

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛОКАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТНОЙ ГИПОТЕРМИИ ПРИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ЭНДОТЕЛИНОМ-1, В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС.

I. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

© 2025 г. Г. Ф. Закирова¹, К. А. Чернова¹, Р. Н. Хазипов^{1,2,*}, А. В. Захаров^{1,3}

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

²Aix-Marseille University, INMED, INSERM, Marseille, France

³Казанский государственный медицинский университет

*E-mail: roustem.khazipov@inserm.fr

Поступила в редакцию 11.09.2024 г.

После доработки 13.10.2024 г.

Принята к публикации 17.10.2024 г.

Локальная терапевтическая гипотермия (ЛТГ) является одним из перспективных методов нейропротекции при ишемии коры головного мозга. Однако эффективность поверхностной ЛТГ в клинически релевантных временных пределах после начала ишемической атаки остается малоизученной. В настоящей работе исследованы нейропротекторные эффекты ЛТГ в модели фокальной ишемии, вызываемой эпилептиальной аппликацией вазоконстриктора эндотелина-1 в области соматосенсорной коры головного мозга крыс. Нейропротекторные эффекты ЛТГ оценивались по уровню спонтанной и сенсорно-вызванной электрической активности на различных глубинах коры с использованием линейных погружных матриц электродов. Было обнаружено, что охлаждение поверхности коры до 28°C с помощью элемента Пельтье с задержкой 0, 10 и 60 мин после аппликации эндотелина-1 вызывает значительное уменьшение степени подавления электрической активности в ишемическом очаге по прошествии 3 ч после аппликации эндотелина-1. Нейропротекторные эффекты ЛТГ проявлялись в виде большего уровня частоты спонтанных потенциалов действия нейронов, большей мощности осцилляций полевого потенциала в тета-, альфа- и бета-диапазонах, а также в виде большей амплитуды полевого потенциала и частоты потенциалов действия во время сенсорно-вызванных ответов. Нейропротекторные эффекты ЛТГ обратно коррелировали с задержкой начала ЛТГ и были наиболее выражены при ЛТГ, начатой с минимальной (0 и 10 мин) задержкой после аппликации эндотелина-1. Также было обнаружено, что лишь ЛТГ, начатая одновременно с аппликацией эндотелина-1, задерживает развитие волн распространяющейся деполяризации и что ЛТГ не влияет на амплитуду негативных ультрамедленных потенциалов, вызванных эндотелином-1. В совокупности результаты электрофизиологического анализа указывают на нейропротекторные эффекты поверхностной ЛТГ, особенно выраженные при минимальной задержке ЛТГ после начала ишемического процесса в модели фокальной ишемии, вызываемой эндотелином-1.

Ключевые слова: инсульт, ишемия головного мозга, электроэнцефалография, локальные потенциалы, нейропротекция, гипотермия

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия головного мозга является одной из наиболее значимых проблем современного здравоохранения [1, 2]. Восстановление кровотока в тромбированных сосудах является эффективным методом лечения острого инсульта, но при условии, что оно проводится в рамках довольно узкого терапевтического окна [3–5]. Действительно, время начала реперфузионной терапии при остром ишемическом инсульте является основным фактором, определяющим смертность и долгосрочную инвалидизацию пациентов. Первый час от начала инсульта считается "золотым часом", в течение которого лечение обладает наибольшей эффективностью и наименьшими побочными эффектами [6–8]. Однако в клинической практике задержки в транспортировке и маршрутизации пациентов, а также трудности с доступом к компьютерной томографии часто приводят к задержке начала лечения. В связи с этим актуальными являются реалистичные методы ранней нейропротекции, которые позволили бы продлить временное окно "золотого часа" от момента начала ишемии до применения реперфузионной терапии.

Терапевтическая гипотермия (ТГ) является одним из перспективных методов нейропротекции при острой ишемии головного мозга. Охлаждение влияет на многие аспекты патофизиологии головного мозга и регулирует почти все пути, участвующие в развитии ишемического инсульта, что способствует выраженному нейропротекторному эффекту гипотермии [9]. Основным свойством нейропротекторного эффекта ТГ является снижение метаболических потребностей головного мозга. Считается, что снижение температуры на 1°C уменьшает метаболические потребности мозга от 5–6 до 10%, а при достижении температуры 33°C уровень метаболизма снижается на 25–40% [10]. На сегодняшний день ТГ показала себя как перспективный метод ранней нейропротекции. Эффективное использование ТГ является повседневной практикой для лечения гипоксически-ишемической энцефалопатии у новорожденных и для предотвращения гипоксического повреждения головного мозга при остановке сердца в кардиохирургии [11, 12]. Применение методик ТГ как с целью защиты зоны пенумбры, так и при проведении реканализации являются перспективными и при фокальном ишемическом инсульте [13]. Локальная терапевтическая гипотермия (ЛТГ) является одним из вариантов ТГ, при которой избирательно охлаждается лишь поврежденный участок головного мозга путем локального охлаждения поверхности мозга или охлаждения в локальном кровотоке [14, 15]. ЛТГ позволяет избежать системного охлаждения и сопутствующих ему побочных эффектов, а ее поверхностный вариант привлекателен своей относительной доступностью на самом раннем этапе ишемического процесса [16, 17]. В связи с этим нами была исследована эффективность поверхностной ЛТГ при фокальной ишемии, вызываемой в соматосенсорной коре вазоконстриктором эндотелином-1 (ЭТ1). Целью данной работы являлось изучение нейропротекторного эффекта по функциональным электрофизиологическим параметрам активности коры головного мозга, а в сопутствующей работе представлены результаты морфологического анализа ишемических очагов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка животных

В исследовании использовались крысы Wistar обоих полов в возрасте 1.5–2 месяцев. Хирургическая операция для подготовки животного к эксперименту проводилась под изофлурановой анестезией (4% для индукции, 2% для поддержания). Непосредственно перед операцией внутрибрюшинно вводился ксилазин (10 мг/кг). Далее кожа над черепом и надкостница удалялись, поверхность черепа тщательно промывалась 0.9%-ным раствором NaCl, а затем просушивалась. Затем доза изофлурана снижалась до 1% и животным вводился уретан (1.25 г/кг, внутрибрюшинно). Далее животное пе-

ремещалось в экспериментальную установку и располагалось на термостатируемом коврик (37°C), голова крысы крепилась к стереотаксической раме (Narishige, Япония) для регистрации в условиях фиксированного положения головы. Для снижения мозгового давления и пульсаций вскрывался четвертый желудочек. Над левым полушарием высверливалось черепное окно размером $\sim 6 \times 5$ мм, а твердая мозговая оболочка аккуратно рассекалась в области бочонковой коры с помощью острой иглы и удалялась. В качестве электрода сравнения использовался хлорсеребряный электрод (Ag/AgCl), помещенный в мозжечок.

Запись электрической активности

Запись внеклеточных электрических сигналов проводилась с помощью 16-канальной линейной матрицы иридиевых электродов на кремниевой подложке (далее – зонд) с расстоянием 100 мкм между соседними электродами (Neuropexus, США). Зонд вводили на глубину 1.6–1.8 мм перпендикулярно поверхности бочонковой коры, которая получает сенсорный вход от лицевых вибрисс. В каждом эксперименте определялась основная вибрисса, механическая стимуляция которой вызывала ответы с минимальной задержкой в таламорецепиентном 4-м слое и на границе между 5-м и 6-м слоями соматосенсорной коры. Стимуляция проводилась прямоугольными импульсами длительностью 200 мс с интервалом 5 с. Спонтанная активность анализировалась в промежутках между стимулами.

Анализ электрофизиологических данных

Электрические сигналы в полосе частот от 0 до 9 кГц регистрировали с помощью усилителя DigitalLynx (Neuralynx, Vozeman, MT, США) в режиме постоянного тока (диапазон входного сигнала ± 131 мВ) либо с частичным подавлением низкочастотной составляющей R-RC фильтром и с последующим восстановлением полночастотного сигнала, как описано ранее [18]. Сигналы оцифровывались с частотой 32 кГц и сохранялись на компьютере для последующего анализа с помощью пользовательских функций в MATLAB (MathWorks, Natick, MA, США). Детекция множественных потенциалов действия (МПД) осуществлялась на исходных записях с частотой дискретизации 32 кГц, для чего сигналы фильтровались в диапазоне частот 300–5000 Гц. За потенциалы действия принимались отрицательно полярные события с амплитудой выше 4 стандартных отклонений. Стандартное отклонение рассчитывалось для наиболее спокойного сегмента отфильтрованного сигнала длительностью 1 с. Фильтрация с частотами среза выше 2 Гц осуществлялась с помощью цифрового фильтра Чебышева II типа (функция *cheby2*). Для фильтрации с частотами среза менее 2 Гц использовался цифровой RC-фильтр.

В качестве локального полевого потенциала (ЛПП) анализировались сигналы, редуцированные до частоты дискретизации 1 кГц (функция *resample*). Мощность ЛПП рассчитывалась как средняя спектральная мощность сигнала в следующих диапазонах частот: дельта (0.5–4 Гц), тета (4–7 Гц), альфа (7–15 Гц), бета (15–30 Гц), гамма (30–90 Гц), быстрая гамма (90–200 Гц) и сверхбыстрая гамма (200–500 Гц). Спектральный анализ проводился с помощью программы Chronux Toolbox [19]. Анализ ЛПП и параметров возникновения ПД проводился с помощью программы Eview [20], разработанной с применением базовых программ MATLAB и Chronux toolbox. Оценка плотности источников тока (ПИТ) проводилась для локализации сенсорных синаптических входов. ПИТ вычислялась путем решения обратной задачи электростатики в модели тонких дисковых источников [21]. Количество отдельных потенциалов действия во время сенсорно-вызванного потенциала (СВП) было подсчитано в отрезке 0–30 мс от начала СВП. При анализе параметров вызванной и спонтанной электрической активности после трех часов действия ЭТ1 производили нормирование значений относи-

тельно контрольных уровней, которые вычисляли как медианы в 15-минутном отрезке до начала воздействия. Детекция и анализ распространяющихся деполяризаций (РД) проводили как описано ранее [22]. За начало РД принималось время максимальной скорости деполяризации на фронте РД.

Охлаждение коры головного мозга крысы

Для поддержания температуры коры головного мозга на определенном значении использовалась U-образная металлическая пластина с элементом Пельтье [23, 24]. Металлическая пластина располагалась вблизи поверхности коры головного мозга (рис. 1, а, б) и заливалась агаром (4%-ный раствор в физиологическом растворе), покрывая пластину и всю область черепного окна для предотвращения высыхания коры. Для контроля температуры к концу металлической пластины прикреплялся датчик с помощью теплопроводящего клея. Температура пластины поддерживалась с помощью элемента Пельтье на уровне 39°C в контроле и 28°C во время охлаждения.

Схема эксперимента

Каждый эксперимент длился 4 ч, его схема представлена на рис. 1, с. В течение первого часа эксперимента (контроль) температура коры поддерживалась на уровне 39°C и регистрировались контрольные значения спонтанной и сенсорно-вызванной активности в коре. Затем ЭТ1 (1 мкМ) апплицировался эпилептично на поверхность коры с помощью микроинъектора под слой агара (9 мкл в течение 2 мин), а температуру либо поддерживали без изменений на уровне 39°C до конца эксперимента (группа нормотермия, НТ), либо снижали до 28°C в момент аппликации ЭТ1 (группа гипотермия – 0', ГТ-0') или с задержкой 10 мин (группа гипотермия – 10', ГТ-10') для воспроизведения клинически релевантной ситуации быстрой детекции начала ишемии и оперативного начала гипотермического лечения, либо снижали до 28°C через один час после аппликации ЭТ1 (группа гипотермия – 60', ГТ-60'; в случае задержанной детекции ишемии и ее гипотермического лечения). Следует отметить, что ЭТ1 в данных экспериментальных условиях не отмывался в отличие от ранее опубликованного исследования с эпилептиальной аппликацией ЭТ1 в суперфузионную ванночку [25]. После эксперимента мозг крысы извлекался, с помощью вибратора нарезался на срезы толщиной 0.4 мм, которые окрашивались 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТС), и рассчитывался объем вызванного ишемией очага по размерам поражения в серийных срезах (методические детали и результаты представлены в сопутствующей статье).

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводился с использованием программных инструментов MATLAB Statistics. Для множественного сравнения выборок использовался тест Краскела–Уоллиса (функция *kruskalwallis*), апостериорную оценку достоверности различий между парами выборок производили с помощью теста Данна. Степень отличия экспериментальных выборок от контрольного уровня оценивалась ранговым тестом Уилкоксона (функция *signrank*). Значимыми считали различия с уровнем вероятности $p < 0.05$. Корреляции рассчитывались как коэффициент корреляции Спирмена (функция *corr*). Объединенные данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей, которые организованы в виде ромбов, горизонтальная диагональ которых обозначает медиану, верхний и нижний угол – 75-й и 25-й квартили соответственно. Вертикальными линиями обозначены пределы выборки, вычисляемые через значения трех квартилей: $Q3 + 1.5*(Q3 - Q1)$ и $Q1 - 1.5*(Q3 - Q1)$.

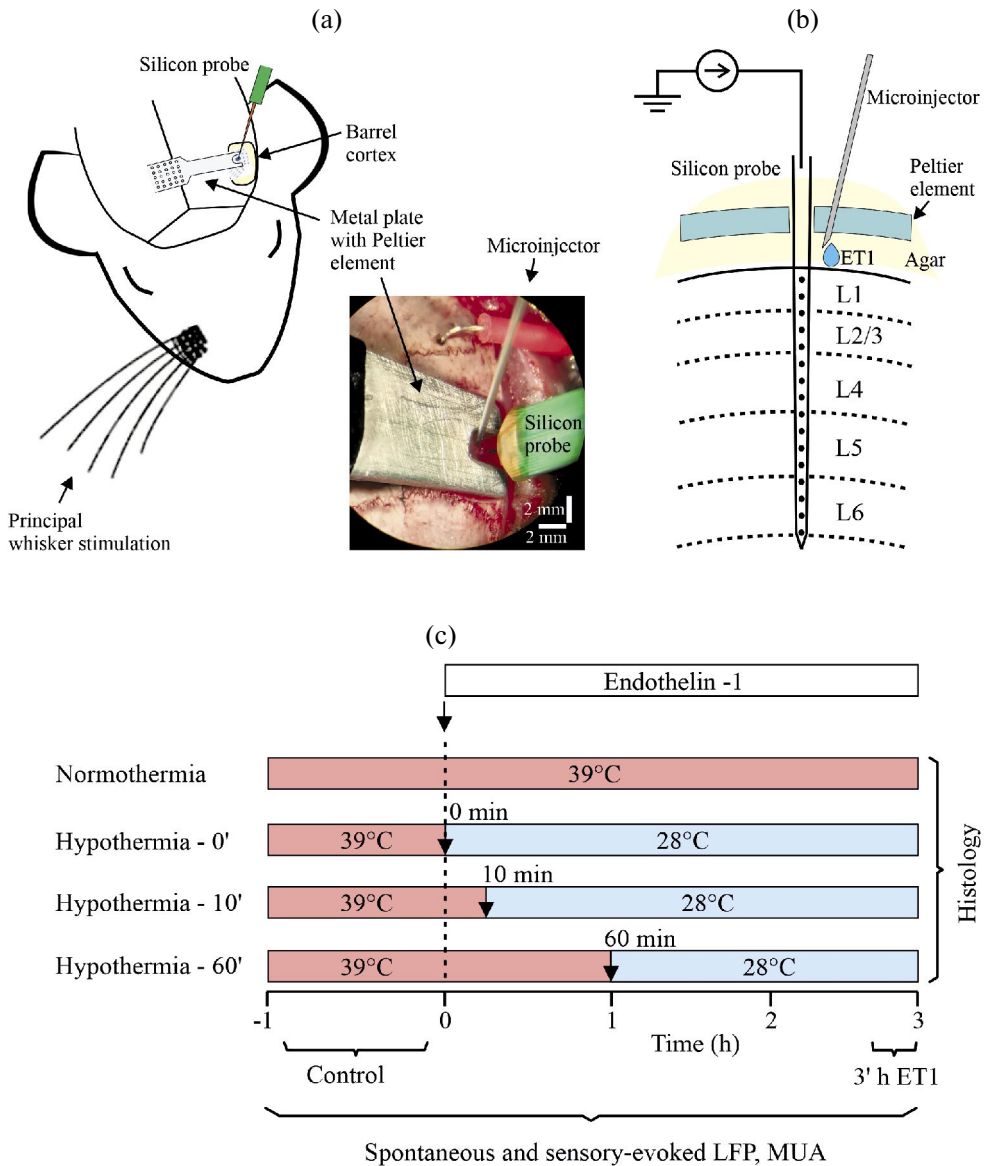


Рис. 1. Схема эксперимента. (a) – схема расположения металлической пластины с элементом Пельтье (metal plate with Peltier element) и зонда (silicon probe) в бочонковой коре (barrel cortex) крысы. Стрелкой показана стимуляция вибриссы. На вставке справа – соответствующая микрофотография (до нанесения агара); (b) – 16-канальный линейный электрод вводился вертикально в центр черепного окна для регистрации электрической активности всех слоев (L1–L6; L – layer, слой) бочонковой коры. Эпипиальная аппликация ЭТ1 осуществлялась с помощью микроинъектора (microinjector). Металлическая пластина с элементом Пельтье располагалась вблизи поверхности коры мозга и заливалась агаром; (c) – временной план эксперимента в 4 группах животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе исследовалось влияние ЛТГ на спонтанную и сенсорно-вызванную электрическую активность в соматосенсорной бочонковой коре головного мозга крыс в острой фазе фокальной ишемии, вызываемой эпилептической аппликацией ЭТ1. На рис. 2 представлены примеры записи спонтанных ЛПП и МПД в различных слоях коры в контрольных условиях и по прошествии 3 ч после аппликации ЭТ1 в условиях нормотермии, а также в условиях ЛТГ, начатой одновременно с аппликацией ЭТ1 или с задержкой в 10 и 60 мин. Активность до аппликации ЭТ1 в контрольных условиях характеризовалась медленно-волновыми дельта-осцилляциями, сопровождавшимися переходами между UP-состояниями, которые группировали высокочастотные осцилляции в тета-, альфа-, бета- и гамма-диапазонах и ассоциировались со всплесками МПД и DOWN-состояниями, которые сопровождались практически полным подавлением активности коры. Наряду с дельта-волновой активностью также наблюдались эпизоды активности в альфа-частотном диапазоне, которые по своим характеристикам соответствуют паттерну сонных веретен. В ишемическом очаге, сформированном через 3 ч после эпилептической аппликации ЭТ1 в нормотермических условиях, наблюдалось снижение общего уровня ЛПП активности и частоты МПД по всей глубине коры (рис. 2, б), что согласуется с предыдущими данными [25]. В случаях поверхностного охлаждения коры, начатого либо одновременно с аппликацией ЭТ1, либо с задержкой в 10 мин после аппликации ЭТ1, спонтанная электрическая активность в ишемическом очаге в значительной мере сохранялась (рис. 2, с, d). Если же охлаждение коры начиналось через 1 ч после аппликации ЭТ1, то электрическая активность в очаге оставалась в значительной степени подавленной к 3-му часу после аппликации ЭТ1 (рис. 2, е). В соответствии с этими наблюдениями количественный анализ мощности ЛПП активности в различных диапазонах ЭЭГ частот выявил достоверно больший уровень мощности ЛПП в тета-, бета- и гамма- частотных диапазонах в ишемических очагах в случаях ранней ЛТГ по сравнению с нормотермическими условиями (табл. 1).

Далее нами был проведен анализ степени снижения частоты МПД в ишемических очагах, формирующихся после 3 ч аппликации ЭТ1 (рис. 3, а). Снижение частоты МПД во многом отражает уменьшение количества нейронов, способных генерировать ПД из-за необратимой потери мембранного потенциала и гибели нейронов в ишемическом очаге [26]. Для глобальной оценки нарушений в спайковой активности нейронов был произведен расчет суммарной частоты спонтанных МПД во всех слоях кортикальной колонки (Σ МПД, Σ MUA) относительно контрольного уровня. Как было показано ранее, данный параметр является одним из наиболее достоверных маркеров функционального поражения в ишемическом очаге [25]. В нормотермических условиях Σ МПД в ишемическом очаге снижался до уровня 0.0 [0.0–0.9]% от контрольных значений, что свидетельствует об очень глубокой степени функционального поражения (рис. 3, б). ЛТГ достоверно уменьшала степень падения Σ МПД в очаге (рис. 3, б). Так, охлаждение коры, начатое одновременно с аппликацией ЭТ1, приводило к увеличению уровня Σ МПД до 30.1 [2.0–128.7]%, а в группе ГТ-10' – до 23.6 [5.3–44.6]% от контрольных значений. Уровень Σ МПД при охлаждении коры с задержкой в 1 ч после аппликации ЭТ1 (ГТ-60') составил 3.1 [0.0–26.7]% от контрольных значений, что также было выше уровня Σ МПД в нормотермических условиях (рис. 3, б). Таким образом, судя по параметру Σ МПД, охлаждение коры оказывает нейропротекторный эффект, который наиболее выражен при минимальных задержках ЛТГ после аппликации ЭТ1. Поэтому далее была проанализирована зависимость уровня Σ МПД в ишемическом очаге от задержки охлаждения коры относительно аппликации ЭТ1. В данном анализе, учитывая 3-часовую длительность экспозиции ЭТ1, которая заканчивалась эвтаназией животного и приготовлением срезов мозга для последующего гистологического анализа, условно нормотермии было придано значение времени 180 мин задержки гипотермии от начала аппликации ЭТ1. В ре-

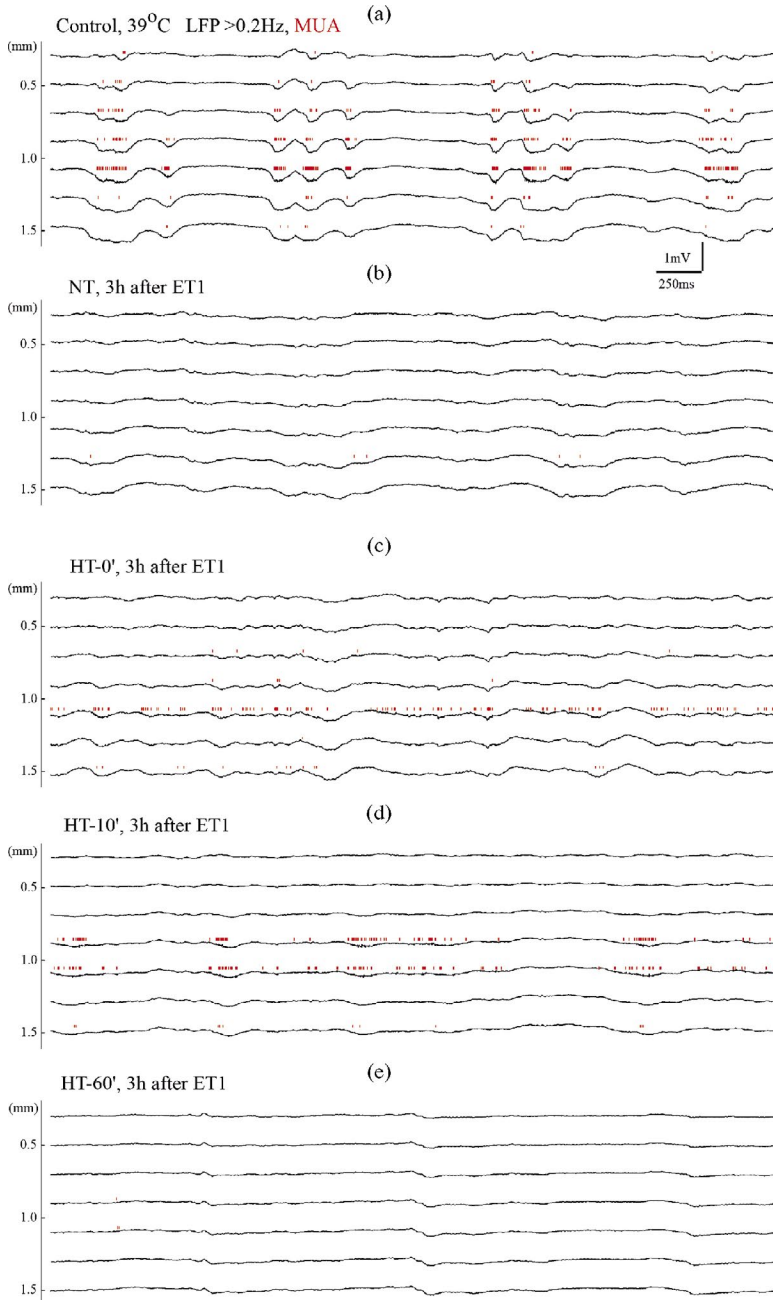


Рис. 2. Влияние локальной гипотермии на спонтанную электрическую активность коры мозга в ишемическом очаге, вызванном ЭТ1. (а) – спонтанная электрическая активность до аппликации ЭТ1 при температуре 39°C (контрольные условия). Показаны ЛПП (LFP) в диапазоне частот 0.2–1000 Гц (черные линии) и МПД (MUA; красные вертикальные отрезки) на различных глубинах коры; (б) – спонтанная электрическая активность через 3 ч после аппликации ЭТ-1 при температуре 39°C. (с, d, e) – примеры электрической активности в условиях охлаждения поверхности мозга до 28°C одновременно (с), через 10 мин (d) и 60 мин (e) после аппликации ЭТ-1. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

Таблица 1. Эффекты локальной гипотермии на мощность осцилляторной ЛПП активности в различных диапазонах частот в очаге ишемии, вызванном аппликацией ЭТ1, в соматосенсорной коре крысы

Параметр	Процент восстановления, медиана [Q1–Q3] %	Вероятность (значение <i>p</i>)	<i>n</i>
θ (4–7 Hz), C2/3, НТ	8.3 [1.7–18.4]	0.047	5
θ (4–7 Hz), C2/3, ГТ-0'	37.5 [20.0–41.7]		5
α (7–15 Hz), C4, ГТ-0'	12.0 [8.5–49.4]	0.044	5
α (7–15 Hz), C4, ГТ-60'	4.5 [0.6–8.4]		6
α (7–15 Hz), C5, НТ	4.5 [2.1–7 .1]	0.047	5
α (7–15 Hz), C5, ГТ-0'	19.1 [12.9–21.5]		0.028
α (7–15 Hz), C5, ГТ-60'	4.6 [1.6–9.4]	6	
γ (30–90 Hz), C5, НТ	16.0 [8.6–24.4]	0.047	5
γ (30–90 Hz), C5, ГТ-0'	40.0 [30.8–43.8]		5
fast γ (90–200 Hz), C5, НТ	25.7 [18.5–32.6]	0.016	5
fast γ (90–200 Hz), C5, ГТ-0'	56.7 [41.2–111.2]		5
ultrafast γ (200–500 Hz), C5 ГТ-10'	80.0 [59.5–183.4]	0.016	5
ultrafast γ (200–500 Hz), C5, НТ	20.9 [17.5–31.6]		0.044
ultrafast γ (200–500 Hz), C5 ГТ-60'	47.3 [32.9–60.7]	6	

При сравнении медиан с уровнем 100% (контроль) применялся ранговый тест Краскела–Уоллиса (непараметрический ANOVA). НТ – нормотермия, ГТ – гипотермия.

зультате этого корреляционного анализа также было обнаружено значительное уменьшение уровня ΣМПД в ишемическом очаге от задержки ЛТГ от времени аппликации ЭТ1 (рис. 3, с). В дополнение к анализу глобальной нейрональной активности по всей колонке нами также был проведен анализ частоты МПД отдельно по поверхностным (L2/3), гранулярному (L4) и глубокому (L5/6) слоям коры в ишемическом очаге (рис. 3, d). Было обнаружено, что при ЛТГ, начатой одновременно с аппликацией ЭТ1, уровень частоты МПД в 4-м слое бочонковой коры был достоверно выше, чем в нормотермических условиях. Следует отметить, что в группе нормотермии активность была более сильно подавлена в поверхностных слоях 2/3 (0.0 [0.0–0.3]%) и в 4-м слое (0.0 [0.0–0.1]%) по сравнению с глубокими слоями (3.6 [0.0–13.4]%), что согласуется с вертикальным градиентом ишемического поражения, вызываемого эпипиальной аппликацией ЭТ1 [25].

Наряду с анализом спонтанной активности нами также сравнивалась степень подавления сенсорных ответов в ишемическом очаге при нормотермических условиях и при охлаждении коры, поскольку этот параметр также является высокоинформативным маркером степени ишемического поражения, вызываемого ЭТ1 в соматосенсорной коре [25]. В контрольных условиях сенсорно-вызванные потенциалы (СВП, SEP), вызываемые отклонением основной вибриссы, имели характерные глубинные профили ЛПП и ПИТ (рис. 4, а), а также соответствующий профиль сенсорно-вызванных МПД (рис. 5, а) [24, 25, 27]. В ишемическом очаге, сформированном в течение 3 ч после аппликации ЭТ1, в нормотермических условиях наблюдалось глубокое подавление амплитуды СВП в кор-

тикальной колонке (рис. 4, a, b), а также вертикальный градиент с наибольшим подавлением в поверхностных слоях коры (рис. 4, d), что согласуется с данными предыдущего исследования [25]. Локальное охлаждение коры, начатое со всеми исследованными задержками от аппликации ЭТ1 (0, 10 и 60 мин), значительно снижало степень подавления СВП в ишемическом очаге в сравнении с нормотермическими условиями (рис. 4, b). Корреляционный анализ также выявил значительное уменьшение уровня СВП в ишемическом очаге с увеличением задержки ЛТГ от времени аппликации ЭТ1 (рис. 4, c). Слойный анализ выявил большую степень подавления амплитуды СВП в поверхностных

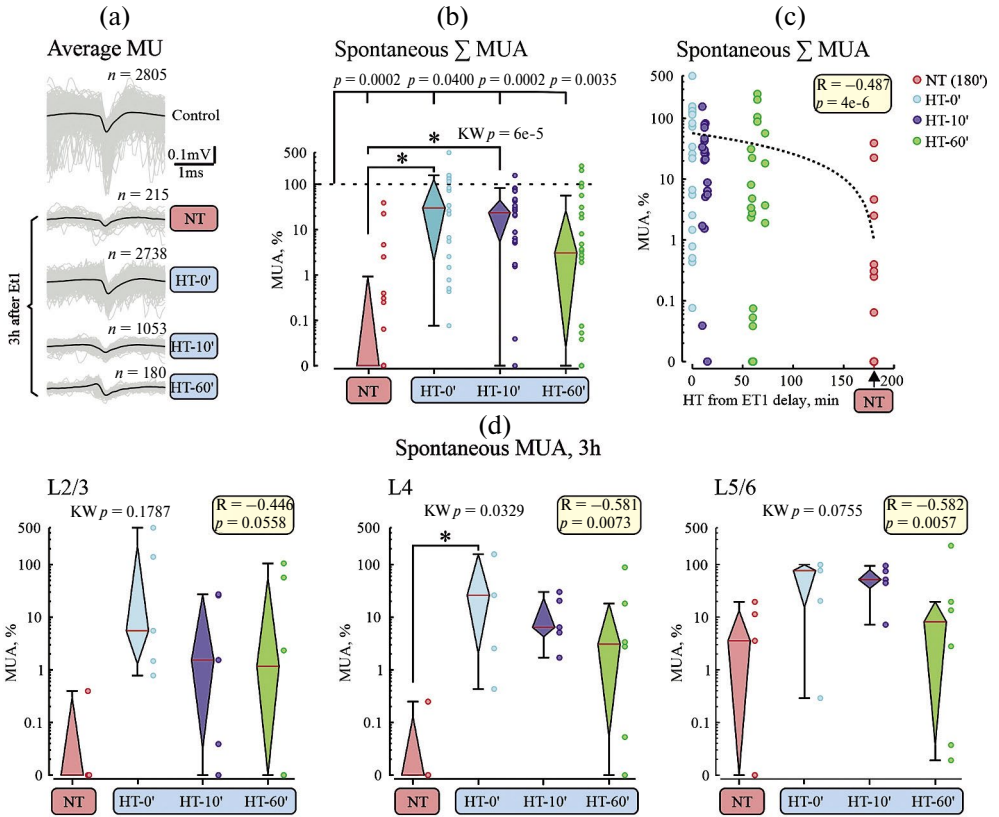


Рис. 3. Влияние локальной гипотермии на частоту МПД в ишемическом очаге, вызванном ЭТ1. (a) – МПД (MUA) нейронов 5-го слоя (индивидуальные потенциалы действия – серые линии и усредненные – черные линии). Показаны примеры для всех температурных режимов. (b) – частота спонтанных МПД, рассчитанная по всем электродам в кортикальной колонке (Σ MUA), после 3 ч действия ЭТ1 (1 мкМ) в условиях нормотермии (39°C) и при охлаждении до температуры 28°C, начатом одновременно, через 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1. Данные нормализованы к контрольному уровню до аппликации ЭТ1. Вверху показаны вероятности статистических отличий групп от контроля (от уровня 100%) по тесту ранговых сумм для парных выборок (величина p), вероятности различий между группами по тесту Краскелла–Уоллиса (KW p) и достоверные различия между группами по тесту Данна (звездочки); (c) – зависимость Σ MUA в ишемическом очаге от времени начала охлаждения. Нормотермические эксперименты учтены с временем задержки 180 мин. Черной пунктирной линией показана линейная аппроксимация. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности; (d) – уровень частоты МПД относительно контрольных значений в ишемическом очаге при различных температурных условиях в различных слоях кортикальной колонки. Уровень достоверности отличия группы от контроля (от уровня 100%, как на панели b) по тесту ранговых сумм для парных выборок показан над боксами. В рамках показаны коэффициенты корреляции Спирмена параметра от времени включения охлаждения и соответствующие уровни достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

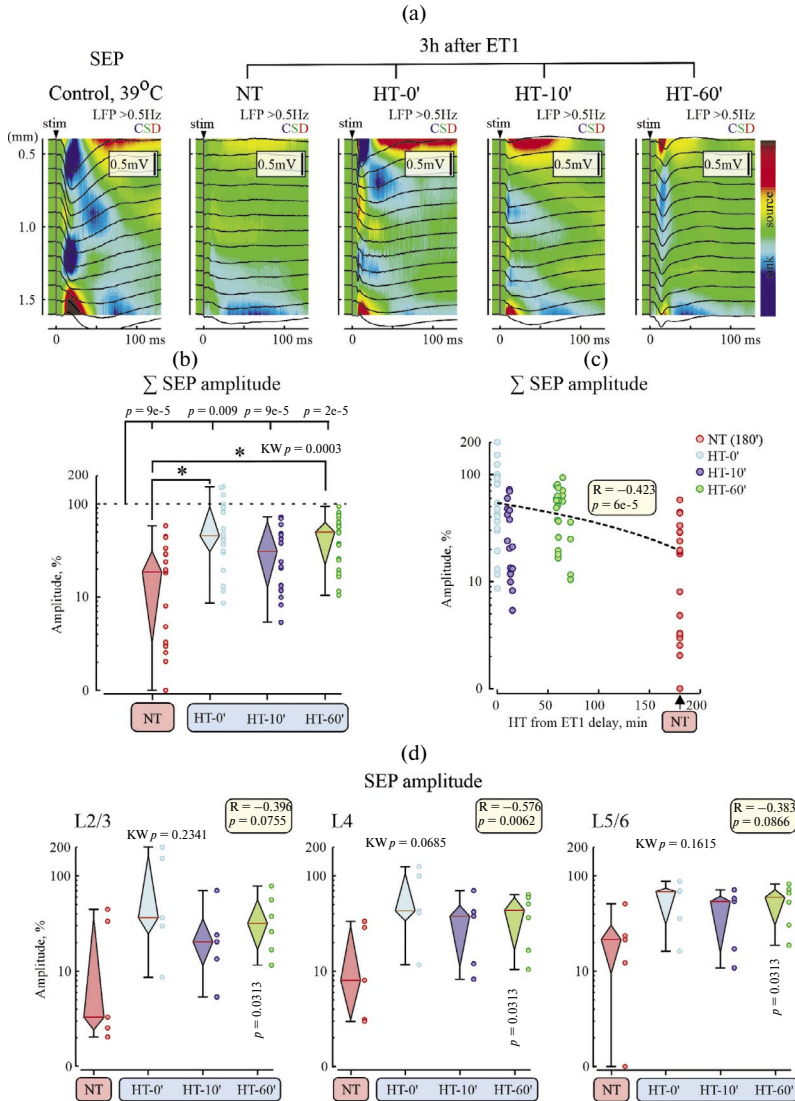


Рис. 4. Влияние локальной гипотермии на сенсорно-вызванные потенциалы в ишемическом очаге, вызванном ЭТ1. (а) – примеры усредненных сенсорно-вызванных потенциалов (SEP) на различных глубинах кортикальной колонки (ЛШП, черные линии) на фоне кодированных цветом карт ПИТ в контрольных условиях и в ишемических очагах, вызванных аппликацией ЭТ1 при различных задержках ЛПТ; (б) – амплитуда СВП, рассчитанная по всем электродам в кортикальной колонке (Σ SEP), после 3 ч действия ЭТ1 в условиях нормотермии (39°C) и при охлаждении до температуры 28°C, началом одновременно, через 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1. Данные нормализованы к контрольному уровню до аппликации ЭТ1. Вверху показаны вероятности статистических отличий групп от контроля (от уровня 100%) по тесту ранговых сумм для парных выборок (величина p), вероятности различий между группами по тесту Краскела–Уоллиса (KW p) и достоверные различия между группами по тесту Данна (звездочки); (с) – зависимость Σ SEP в ишемическом очаге от времени начала охлаждения. Нормотермические эксперименты учтены с временем задержки 180 мин. Черной пунктирной линией показана линейная аппроксимация. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности; (д) – уровень амплитуды СВП относительно контрольных значений в ишемическом очаге при различных температурных условиях в различных слоях кортикальной колонки. Уровень достоверности отличия группы от контроля (от уровня 100%, как на панели б) по тесту ранговых сумм для парных выборок показан под боксами. В рамках показаны коэффициенты корреляции Спирмена параметра от времени включения охлаждения и соответствующие уровни достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

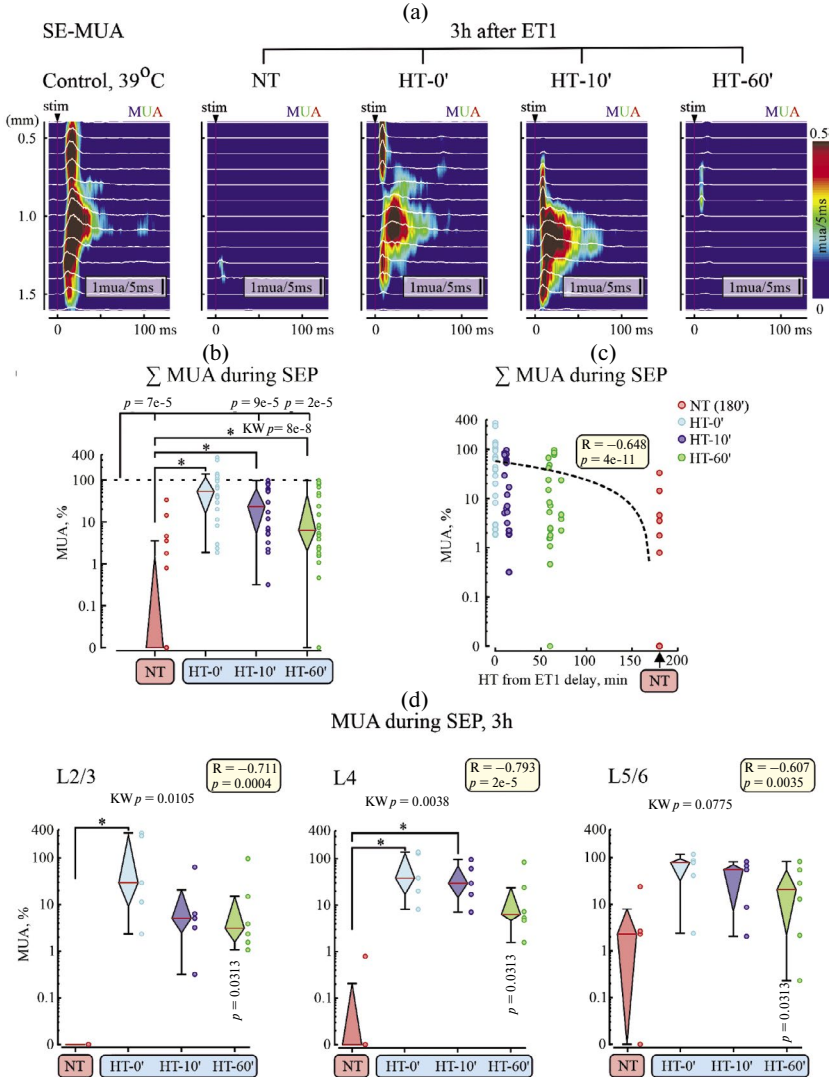


Рис. 5. Влияние локальной гипотермии на сенсорно-вызванные МПД в ишемическом очаге, вызванном ЭТ1. (а) – примеры графиков частоты сенсорно-вызванных МПД (SE-MUA) на различных глубинах кортикальной колонки (белые линии) на фоне кодированных цветом карт плотности МПД в контрольных условиях и в ишемических очагах, вызванных аппликацией ЭТ1 при различных задержках ЛТГ; (б) – частота МПД, рассчитанная по всем электродам в кортикальной колонке (Σ MUA during SEP), временном окне 0–30 мс от начала СВП, после 3 ч действия ЭТ1 в условиях нормотермии (39°C) и при охлаждении до температуры 28°C, начатом одновременно, через 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1. Данные нормализованы к контрольному уровню до аппликации ЭТ1. Вверху показаны вероятности статистических отличий групп от контроля (от уровня 100%) по тесту ранговых сумм для парных выборок (величина p), вероятности различий между группами по тесту Краскела–Уоллиса (KW p) и достоверные различия между группами по тесту Данна (звездочки); (с) – корреляция степени восстановления сенсорно-вызванных МПД от времени начала охлаждения. Нормотермические эксперименты учтены с временем задержки 180 мин. Черной пунктирной линией показана линейная аппроксимация. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности; (д) – уровень частоты сенсорно-вызванных МПД относительно контрольных значений в ишемическом очаге при различных температурных условиях в различных слоях кортикальной колонки. Уровень достоверности отличия группы от контроля (от уровня 100%, как на панели б) по тесту ранговых сумм для парных выборок показан под боксами. В рамках показаны коэффициенты корреляции Спирмена параметра от времени включения охлаждения и соответствующие уровни достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

слоях коры, а также более выраженные эффекты охлаждения в глубоких слоях (рис. 4, d). Аналогичный анализ сенсорно-вызванных МПД выявил еще большую степень нейропротекторных эффектов охлаждения, наиболее выраженных для охлаждения коры, которое начиналось с минимальной задержкой от аппликации ЭТ1 (0 и 10 мин) (рис. 5).

Помимо подавления физиологических паттернов спонтанной и сенсорно-вызванной активности ишемическое поражение также характеризуется двумя патофизиологическими паттернами – волнами распространяющейся деполяризации (РД, SD) и негативными ультрамедленными потенциалами (НУП, NUP) [25, 28]. Волны РД возникали после аппликации ЭТ1 как при нормотермии, так и у животных с охлаждением коры (рис. 6). Поскольку РД обычно возникает в течение нескольких первых минут после начала ишемического процесса, запускаемого ЭТ1, нами не было обнаружено различий в задержке РД от момента аппликации ЭТ1 между группами нормотермии и гипотермии – 10' и 60'; однако в группе гипотермии – 0' РД возникала со значительно большей задержкой (рис. 6, а, b). Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют о до-

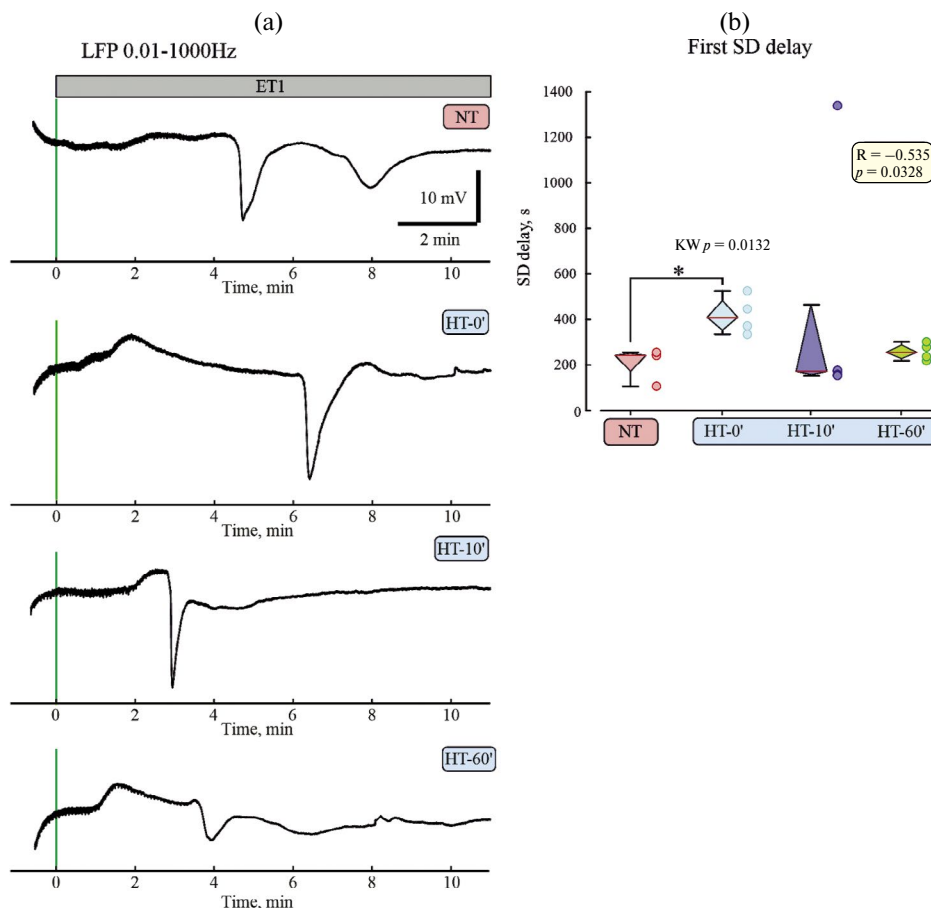


Рис. 6. Влияние локальной гипотермии на волны распространяющейся деполяризации, вызванной ЭТ1. (а) – примеры волн распространяющейся деполяризации (SD) на глубине 4-го слоя коры, возникающих в течение первых минут после аппликации ЭТ1 для разных экспериментальных групп ЛТГ; (б) – время задержки волн распространяющейся деполяризации (SD delay) от момента аппликации ЭТ1 в зависимости от времени начала ЛТГ. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

вольно быстром охлаждении коры после начала поверхностной гипотермии, а с другой стороны, вкуче с изложенными выше данными об активности в ишемических очагах, свидетельствуют об эффективности нейропротекторных эффектов гипотермии даже после возникновения волн РД. Как и волны РД, НУП также наблюдались как при нормотермии, так и в экспериментах с охлаждением коры (рис. 7, а). При этом сравнительный анализ не выявил каких-либо достоверных различий в амплитуде НУП между группами нормо- и гипотермии (рис. 7, б). Поскольку амплитуда НУП в значительной степени определяется электрохимическими процессами на электродах из благородных металлов (иридий в данном исследовании) [29, 30], то можно предполагать, что нейропротекторные эффекты гипотермии, выявленные в данном исследовании, связаны не столько с уменьшением степени ишемии, сколько с уменьшением ее повреждающего

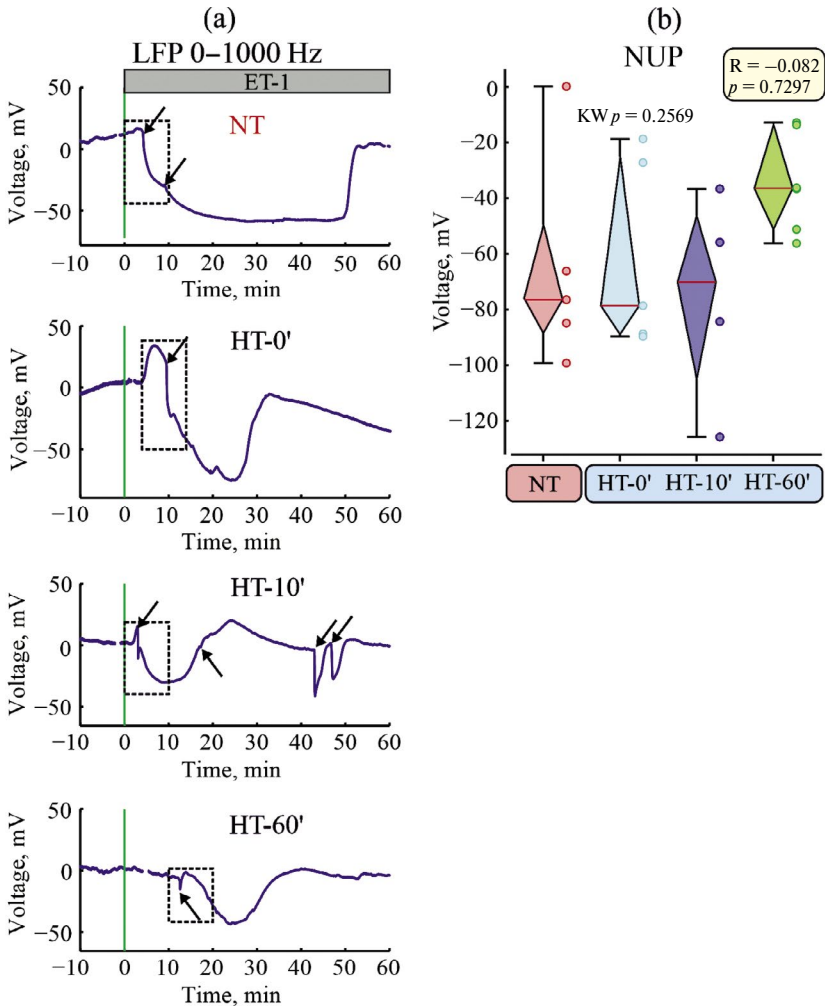


Рис. 7. Влияние локальной гипотермии на негативные ультрамедленные потенциалы, вызванные ЭТ1. (а) – примеры негативных ультрамедленных потенциалов (NUP) (0–1000 Гц), зарегистрированных на глубине 4-го слоя коры в условиях нормотермии и при различных задержках ЛТГ. Черными стрелками отмечены волны РД; (б) – усредненная по всем слоям коры амплитуда сверхмедленных негативных потенциалов при различных задержках ЛТГ. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

воздействия на кору головного мозга. Другими словами, если считать, что НУП является признаком наступившей ишемии, то данное наблюдение указывает на то, что во всех экспериментальных группах степень ишемии была сопоставимой, а гипотермия уменьшает негативные последствия нарушения кровоснабжения участка мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным выводом настоящего исследования является то, что ранняя поверхностная ЛТГ значительно уменьшает степень функциональных нарушений в коре головного мозга крыс в модели фокальной ишемии, вызываемой эпипиальной аппликацией ЭТ1. Так, нами было обнаружено, что степень подавления спонтанной активности и сенсорно-вызванных ответов (как локальных потенциалов, так и частоты МПД) в ишемических очагах, сформированных в течение 3 ч после аппликации ЭТ1, значительно снижается в условиях локальной гипотермии. Также было обнаружено, что степень нейропротекторных эффектов ЛТГ наиболее выражена, если охлаждение начинается с минимальной задержкой после аппликации ЭТ1 (0 и 10 мин), и существенно снижается при увеличении этой задержки до 1 ч. Эти результаты в значительной мере согласуются с данными, полученными в других моделях ишемии коры и с применением других гипотермических методик, в том числе с данными о минимальной эффективности ЛТГ при значительных временных задержках начала ее применения после начала ишемической атаки [10–17]. Данные параллельного гистологического анализа ишемических очагов, формирующихся в условиях нормо- и гипотермии, полностью согласуются с данными электрофизиологического анализа и изложены в параллельной работе. В совокупности полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что ЛТГ, начатая с короткой задержкой после начала ишемической атаки, является эффективным методом нейропротекции в самой ранней фазе ишемии головного мозга. Учитывая доступность ЛТГ на доклиническом этапе ведения пациента, данный метод является перспективным для продления критического окна «золотого часа» перед реперфузией ишемического участка.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Максиму Георгиевичу Шерозии за помощь в изготовлении и рекомендации по использованию системы охлаждения поверхности мозга.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Концепция: Р. Н. Х., А. В. З. Эксперименты и анализ: Г. Ф. З., К. А. Ч., А. В. З. Оригинальная версия статьи: Г. Ф. З., Р. Н. Х., А. В. З. Окончательный вариант статьи: Г. Ф. З., К. А. Ч., Р. Н. Х., А. В. З. Все авторы прочитали и согласились с окончательной версией рукописи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Этическим комитетом Казанского федерального университета (№24/22.09.2020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета программы Приоритет 2030 Казанского федерального университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shamalov NA, Stakhovskaya LV, Ivanova GE, Shekhovtsova KV, Lee SC, Skvortsova VI* (2013) Results of the federal anti-stroke program in the Russian Federation. *Cerebrovasc Dis* 35: 88–88.
2. *Lapchak PA, Zhang JH* (2017) The high cost of stroke and stroke cytoprotection research. *Translat Stroke Res* 8: 307–317.
<https://doi.org/10.1007/s12975-016-0518-y>
3. *Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, Khatri P, McMullan PW, Qureshi AI, Rosenfield K, Scott PA, Summers DR, Wang DZ, Wintermark M, Yonas H, Amer Heart Assoc Stroke C, Council Cardiovasc N, Council Peripheral Vasc D, Council Clinical C* (2013) Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association. *American Stroke Association. Stroke* 44: 870–947.
<https://doi.org/10.1161/STR.0b013e318284056a>
4. *Ginsberg MD* (2016) Expanding the concept of neuroprotection for acute ischemic stroke: The pivotal roles of reperfusion and the collateral circulation. *Progr Neurobiol* 145: 46–77.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.09.002>
5. *Al-Ajlan FS, Alkhiri A, Alamri AF, Alghamdi BA, Almaghrabi AA, Alharbi AR, Alansari N, Almilibari AZ, Hussain MS, Audebert HJ, Grotta JC, Shuaib A, Saver JL, Alhazzani A* (2024) Golden hour intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Ann Neurol* 96: 582–590.
<https://doi.org/10.1002/ana.27007>
6. *Saver JL, Smith EE, Fonarow GC, Reeves MJ, Zhao X, Olson DM, Schwamm LH, Investig GW-SSC* (2010) The "Golden hour" and acute brain ischemia presenting features and lytic therapy in > 30 000 patients arriving within 60 minutes of stroke onset. *Stroke* 41: 1431–1439.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.583815>
7. *Di Biase L, Bonura A, Caminiti ML, Pecoraro PM, Di Lazzaro V* (2022) Neurophysiology tools to lower the stroke onset to treatment time during the golden hour: microwaves, bioelectrical impedance and near infrared spectroscopy. *Ann Med* 54: 2658–2671.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2124448>
8. *Reeves MJ, Fonarow GC, Smith EE, Sheth KN, Messe SR, Schwamm LH* (2024) Twenty years of get with The Guidelines-Stroke: celebrating past successes, lessons learned, and future challenges. *Stroke* 55: 1689–1698.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.124.046527>
9. *Kurisu K, Yenari MA* (2017) Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology* 134: 302–309.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.025>
10. *Polderman KH* (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 37(7): 186–202.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>
11. *Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, Zhou K, Bennet L, Thoresen M, Gunn AJ* (2019) Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 19(2): 2.
<https://doi.org/10.1007/s11910-019-0916-0>
12. *Sekhon MS, Ainslie PN, Griesdale DE* (2017) Clinical pathophysiology of hypoxic ischemic brain injury after cardiac arrest: a “two-hit” model. *Crit Care* 21(90): 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s13054-017-1670-9>
13. *Бутров АВ, Торосян БД, Чебоксаров ДВ, Махмутова ГР* (2019) Терапевтическая гипотермия при поражениях головного мозга различного генеза. Вестн интенсивн терапии им АИ Салтанова 2: 75–81. [*Butrov AV, Torosyan BD, Chebokarov DV, Makhmutova GR* (2019) Therapeutic hypothermia in treatment of different cerebral injuries. *Ann Critical Care* 2: 75–81. (In Russ)].
<https://doi.org/10.21320/1818-474X-2019-2-75-81>
14. *Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY* (2019) Neuroprotection by therapeutic hypothermia. *Front Neurosci* 13: 586.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00586>
15. *Cattaneo G, Meckel S* (2019) Review of selective brain hypothermia in acute ischemic stroke therapy using an intracarotid, closed-loop cooling catheter. *Brain Circ* 5(4): 211–217.
https://doi.org/10.4103/bc.bc_54_19
16. *Zhao J, Mu H, Liu L, Jiang X, Wu D, Shi Y* (2018) Transient selective brain cooling confers neurovascular and functional protection from acute to chronic stages of ischemia/reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 39: 1215–1231.
<https://doi.org/10.1177/0271678X18808174>

17. *Assis FR, Narasimhan B, Ziai W, Tandri H* (2019) From systemic to selective brain cooling – Methods in review. *Brain Circ* 5: 179–186.
https://doi.org/10.4103/bc.bc_23_19
18. *Nasretidinov A, Evstifeev A, Vinokurova D, Burkhanova-Zakirova G, Chernova K, Churina Z, Khazipov R* (2021) Full-Band EEG recordings using hybrid AC/DC-divider filters. *eNeuro* 8(4): ENEURO.0246-21.2021.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0246-21.2021>
19. *Mitra PP, Pesaran B* (1999) Analysis of dynamic brain imaging data. *Biophys J* 2: 691–708.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77236-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77236-X)
20. *Захаров АВ, Захарова ЮП* (2023) Eview – программа с открытым исходным кодом для преобразования и визуализации многоканальных электрофизиологических сигналов. *Гены и клетки* 18(4): 323–330. [*Zakharov AV, Zakharova JP* (2023) Eview – an open-source program for conversion and visualisation of multichannel electrophysiological signals. *Genes and Cells* 18(4): 323–330. (In Russ)].
21. *Pettersen KH, Devor A, Ulbert I, Dale AM, Einevoll GT* (2006) Current-source density estimation based on inversion of electrostatic forward solution: effects of finite extent of neuronal activity and conductivity discontinuities. *J Neurosci Methods* 154(1–2): 116–133.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.12.005>
22. *Nasretidinov A, Lotfullina N, Vinokurova D, Lebedeva J, Burkhanova G, Chernova K, Zakharov A, Khazipov R* (2017) Direct current coupled recordings of Cortical Spreading Depression using silicone probes. *Front Cell Neurosci* 11: 408.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00408>
23. *Sheroziya M, Timofeev I* (2015) Moderate cortical cooling eliminates thalamocortical silent states during slow oscillation. *J Neurosci* 35: 13006–13019.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-15.2015>
24. *Burkhanova G, Chernova K, Khazipov R, Sheroziya M* (2020) Effects of cortical cooling on activity across layers of the rat barrel cortex. *Front Syst Neurosci* 14: 52.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.00052>
25. *Vinokurova D, Zakharov A, Chernova K, Burkhanova-Zakirova G, Horst V, Lemale CL, Dreier JP, Khazipov R* (2022) Depth-profile of impairments in endothelin-1 – induced focal cortical ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 42(10): 1944–1960.
<https://doi.org/10.1177/0271678X221107422>
26. *Juzekaeva E, Gaimutdinov A, Mukhtarov M, Khazipov R* (2020) Reappraisal of anoxic spreading depolarization as a terminal event during oxygen-glucose deprivation in brain slices in vitro. *Sci Rep* 10(1): 18970.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75975-w>
27. *Vinokurova D, Zakharov AV, Lebedeva J, Burkhanova GF, Chernova KA, Lotfullina N, Khazipov R, Valeeva G* (2018) Pharmacodynamics of the glutamate receptor antagonists in the rat barrel cortex. *Front Pharmacol* 9: 698.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00698>
28. *Dreier JP, Major S, Lemale CL, Kola V, Reiffurth C, Schoknecht K, Hecht N, Hartings JA, Woitzik J* (2019) Correlates of spreading depolarization, spreading depression, and negative ultraslow potential in epidural versus subdural electrocorticography. *Front Neurosci* 13: 1–20.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00373>
29. *Mingazov B, Vinokurova D, Zakharov A, Khazipov R* (2023) Comparative Study of Terminal Cortical Potentials Using Iridium and Ag/AgCl Electrodes. *Int J Mol Sci* 24(13): 10769.
<https://doi.org/10.3390/ijms241310769>
30. *Major S, Gajovic-Eichelmann N, Woitzik J, Dreier JP* (2021) Oxygen-Induced and pH-Induced Direct Current Artifacts on Invasive Platinum/Iridium Electrodes for Electrocorticography. *Neurocrit Care* 35(Suppl 2): 146–159.
<https://doi.org/10.1007/s12028-021-01358-2>

Neuroprotective Effects of Local Surface Hypothermia during Endothelin-1-Induced Focal Ischemia in Rat Cerebral Cortex. I. Electrophysiological Analysis

G. F. Zakirova^a, K. A. Chernova^a, R. N. Khazipov^{a,b,*}, and A. V. Zakharov^{a,c}

^a*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^b*Aix-Marseille University, INMED, IINSERM, Marseille, France*

^c*Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

**e-mail: roustem.khazipov@inserm.fr*

Local therapeutic hypothermia (LTH) is one of the most promising methods for neuroprotection in cerebral ischemia. However, the efficacy of superficial LTH at clinically relevant delays after the onset of ischemic attack remains poorly understood. In the present study, we investigated the neuroprotective effects of LTH in a model of focal ischemia induced by topical application of the vasoconstrictor Endothelin-1 in the somatosensory cortex region of the rat brain. The neuroprotective effects of LTH were assessed by the level of spontaneous and sensory-evoked electrical activity at different cortical depths using linear electrode arrays. We found that cooling the cortical surface to 28°C using a Peltier element starting from 0, 10, and 60 minutes after Endothelin-1 application caused a significant reduction in the degree of suppression of electrical activity in the ischemic focus formed in the cerebral cortex 3 hours after Endothelin-1 application. The neuroprotective effects of LTH were manifested by a higher level of spontaneous multiunit activity, higher power of the local field potential oscillations in theta, alpha and beta bands, as well in a greater amplitude and higher multiunit activity during sensory evoked responses. The neuroprotective effects of LTH were inversely correlated with the delay of LTH onset and were most pronounced with LTH initiated with minimal (0 and 10 minutes) delay after Endothelin-1 application. We also found that only LTH initiated simultaneously with Endothelin-1 application delayed the onsets of spreading depolarization waves and that LTH did not affect the amplitude of negative ultraslow potentials evoked by Endothelin-1. Taken together, the results of the electrophysiological analysis suggest neuroprotective effects of surface LTH, which are particularly pronounced when LTH is minimally delayed from the onset of the ischemic insult in the Endothelin-1-induced focal ischemia model.

Keywords: stroke, cerebral ischemia, electroencephalography, local potentials, neuroprotection, hypothermia