
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ГИПОКСИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ УМЕНЬШАЕТ
ОБРАЗОВАНИЕ ЦЕРАМИДА, УРОВЕНЬ TNF α И ЭКСПРЕССИЮ TNFR1
В МОЗГЕ КРЫС В ОСТРЫЙ ПЕРИОД ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ**

© 2025 г. П. Н. Герасимов^{1,*}, В. А. Протопопов¹, И. Г. Брындина¹

¹*Ижевская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Ижевск, Россия*

**E-mail: machaon20@yahoo.com*

Поступила в редакцию 03.06.2025 г.

После доработки 24.07.2025 г.

Принята к публикации 25.07.2025 г.

Цель работы – изучить изменения содержания церамида, основных ферментов, участвующих в его биосинтезе, а также уровень TNF α и экспрессию его рецептора TNFR1 в мозге крыс в условиях острой ишемии головного мозга (ОИГМ) и гипоксического preconditionирования (ГП); оценить взаимосвязь данных факторов с выживаемостью животных и неврологическим дефицитом. Эксперименты выполнены на 37 самцах белых нелинейных крыс массой 180–230 г. ОИГМ получена методом необратимой перевязки левой общей сонной артерии с параллельной обратимой перевязкой правой общей сонной артерии. Животные были разделены на 3 группы: 1-я группа – ложнопериоперированные, 2-я – крысы с ОИГМ, 3-я – животные с ОИГМ и ГП. На 3-й день наблюдения проводили оценку неврологического дефицита по шкале Гарсия; с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии оценивали изменения уровней TNF α и TNFR1, церамида, серинпальмитойлтрансферазы, церамидсинтазы, кислой и нейтральной сфингомиелиназы. ОИГМ приводила к усилению образования церамида в мозге с повышением уровня всех исследуемых ферментов, а также сопровождалась повышением количества TNF α и экспрессии TNFR1. ГП способствовало ослаблению данных эффектов: предотвращалось повышение уровней церамида и сфингомиелиназы, TNF α и TNFR1, неврологический дефицит становился менее выраженным, а выживаемость животных повышалась по сравнению с ОИГМ. Таким образом, ГП показало свою эффективность в качестве метода, позволяющего уменьшить степень неврологических нарушений и повысить выживаемость экспериментальных животных, частично предотвратить изменения провоспалительных факторов и уровня церамида за счет снижения основных ферментов его синтеза.

Ключевые слова: гипоксическое preconditionирование, церебральная ишемия, фосфолипиды, церамид, TNF α , TNFR1

DOI: 10.7868/S2658655X25090053

ВВЕДЕНИЕ

Острые нарушения мозгового кровообращения сохраняют лидирующие позиции среди причин инвалидности. Известно, что высокая метаболическая активность нейронов определяет их высокую чувствительность к ишемии [1]. Объем очага ишемического поражения головного мозга зависит от взаимодействия множества повреждающих

механизмов, среди которых рассматриваются эксайтотоксические эффекты возбуждающих аминокислот, высвобождение провоспалительных цитокинов, активация апоптоза, генерация активных форм кислорода, повреждение гематоэнцефалического барьера. Механизмы повреждения сочетаются со множественными нейропротективными процессами, а терапевтические воздействия лишь на отдельные патогенетические звенья не оказывают решающего влияния на исход острой церебральной ишемии [2]. Одним из возможных решений этой проблемы может быть применение подходов, способствующих адаптации нейронов к гипоксическому повреждению.

К таким методам мягкого дозированного воздействия на организм относится гипоксическое preconditionирование (ГП), когда организм подвергается экзогенной гипоксии, которая чередуется с периодами реоксигенации различной продолжительности [3].

Нейрональное воспаление – один из ведущих процессов, опосредующих повреждение нейронов при острой ишемии головного мозга (ОИГМ). Известно, что основными медиаторами нейронального воспаления являются TNF α и интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6 и др.), которые также задействованы в формировании толерантности к ишемии. Интересно, что введение анти-TNF α антител снижает эффекты ГП, а инъекции самого TNF α в цистерны головного мозга способствуют уменьшению очага инфаркта. В экспериментах показано, что малые дозы TNF α формируют внутриклеточную десенситизацию к медиаторной активности кальция [4]. Введение антагонистов рецепторов ИЛ-1 также подавляет эффекты preconditionирования. Полагают, что эти механизмы связаны с высвобождением арахидоновой кислоты, активацией NMDA-R и NOS, хотя ряд авторов связывает формирующиеся эффекты preconditionирования с противовоспалительными цитокинами [5].

Церамид является одним из активно образующихся в острый период ишемии головного мозга внутриклеточных мессенджеров. Он считается ключевой молекулой, способной регулировать процессы нейронального воспаления, пролиферации и гибели клетки. Показано, что активные формы кислорода, а также провоспалительные цитокины, в том числе TNF α , ИЛ-1 β , – основные стимулы образования церамида [6]. Известно, что церамид образуется в результате синтеза *de novo* [(ключевые ферменты – серинпальмитоилтрансфераза (SPT) и церамидсинтаза (CerS)] под действием сфингомиелиназ – кислой, нейтральной (aSMase, nSMase) и щелочной, а также в результате рециклирования сфингозина (основной фермент – CerS) [7].

В настоящее время описаны механизмы формирования ишемической толерантности, вызванной ГП. К ним относят активацию антиоксидантной защиты, уменьшение эксайтотоксических эффектов возбуждающих нейротрансмиттеров, снижение интенсивности нейронального воспаления. Имеются также данные о роли сфинголипидов и их сигнальных механизмов в формировании толерантности к острой церебральной ишемии при ГП [8].

Цель исследования: используя модель острого ишемического нарушения мозгового кровообращения у крыс, исследовать влияние ГП на образование церамида в сфингомиелиназном пути и пути *de novo*, уровень TNF α и его рецептора TNFR1, а также оценить выживаемость животных и функциональный неврологический дефицит при ОИГМ на фоне ГП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была проведена на 37 самцах белых нелинейных крыс массой 180–230 г, средний возраст которых составил 12–13 недель. Животных содержали в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к пище и воде с соблюдением всех регламентированных норм и правил обращения с лабораторными животными (СП 2.2.1.3218-14, приказ Минздрава РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ 33044-2014).

Моделирование острой церебральной ишемии

В качестве модели ОИГМ использована модель с необратимой перевязкой левой общей сонной артерии (ЛОСА) в комбинации с обратимой перевязкой правой общей сонной артерии (ПОСА). Операция проводилась под общей анестезией (золазепам/тилетамин – Золетил 100, Virbac, Франция) в дозе 30 мг/кг массы тела. Выполняли срединный разрез шеи, послойно рассекали ткани и выделяли общую сонную артерию на 3–4 мм ниже уровня ее бифуркации с 2 сторон, на этом же уровне производили необратимую перевязку ЛОСА, на ПОСА накладывали зажим типа “бульдог” на 30 мин, затем накладывали швы через все слои раны с обработкой раствором антисептика (хлоргексидин). Кожу области раны обрабатывали спиртовым раствором йода [9]. Ложнооперированным (ЛО) животным в тех же условиях проводили рассечение мягких тканей, выделение сонной артерии, поднятие ее на лигатуру без перевязки, ушивание мягких тканей, обработку антисептиком.

Животных разделили на 3 группы: первая группа (Ишемия) – крысы, которым производили перевязку сонных артерий (как описано выше; в этой группе из 85 животных выжили 17), вторая группа (ГП) – крысы, которым в течение 5 дней до моделирования ОИГМ проводили интервальные гипоксические тренировки (из 32 выжили 11), третья группа – ЛО животные ($n = 9$).

За состоянием животных наблюдали в течение 3 суток после операции. На 3-и сутки проводили оценку выживаемости крыс и анализ неврологического дефицита по шкале Гарсиа [10]. При отсутствии неврологического дефицита животному присваивался максимальный балл, равный 18, за каждый неврологический симптом балл уменьшался. Затем животных выводили из эксперимента путем декапитации под общей анестезией.

Моделирование гипоксического preconditionирования

Животное помещали в камеру объемом 3300 мл. Камера была разделена перфорированной текстолитовой мембраной на 2 части. В нижний отсек насыпали 180 г натронной извести в качестве поглотителя углекислоты и воды. Животное помещали в верхний отсек. Использована модель с четырехкратными 10-минутными интервалами гипоксии, которые чередовались с интервалами реоксигенации. Контроль поглощения углекислоты и воды натронной извести проводился по исчезновению конденсата на стенках камеры, а также путем взвешивания извести до и после моделирования гипоксии. Данная модель позволяет воспроизвести условия нормокапнической гипоксии с нормальной влажностью атмосферы. Животные подвергались гипоксическим тренировкам в течение 5 дней, а ишемию моделировали через 24 ч после последнего эпизода гипоксии [11].

Иммунофлуоресцентное исследование

Для витальной фиксации головного мозга под общей анестезией (Золетил 100, Virbac, Франция, 30 мг/кг массы тела) проводили его перфузию фосфатно-солевым буфером (PBS в мМ: 3.2 NaH_2PO_4 , 0.5 K_2HPO_4 , 1.3 KCl, 135 NaCl, pH 7.4) с помощью катетера, введенного в полость левого желудочка сердца, после чего перфузия была продолжена фиксирующим раствором 4%-ного параформальдегида, приготовленного на PBS. После перфузии и декапитации мозг был помещен на 2 ч в аналогичный фиксирующий раствор, далее препарат выдерживали в 30%-ном растворе сахарозы, после чего замораживали с использованием сухого льда.

Из препарата готовили коронарные срезы толщиной 14 мкм на криотоме HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific), срезы фиксировали на стеклах с адгезивным покрытием (Thermo Fisher Scientific). Далее срезы выдерживали в пермеабилзирующем

растворе (1%-ный раствор тритон X-100 на PBS, 5%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина) в течение 20 мин. После пермеабиллизации срезы инкубировали с раствором первичных антител: анти-TNFR1, анти-TNF α , анти-aSMase, анти-nSMase антитела (кроличьи IgG, 1 : 200, Affinity Biosciences), анти-SPT2, анти-CerS1 (кроличьи IgG, 1 : 200, Abcam), анти-Cer (мышинные IgG, 1 : 200, ALX-804-196-T050, Enzo Life Sciences) с 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в течение суток. После инкубации с первичными антителами срезы отмывали в PBS и инкубировали с раствором вторичных антител – антикроличьих Alexa Fluor 488 (goat IgG, 1 : 300, Abcam) и антимышиных Alexa Fluor 647 (goat IgG, 1 : 300, Abcam) в течение 1 ч при комнатной температуре без доступа к свету [12].

Флуоресценция оценивалась с использованием приставки DS-Fi3 EF-2E к микроскопу Nikon Eclipse E200, программного обеспечения NIS-Elements D (Nikon Instruments Inc., США) и ImageJ. По интенсивности флуоресценции на стандартной площади 0.1 мм² рассчитывали уровень экспрессии веществ.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics 23. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия W Шапиро–Уилка. При парном сравнении применяли U-критерий Манна–Уитни, а сравнение 3 групп проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса. Выживаемость животных оценивалась с помощью точного критерия Фишера. Достоверными считали различия при уровне статистической значимости $p < 0.05$. Результаты представлены графически в виде диаграмм “ящик с усами” с указанием степени достоверности данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате моделирования ОИГМ выживаемость крыс группы с ГП составила 34%, в группе животных с ишемией она была достоверно ниже и составила 20%, $p < 0.05$, рис. 1а.

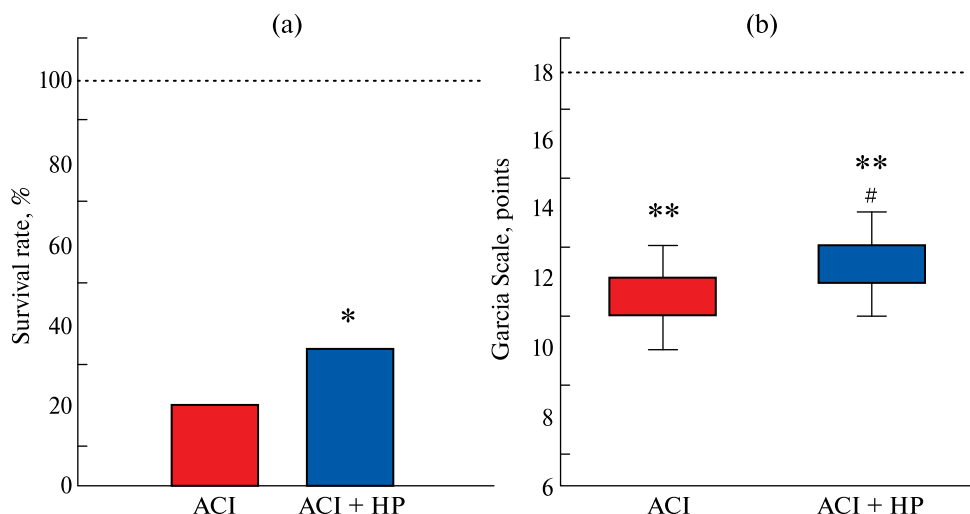


Рис. 1. Выживаемость и неврологический дефицит по шкале Гарсия при моделировании острой ишемии головного мозга (ACI) на фоне гипоксического preconditionирования (HP). Пунктирная линия отражает показатель ЛО животных. Серии опытов: ишемия (ACI), ($n = 17$); ишемия + ГП (ACI + HP), ($n = 11$), ЛО ($n = 9$). ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – по сравнению с ЛО животными, # $p < 0.05$ – по сравнению с группой животных с ишемией.

К третьему дню моделирования ОИГМ мозга неврологический дефицит оказался менее выраженным в группе животных, подвергшихся ГП (рис. 1b). В группе ЛО средний балл был равен 18.0 ± 0 , в группе животных ОИГМ он снижался до 10.9 ± 0.5 ($p < 0.05$). У крыс с ОИГМ на фоне ГП неврологический дефицит был менее выражен: средний балл равен 13.1 ± 0.4 , что статистически значимо выше по сравнению с группой животных, в которой ГП не применялось ($p < 0.05$).

Иммунофлуоресцентная микроскопия криосрезов мозга показала, что в условиях церебральной ишемии количество церамида повышается в 1.3 раза ($p < 0.01$). ГП способствовало уменьшению его концентрации, но не до значений ЛО группы животных (рис. 2).

В работе было также исследовано влияние ОИГМ и ГП на основные механизмы образования церамида в условиях острой церебральной ишемии: оценивали уровень ферментов сфингомиелиназного и синтетического (*de novo*) путей.

Сфингомиелиназный путь образования церамида реализуется при участии aSMase и nSMase. При моделировании ОИГМ наблюдали повышение уровня обоих ферментов: aSMase в 1.4 раза, nSMase в 1.7 раза ($p < 0.001$). ГП предотвращало изменения уровня сфингомиелиназ, вызванные ишемией (рис. 3).

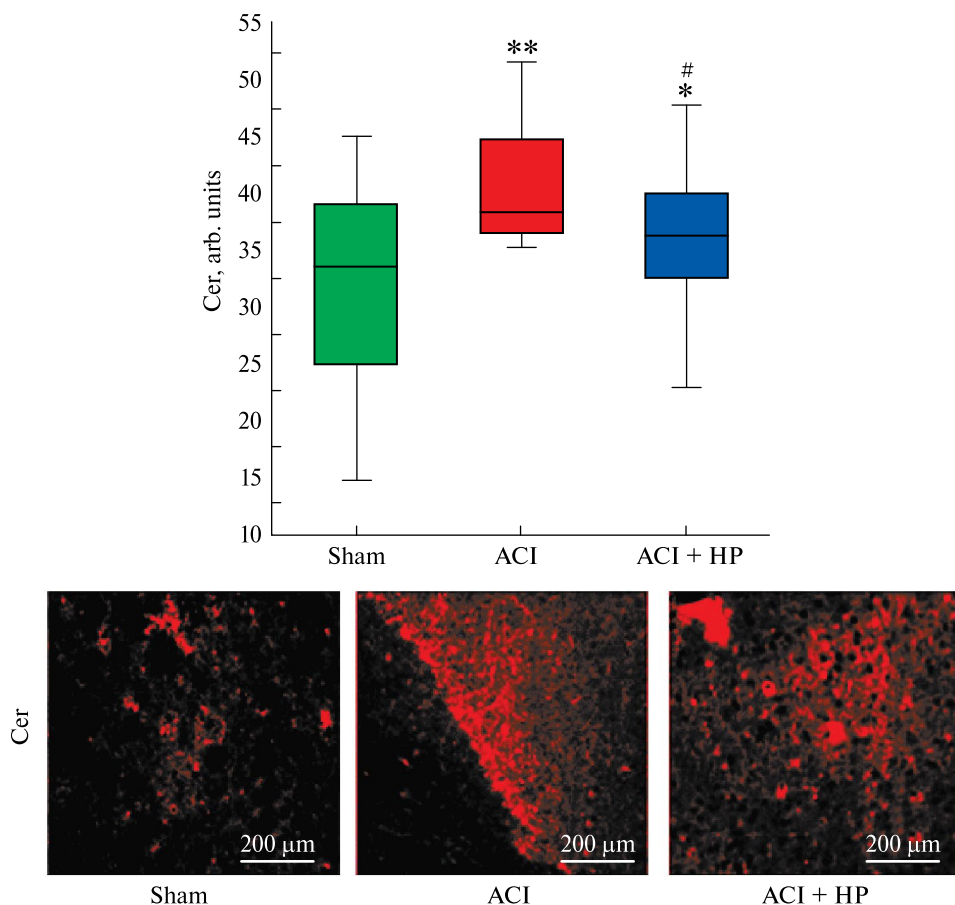


Рис. 2. Уровень церамида в мозге крыс при моделировании острой церебральной ишемии и ишемии на фоне ГП (срез переднего мозга на уровне внутренней капсулы). Серии опытов: ишемия (ACI), ($n = 17$); ишемия + ГП (ACI + HP), ($n = 11$); ложная операция (sham), ($n = 9$). * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ – по сравнению с животными sham, # – $p < 0.05$ – по сравнению с группой животных без HP.

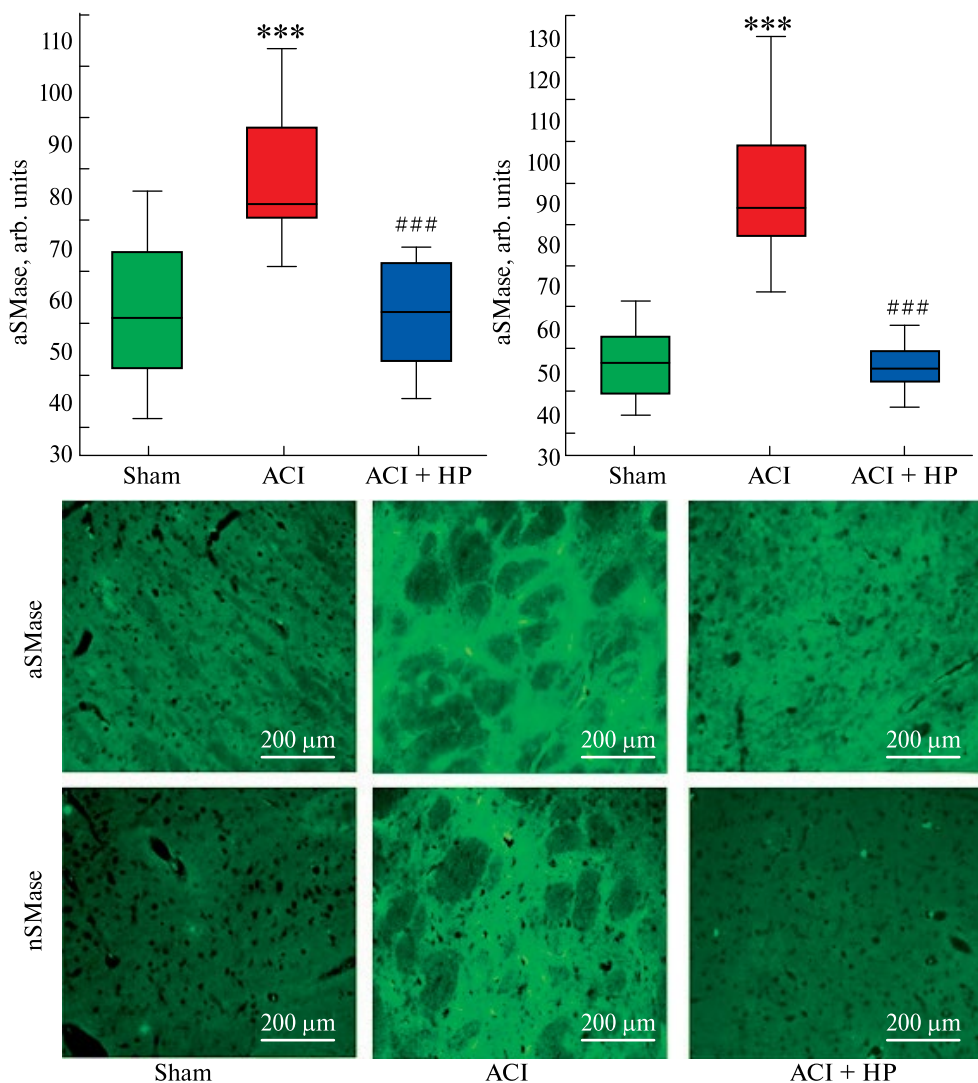


Рис. 3. aSMase и nSMase в мозге крыс при моделировании острой церебральной ишемии и ишемии на фоне гипоксического preconditionирования (срез переднего мозга на уровне внутренней капсулы). Серии опытов: ишемия (ACI), ($n = 17$); ишемия + ГП (ACI + HP), ($n = 11$); ложная операция (sham), ($n = 9$). * – $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – по сравнению с животными sham, # – $p < 0.05$ – по сравнению с группой животных без HP.

Ключевыми ферментами синтеза церамида в пути *de novo* являются SPT и CerS. В наших опытах церебральная ишемия сопровождалась увеличением количества SPT в 1.3 раза ($p < 0.001$), а CerS в 1.9 раза ($p < 0.001$). Существенного влияния ГП на изменения данных ферментов, вызванные ишемией, не наблюдалось. Полученные данные отражены на рис. 4.

Одним из механизмов вторичного повреждения мозга в острый период церебральной ишемии является нейрональное воспаление. Высвобожденные молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением (DAMP), стимулируют клетки врожденного иммунитета. Популяция клеток, которая мобилизуется в первую очередь

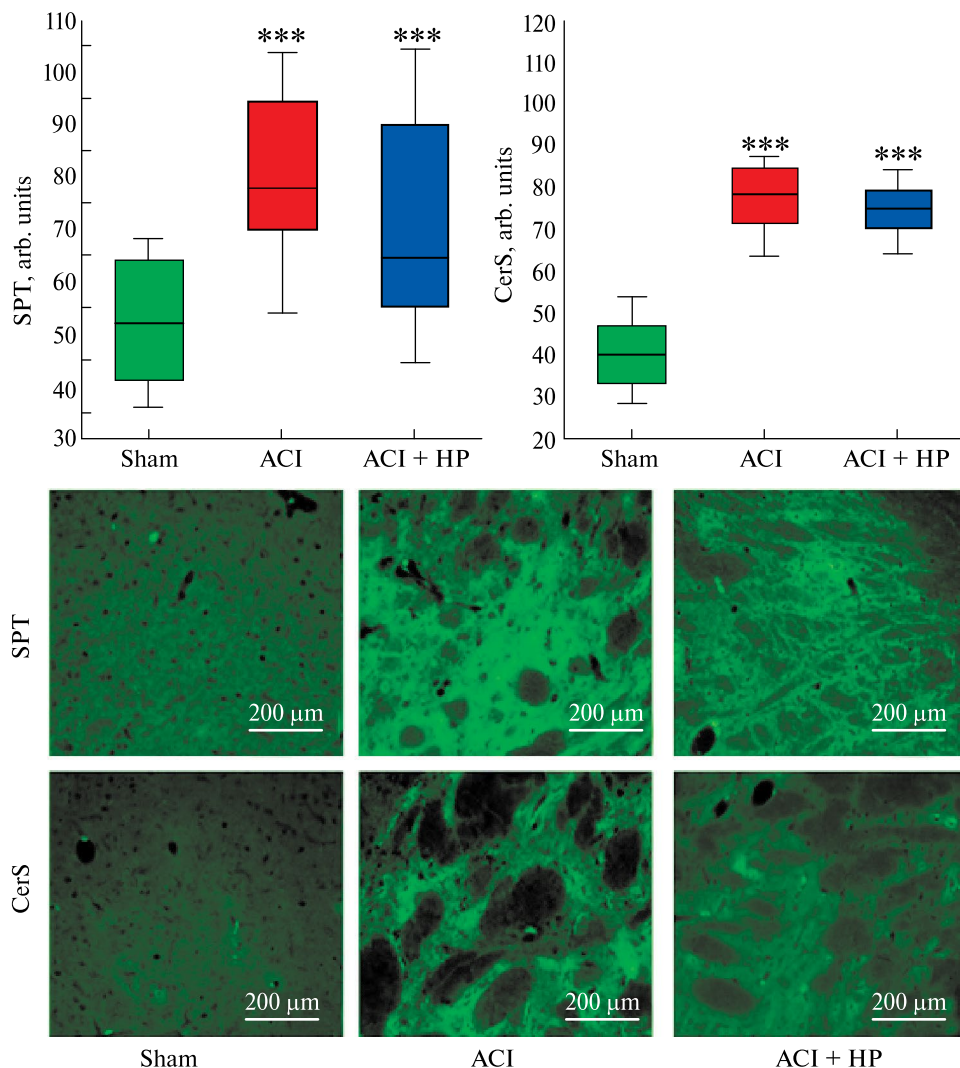


Рис. 4. SPT и CerS в мозге при моделировании острой церебральной ишемии и ишемии на фоне гипоксического preconditionирования (срез переднего мозга на уровне внутренней капсулы). Серии опытов: ишемия (ACI), ($n = 17$); ишемия + ГП (ACI + HP), ($n = 11$); ложная операция (sham), ($n = 9$). *** – $p < 0.001$ – по сравнению с животными sham.

в первые минуты острой ишемии, – это микроглия. Активированные клетки микроглии секретируют провоспалительные цитокины, в том числе TNF α , который является одним из самых значимых в инициации и поддержании нейронального воспаления. Как и другие провоспалительные цитокины, он способствует развитию вторичного повреждения нервной ткани.

Мы исследовали влияние ГП на уровень TNF α и экспрессию его рецептора TNFR1. При моделировании ОИГМ TNF α повышался в 1.6 раза ($p < 0.001$), а экспрессия его рецептора возрастала в 1.9 раза ($p < 0.001$). Важно отметить, что ГП способствовало уменьшению уровня TNF α и плотности рецепторов TNFR1, но не до значений ЛО группы животных (рис. 5).

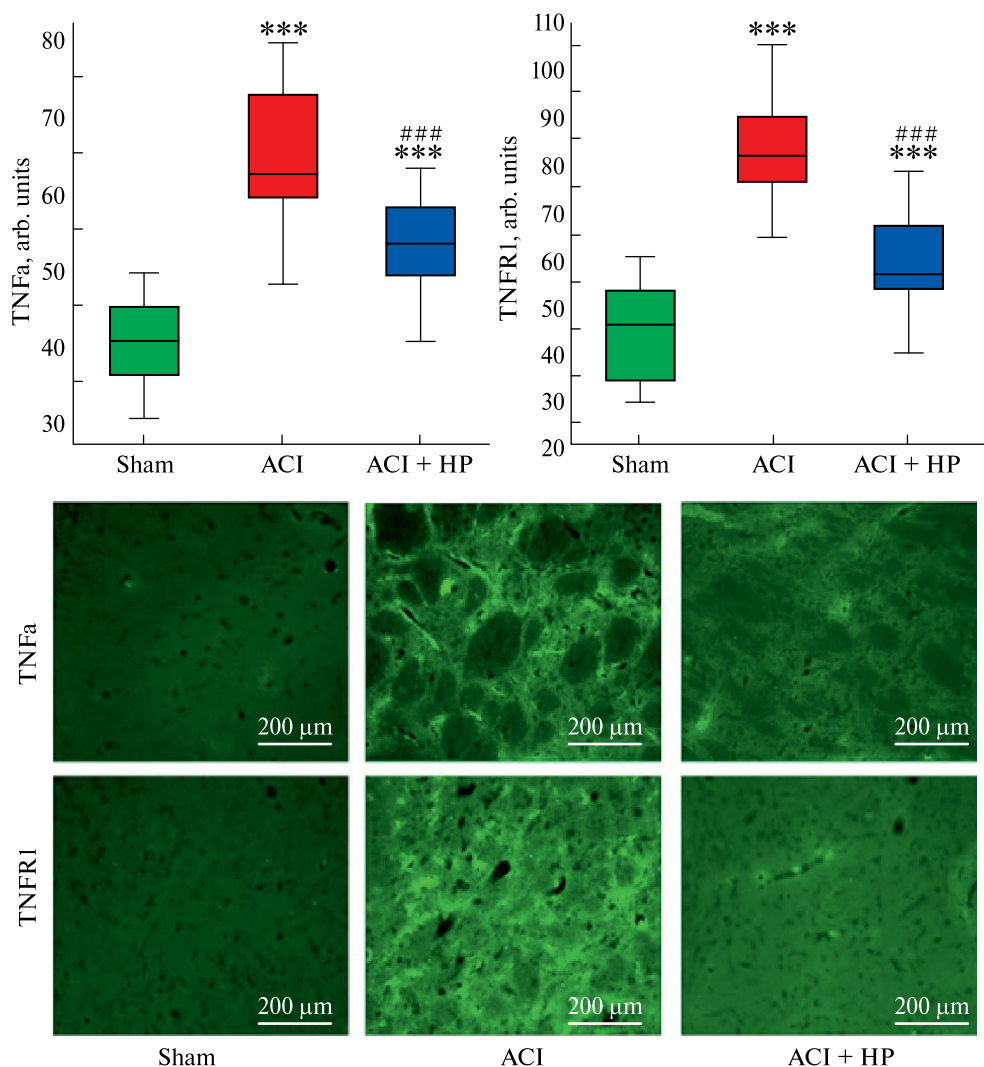


Рис. 5. Изменения уровней TNFα и его рецептора TNFR1 в мозге крыс при острой церебральной ишемии и ишемии на фоне гипоксического preconditionирования (срез переднего мозга на уровне внутренней капсулы). Серии опытов: ишемия (ACI), ($n = 17$); ишемия + ГП (ACI + HP), ($n = 11$); ложная операция (sham), ($n = 9$). *** – $p < 0.001$ – по сравнению с животными sham, ### – $p < 0.001$ – по сравнению с группой животных без ГП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что гипоксическое preconditionирование может быть немедикаментозным подходом, который способен предотвратить ряд неблагоприятных патохимических и патофизиологических изменений в мозге, вызванных ишемией. При этом неврологический дефицит у животных становится менее выраженным, а их выживаемость повышается. Учитывая ряд негативных эффектов сфингомиелиназ и церамида, таких как индукция апоптоза, поддержание нейронального воспаления и др., полное или частичное предотвращение

их изменений при использовании ГП может рассматриваться как позитивный эффект, вносящий существенный вклад в механизмы саногенеза при церебральной ишемии. Активация продукции церамида может быть связана с повышением уровня TNF α и возросшей чувствительностью клеток мозга к его действию в результате гиперэкспрессии TNFR1. Известно, что TNF α может индуцировать активацию как кислой, так и нейтральной сфингомиелиназ [13].

В то же время известно, что ГП модулирует иммунный ответ на различных уровнях, включая молекулярный, клеточный и системный, предотвращая вторичное нейрональное повреждение. ГП способствует умеренной активации микроглии фактором, индуцируемым гипоксией (HIF), что подавляет чрезмерную активацию микроглии при ОИГМ как одного из главных инициаторов воспалительного ответа, уменьшает образование провоспалительных цитокинов (преимущественно TNF α , IL-1 β , IL-6), повышает синтез противовоспалительного интерлейкина-10. Эти эффекты также могут быть опосредованы влиянием ГП на ядерные транскрипционные факторы, усиливающие продукцию цитокинов, в частности NF- κ B [13].

Известно также, что ГП способствует усилению антиоксидантной защиты клеток. Так, в ряде исследований показано повышение активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы с одновременным снижением концентрации O₂[•] и H₂O₂. При более продолжительных гипоксических тренировках повышается активность ядерных транскрипционных факторов, нарастает синтез ферментов антиоксидантной защиты [14]. Снижение образования активных форм кислорода может сочетаться с меньшим повреждением клеточных мембран, менее выраженной активацией мембранных гидролаз, в том числе сфингомиелиназ. В связи с этим следует отметить, что активация прооксидантных процессов может сопровождаться повышением активности сфингомиелиназ и наоборот [15]. ГП способствует увеличению толерантности к глутамату, снижая его повреждающее действие и уменьшая перегрузку клетки ионами кальция [16], что также может снижать активность мембранных гидролаз, способствуя сохранению мембранных структур.

Интересно, что в нашем исследовании ГП не повлияло на вызванное ОИГМ повышение экспрессии ферментов образования церамида по механизму синтеза *de novo*. По-видимому, основным механизмом образования церамида, на который оказывает влияние ГП при ОИГМ, является сфингомиелиназный путь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальной острой церебральной ишемии в мозге повышается уровень ферментов синтеза церамида, и, как следствие, активируется его образование, нарастает количество TNF α и экспрессия TNFR1. ГП уменьшает продукцию церамида за счет подавления сфингомиелиназ и может служить инструментом, снижающим повреждение нейронов при церебральной ишемии. Ослабление провоспалительных эффектов и эффектов церамида, образованного в каталитическом сфингомиелиназном пути, способствует большей сохранности ткани мозга при ишемии, что позволяет уменьшить степень неврологического дефицита и повысить выживаемость при ОИГМ.

Исходя из того, что патогенез ишемического повреждения ткани мозга сложен, а терапевтические воздействия крайне ограничены, ГП может быть перспективным методом профилактики острых сосудистых повреждений головного мозга.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (П. Н. Г., В. А. П., И. Г. Б.); сбор данных (П. Н. Г., В. А. П.), обработка данных (П. Н. Г., В. А. П., И. Г. Б.); написание манускрипта (П. Н. Г.), редактирование манускрипта (И. Г. Б.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Ижевской государственной медицинской академии Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Этическим комитетом Ижевской государственной медицинской академии (протокол 736/1 от 11.05.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bush CK, Kurimella D, Cross LJS, Conner KR, Martin-Schild S, He J, Li C, Chen J, Kelly T* (2016) Endovascular Treatment with Stent-Retriever Devices for Acute Ischemic Stroke: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One* 11: e0147287.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147287>
2. *Maida CD, Norrito RL, Rizzica S, Mazzola M, Scarantino ER, Tuttolomondo A* (2024) Molecular Pathogenesis of Ischemic and Hemorrhagic Strokes: Background and Therapeutic Approaches. *IJMS* 25: 6297.
<https://doi.org/10.3390/ijms25126297>
3. *Liu X, Sheng R, Qin Z* (2009) The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 30: 1071–1080.
<https://doi.org/10.1038/aps.2009.105>
4. *Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM* (1997) TNF- α Pretreatment Induces Protective Effects against Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 483–490.
<https://doi.org/10.1097/00004647-199705000-00001>
5. *Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ* (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66: 232–245.
<https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.12.028>
6. *Mohamud Yusuf A, Zhang X, Gulbins E, Peng Y, Hagemann N, Hermann DM* (2024) Signaling roles of sphingolipids in the ischemic brain and their potential utility as therapeutic targets. *Neurobiol Disease* 201: 106682.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106682>
7. *Ouro A, Correa-Paz C, Maqueda E, Custodia A, Aramburu-Núñez M, Romaus-Sanjurjo D, Posado-Fernández A, Candamo-Lourido M, Alonso-Alonso ML, Hervella P, Iglesias-Rey R, Castillo J, Campos F, Sobrino T* (2022) Involvement of Ceramide Metabolism in Cerebral Ischemia. *Front Mol Biosci* 9: 864618.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.864618>
8. *Goodman Y, Mattson MP* (1996) Ceramide Protects Hippocampal Neurons Against Excitotoxic and Oxidative Insults, and Amyloid β -Peptide Toxicity. *J Neurochem* 66: 869–872.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020869.x>
9. *Ma R, Xie Q, Li Y, Chen Z, Ren M, Chen H, Li H, Li J, Wang J* (2020) Animal models of cerebral ischemia: A review. *Biomed Pharmacother* 131: 110686.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110686>
10. *Ruan J, Yao Y* (2020) Behavioral tests in rodent models of stroke. *Brain Hemorrhages* 1: 171–184.
<https://doi.org/10.1016/j.hest.2020.09.001>

11. Кулинский ВИ, Минакина ЛН, Гаврилина ТВ (2002) Нейропротекторный эффект гипоксического preconditionирования: феномен и механизмы. Бюл эксп биол мед 133: 237–240. [Kulinskii VI, Minakina LN, Gavrilina TV (2002) Neuroprotective effect of hypoxic preconditioning: phenomenon and mechanisms. Bul Exp Biol Med 133: 202–204]. <https://doi.org/10.1023/A1015575628235>
12. Clausen BH, Wrenfeldt M, Høgedal SS, Frich LH, Nielsen HH, Schrøder HD, Østergaard K, Finsen B, Kristensen BW, Lambertsen KL (2020) Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke. Acta Neuropathol Commun 8: 81. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00957-y>
13. McDonough A, Weinstein JR (2018) Correction to: Neuroimmune Response in Ischemic Preconditioning. Neurotherapeutics 15: 511–524. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0580-5>
14. Fan X, Wang H, Zhang L, Tang J, Qu Y, Mu D (2021) Neuroprotection of hypoxic/ischemic preconditioning in neonatal brain with hypoxic-ischemic injury. Rev Neurosci 32: 23–34. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0024>
15. He X, Schuchman EH (2018) Ceramide and Ischemia/Reperfusion Injury. J Lipids 2018: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/3646725>
16. Otsuka S, Sakakima H, Sumizono M, Takada S, Terashi T, Yoshida Y (2016) The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats. Behav Brain Res 303: 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.049>

Hypoxic Preconditioning Reduces Ceramide Formation, TNF α Levels, and TNFR1 Expression in the Rat Brain in Acute Cerebral Ischemia

P. N. Gerasimov^{a,*}, V. A. Protopopov^a, and I. G. Bryndina^a

^aIzhevsk State Medical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia

*e-mail: machaon20@yahoo.com

To study changes in the concentration of ceramide, the main enzymes involved in its biosynthesis, as well as TNF α and TNFR1 expression in the rat brain in acute cerebral ischemia (ACI) and hypoxic preconditioning (HP); to evaluate the relationship of these factors with animal survival and neurological deficit. Experiments were performed on 37 male white nonlinear rats weighing 180–230 g. ACI was modeled by irreversible ligation of the left common carotid artery with simultaneous reversible ligation of the right common carotid artery. The animals were divided into 3 groups: Group 1 – sham operated, Group 2 – rats with ACI, Group 3 – animals with ACI and HP. On the 3rd day of monitoring, neurologic deficit was assessed using the Garcia scale; changes in TNF α and TNFR1, ceramide, serinpalmitoyltransferase, ceramide synthase, acidic and neutral sphingomyelinases were evaluated using immunofluorescence microscopy. ACI led to increased production of ceramide in the brain with elevated levels of all enzymes studied, and was also accompanied by higher levels of TNF α and expression of its receptor TNFR1. HP contributed to the reduction of these effects: the levels of ceramide and sphingomyelinases, TNF α and TNFR1 were suppressed, the neurological deficit became less severe, and the survival of animals was improved in comparison with ACI. HP has shown its effectiveness as a method to reduce the severity of neurological disorders and increase the survival of experimental animals, to prevent changes in proinflammatory factors and ceramide level by the decrease of the main enzymes of its synthesis.

Keywords: hypoxic preconditioning, cerebral ischemia, phospholipids, ceramide, TNF α , TNFR1