессии гена IL-6 в группе Ишемия + iAg статистически значимо не отличался по сравнению с группой Ишемия. В некоторых исследованиях показано, что IL-6 увеличивает выживаемость нейронов центральной нервной системы вследствие уменьшения эксайтотоксического повреждения нейронов, а также активен против NMDA-опосредованного повреждения и защищает нейроны от апоптоза [12]. IL-6 оказывает двойственное действие при ишемическом инсульте, выступая в качестве фактора в острой стадии и нейротрофического медиатора в подострой и хронической фазе [11, 12, 34, 35].

Таким образом, аргон-кислородная смесь на модели фотоиндуцированного ишемиче-

ского инсульта снижает выраженность неврологического дефицита, уменьшает очаг повреждения по данным МРТ, снижает уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов, а также влияет на клеточную реакцию согласно гистологическому и иммуногистохимическому анализу.

Ограничения исследования. Одним из основных ограничений исследования являлось использование хлоралгидрата в качестве анестетика на этапе моделирования ишемического инсульта. Однако, на территории Российской Федерации выбор анестетиков очень ограничен. К другим ограничениям следует отнести относительно малую численность животных в группах, особенно в группе ложнооперированных, что снизило статистическую мощность некоторых сравнений. Кроме того, в исследовании не проводили функциональный анализ сохранности нейрональных цепей или оценку поведенческих когнитивных функций, что могло бы дополнительно подтвердить эффективность аргон-кислородной терапии.

Заклучение

Трехкратная 60-минутная ингаляция аргон-кислородной смеси (Ar 70%/O₂ 30%) уменьшает выраженность неврологического дефицита животных после ишемического инсульта за счет влияния на клеточную реакцию в очаге повреждения и пенумбре.

Литература

1. *Острова И. В., Бабкина А. С., Любомудров М. А., Гречко А. В., Голубев А. М.* Применение фотохимического тромбоза для моделирования ишемического инсульта (обзор). *Общая реаниматология*. 2023; 19 (3): 54–65. *Ostrova I. V., Babkina A. S., Lyubomudrov M. A., Grechko A. V., Golubev A. M.* Photochemically induced thrombosis as a model of ischemic stroke (review). *General Reanimatology = Obshchaya Reanimatologiya*. 2023; 19 (3): 54–65. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2023-3-54-65.
2. *Cipriani R., Domezq M., Martín A., Matute C.* Role of microglia in stroke. *Adv Neurobiol*. 2024; 37: 405–422. DOI: 10.1007/978-3-031-55529-9_23. PMID: 39207705.
3. *Bitar L., Puig B., Oertner T. G., Dénes Á., Magnus T.* Changes in neuroimmunological synapses during cerebral ischemia. *Transl Stroke Res*. 2024. DOI: 10.1007/s12975-024-01286-1. PMID: 39103660.
4. *Grinchevskaya L. R., Salikhova D. I., Silachev D. N., Goldshtein D. V.* Neural and glial regulation of angiogenesis in CNS in ischemic stroke. *Bull Exp Biol Med*. 2024. DOI: 10.1007/s10517-024-06219-4. PMID: 39266920.
5. *Hakon J., Quattromani M. J., Sjölund C., Talhada D., Kim B., Moyanova S., Mastroiacovo E., et al.* Inhibiting metabotropic glutamate receptor 5 after stroke restores brain function and connectivity. *Brain*. 2024; 4; 147 (1): 186–200. DOI: 10.1093/brain/awad293. PMID: 37656990.
6. *Takahashi S.* Metabolic contribution and cerebral blood flow regulation by astrocytes in the neurovascular unit. *Cells*. 2022; 11 (5): 813. DOI: 10.3390/cells11050813. PMID: 35269435.
7. *Pinto M. J., Ragozzino D., Bessis A., Audinat E.* Microglial modulation of synaptic maturation, activity, and plasticity. *Adv Neurobiol*. 2024; 37: 209–219. DOI: 10.1007/978-3-031-55529-9_12. PMID: 39207694.
8. *Guffart E., Prinz M.* Evolution of microglia. *Adv Neurobiol*. 2024; 37: 39–51. DOI: 10.1007/978-3-031-55529-9_3. PMID: 39207685.
9. *Knezic A., Budusan E., Saez N. J., Broughton B. R.S., Rash L. D., King G. E., Widdop R. E., et al.* Hila improves sensorimotor deficit following endothelin-1-induced stroke in rats but does not improve functional outcomes following filament-induced stroke in mice. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2024; 7 (4): 1043–1054. DOI: 10.1021/acscsci.3c00328. PMID: 38638162.
10. *Jia J., Yang L., Chen Y., Zheng L., Chen Y., Xu Y., Zhang M.* The role of microglial phagocytosis in ischemic stroke. *Front Immunol*. 2022; 12: 790201. DOI: 10.3389/fimmu.2021.790201. PMID: 35082781.
11. *Zhu H., Hu S., Li Y., Sun Y., Xiong X., Hu X., Chen J., et al.* Interleukins and ischemic stroke. *Front Immunol*. 2022; 13: 828447. DOI: 10.3389/fimmu.2022.828447. PMID: 35173738.
12. *Yuan S., Lin A., He Q.Q., Burgess S., Larsson S. C.* Circulating interleukins in relation to coronary artery disease, atrial fibrillation and ischemic stroke and its subtypes: a two-sample Mendelian randomization study. *Int J Cardiol*. 2020; 313: 99–104. DOI: 10.1016/j.ijcard.2020.03.053. PMID: 32223966.
13. *Kong X., Gong Z., Zhang L., Sun X., Ou Z., Xu B., Huang J., et al.* JAK2/STAT3 signaling mediates IL-6-inhibited neurogenesis of neural stem cells through DNA demethylation/methylation. *Brain Behav Immun*. 2019; 79: 159–173. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.01.027.
14. *Jurcau A., Ardelean A. I.* Oxidative stress in ischemia/reperfusion injuries following acute ischemic stroke. *Biomedicines*. 2022; 10 (3): 574. DOI: 10.3390/biomedicines10030574. PMID: 35327376.
15. *Zhu H., Jian Z., Zhong Y., Ye Y., Zhang Y., Hu X., Pu B., et al.* Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT3 pathway inhibition. *Front Immunol*. 2021; 12: 714943. DOI: 10.3389/fimmu.2021.714943. PMID: 34367186.
16. *Боева Е. А., Гребенчиков О. А.* Органопротективные свойства аргона (обзор). *Общая реаниматология*. 2022; 18 (5): 44–59. *Boeva E. A., Grebenchikov O. A.* Organoprotective properties of argon (review). *General Reanimatology = Obshchaya Reanimatologiya*. 2022; 18 (5): 44–59. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2022-5-44-59.
17. *Боева Е. А., Силачев Д. Н., Якупова Э. И., Милованова М. А., Варнакова Л. А., Калабушев С. Н., Денисов С. О., с соавт.* Изучение

- нейропротективного эффекта ингаляции аргон-кислородной смеси после фотоиндуцированного ишемического инсульта. *Общая реаниматология*. 2023; 19 (3): 46–53. *Boeva E. A., Silachev D. N., Yakupova E. I., Milovanova M. A., Varnakova L. A., Kalabushev S. N., Denisov S. O. et al.* Experimental study of neuroprotective properties of inhaled argon-oxygen mixture in a photoinduced ischemic stroke model. *General Reanimatology = Obshchaya Reanimatologiya*. 2023; 19 (3): 46–53. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2023-3-46-53.
18. *Бочарников А. Д., Боева Е. А., Милованова М. А., Антонова В. В., Якупова Э. И., Гречко А. В.* Оценка нейропротективных свойств анестетиков на моделях повреждения мозга. *Общая реаниматология*. 2024; 20 (2): 65–69. *Vocharnikov A. D., Boeva E. A., Milovanova M. A., Antonova V. V., Yakupova E. I., Grechko A. V.* Neuroprotection by anesthetics in brain injury models. *General Reanimatology = Obshchaya Reanimatologiya*. 2024; 20 (2): 65–69. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2024-2-65-69.
 19. *Silachev D. N., Uchevatkin A. A., Pirogov Y. A., Zorov D. B., Isaev N. K.* Comparative evaluation of two methods for studies of experimental focal ischemia: magnetic resonance tomography and triphenylethylazoles detection of brain injuries. *Bull Exp Biol Med*. 2009; 147 (2): 269–272. DOI: 10.1007/s10517-009-0489-z.
 20. *De Ryck M., Van Reempts J., Borgers M., Wauquier A., Janssen P. A.* Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*. 1989; 20 (10): 1383–1390. DOI: 10.1161/01.str.20.10.1383.
 21. *Jolkonen J., Puurunen K., Rantakömi S., Härkönen A., Haapalimma A., Sivenius J.* Behavioral effects of the alpha (2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2000; 400 (2–3): 211–219. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00409-x.
 22. *Anderson M. B., Das S., Miller K. E.* Subcellular localization of neuronal nuclei (NeuN) antigen in size and calcitonin gene-related peptide (CGRP) populations of dorsal root ganglion (DRG) neurons during acute peripheral inflammation. *Neurosci Lett*. 2021; 760: 135974. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.135974.
 23. *Zhu X., Yi Z., Li R., Wang C., Zhu W., Ma M., Lu J., Li P.* Constructing a transient ischemia attack model utilizing flexible spatial targeting photothrombosis with real-time blood flow imaging feedback. *Int J Mol Sci*. 2024; 25 (14): 7557. DOI: 10.3390/ijms25147557. PMID: 39062800.
 24. *Villa-González M., Rubio M., Martín-López G., Mallavibarrena P. R., Vallés-Saiz L., Vivien D., Wandosell F, et al.* Pharmacological inhibition of mTORC1 reduces neural death and damage volume after MCAO by modulating microglial reactivity. *Biol Direct*. 2024; 19 (1): 26. DOI: 10.1186/s13062-024-00470-5. PMID: 38582839.
 25. *Koukalova L., Chmelova M., Amlerova Z., Vargova L.* Out of the core: the impact of focal ischemia in regions beyond the penumbra. *Front Cell Neurosci*. 2024; 18: 1336886. DOI: 10.3389/fncel.2024.1336886. PMID: 38504666.
 26. *Chiang P. T., Tsai H. H., Yen R. F., Tsai Y. C., Wu C.H., Chiu C. H., Tsai L. K.* In vivo detection of poststroke cerebral cell proliferation in rodents and humans. *Ann Clin Transl Neurol*. 2024; 11 (2): 497–507. DOI: 10.1002/acn3.51972.
 27. *Chen W., Zhang Y., Yin M., Cheng Z., Li D., Luo X., Liu X., et al.* Circular R. N.A circPRDX3 mediates neuronal survival apoptosis in ischemic stroke by targeting miR-641 and NPR3. *Brain Res*. 2022; 1797: 148114. DOI: 10.1016/j.brainres.2022.148114.
 28. *Kanemura Y., Yamamoto A., Katsuma A., Fukusumi H., Shofuda T., Kanematsu D., Handa Y, et al.* Human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells showed neuronal differentiation, neurite extension, and formation of synaptic structures in rodent ischemic stroke brains. *Cells*. 2024; 13 (8): 671. DOI: 10.3390/cells13080671. PMID: 38667286.
 29. *Boyle B. R., Berghella A. P., Blanco-Suarez E.* Astrocyte regulation of neuronal function and survival in stroke pathophysiology. *Adv Neurobiol*. 2024; 39: 233–267. DOI: 10.1007/978-3-031-64839-7_10. PMID: 39190078.
 30. *Krenzlin H., Wesp D. M.A., Korinek A. A.E., Ubbens H., Volland J., Masomi-Bornwasser J., Weber K. J., et al.* Effects of argon in the acute phase of subarachnoid hemorrhage in an endovascular perforation model in rats. *Neurocrit Care*. 2024. DOI: 10.1007/s12028-024-02090-3. PMID: 39174846.
 31. *Moulson A. J., Squair J. W., Franklin R. J.M., Tetzlaff W., Assinck P.* Diversity of reactive astrogliosis in CNS pathology: heterogeneity or plasticity? *Front Cell Neurosci*. 2021; 15: 703810. DOI: 10.3389/fncel.2021.703810. PMID: 34381334.
 32. *Takamatsu H., Tatsumi M., Nitta S., Ichise R., Muramatsu K., Iida M., Nishimura S., et al.* Time courses of progress to the chronic stage of middle cerebral artery occlusion models in rats. *Exp Brain Res*. 2002; 146 (1): 95–102. DOI: 10.1007/s00221-002-1147-0. PMID: 12192583.
 33. *Qin C., Zhou L. Q., Ma X.T., Hu Z.W., Yang S., Chen M., Bosco D. B., et al.* Dual functions of microglia in ischemic stroke. *Neurosci Bull*. 2019; 35 (5): 921–933. DOI: 10.1007/s12264-019-00388-3.
 34. *Силкин В. В., Еришов В. И., Бурдаков В. В., Бирюкова Т. В., Бредихин А. Ю., Лозинская Т. Ю.* Математическое моделирование тяжелого ишемического инсульта с полиорганной недостаточностью: ретроспективное наблюдательное исследование. *Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова*. 2023; (1): 91–100. *Silkin V. V., Yershov V. I., Burdakov V. V., Biryukova T. V., Bredikhin A. Yu., Lozinskaya T. Yu.* Mathematical modeling of severe ischemic stroke with multiple organ failure: a retrospective observational study. *Ann Crit Care = Vestnik Intensivnoy Terapii im A. I. Saltanova*. 2023; (1): 91–100. (in Russ.). DOI: 10.21320/1818-474X-2023-1-91-100.
 35. *Авидзба А. Р., Саскин В. А., Киров М. Ю.* Гемодинамика и реперфузионная терапия при ишемическом инсульте: друзья или враги? *Анестезиология и реаниматология*. 2024; (2): 91–96. *Avidzba A. R., Saskin V. A., Kirov M. Y.* Hemodynamics and reperfusion in ischemic stroke: friends or foes? *Russ J Anesthesiol.Reanimatol = Anesteziologiya i Reanimatologiya*. 2024; (2): 91–96. DOI: 10.17116/anaesthesiology202402191.

Поступила 28.03.2025
Принята 23.04.2025