

DOI: 10.7868/S2658655X26060113
УДК 612

Экспериментальная статья

Потенцирование нейрореабилитационного эффекта гиперкапнической гипоксии ингибитором JNK IQ-1 после фотохимически индуцированного тромбоза головного мозга у крыс

**П.А. Чекулаев^{1,2}, Г.М. Зембатов^{1,2}, Е.Д. Намиот², М.А. Игнатюк³,
А.К. Бердников¹, А.Р. Коврижина⁴, В.П. Куликов⁵, П.П. Трегуб^{1,2,3,*}**

¹*Институт мозга, Российский центр неврологии и нейронаук,
Москва, Российская Федерация*

²*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Москва, Российская Федерация*

³*Научно-образовательный ресурсный центр «Инновационные технологии
иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования
и ультраструктурного анализа», Российский университет дружбы народов,
Москва, Российская Федерация*

⁴*Научно-образовательный центр им. Н.М. Кижнера,
Томский политехнический университет,
Томск, Российская Федерация*

⁵*Алтайский государственный медицинский университет,
Барнаул, Российская Федерация*

**E-mail: tregub_p_p@staff.sechenov.ru*

Аннотация. В данном исследовании выполнена оценка возможности потенцирования нейрореабилитационного эффекта гиперкапнической гипоксии (ГГ) при комбинировании с ингибитором с-Jun-N-терминальных киназ (JNK), IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим) после фотохимически индуцированного тромбоза головного мозга у крыс. 40 крыс-самцов линии Wistar были поделены на 4 равные группы ($n = 10$), которые подвергались курсу респираторных воздействий по 30 мин в день, 15 сеансов: ГГ ($P_{O_2} \approx 90$ мм рт. ст. и $P_{CO_2} \approx 50$ мм рт. ст.); ГГ с дополнительными внутривенными инъекциями блокатора JNK IQ-1 в дозе 25 мг/кг (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим); контрольную группу и ложнооперированную группу сравнения. После завершения курса реабилитации у групп животных, получавших воздействия ГГ, отмечено двукратное уменьшение объема инфаркта по сравнению с контролем, улучшение двигательных функций. При этом добавление IQ-1 усиливало эффективность ГГ только в отношении восстановления двигательных функций, оцениваемых на ротароде, и снижения концентрации нейрон-специфической енолазы (NSE) в сыворотке крови. Полученные данные

свидетельствуют, что ГГ оказывает выраженный нейрореабилитационный эффект после фокального ишемического повреждения ($p < 0,05$). В свою очередь, комбинирование респираторных тренировок с блокатором JNK показало только частичный потенциал для усиления нейрореабилитационного эффекта ГГ, что может быть связано с отсроченным введением препарата.

Ключевые слова: гиперкапническая гипоксия, ишемический инсульт, нейрореабилитация, IQ-1, JNK, NSE

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-25-00101, <https://rscf.ru/project/25-25-00101/>.

Соблюдение этических стандартов. Все экспериментальные процедуры были одобрены Локальным этическим комитетом Российского центра неврологии и нейронауки от 22 февраля 2021 г. по протоколу № 81/2021 и проводились в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

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

Вклад авторов в публикацию. ТПП, КВП – идея работы и планирование эксперимента; ТПП, ЧПА, ЗГМ, ИМА – сбор данных; БАК, НЕД – обработка данных; ТПП, КАР, ЧПА, КВП – написание и редактирование манускрипта.

Благодарности. Мы выражаем благодарность Я.В. Лагойской, Е.В. Швецовой, С.А. Елисееву, М.Д. Егорову, А-А.Г. Ли и М.Г. Косенко за помощь в проведении поведенческого тестирования животных. Все упомянутые лица дали согласие на указание их имен в благодарностях.

Ссылка для цитирования: Чекулаев П.А., Зембатов Г.М., Намиот Е.Д., Игнатюк М.А., Бердников А.К., Коврижина А.Р., Куликов В.П., Трегуб П.П. Потенцирование нейрореабилитационного эффекта гиперкапнической гипоксии ингибитором JNK IQ-1 после фотохимически индуцированного тромбоза головного мозга у крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology*. 2026. Т. 112. № 6. С. 1600–1622. <https://doi.org/10.7868/S2658655X26060113>

JNK Inhibition Potentiates Neurorehabilitative Outcomes Induced by Hypercapnic Hypoxia

P.A. Chekulaev^{1,2}, G.M. Zembatov^{1,2}, E.D. Namiot², M.A. Ignatyuk³,
A.K. Berdnikov², A.R. Kovrizhina⁴, V.P. Kulikov⁵, P.P. Tregub^{1,2,3,*}

¹*Brain Science Institute, Research Center of Neurology and and Neurosciences,
Moscow, Russian Federation*

²*Department of Pathophysiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,
Moscow, Russian Federation*

³*Scientific and Educational Resource Center “Innovative Technologies of Immunophenotyping,
Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis”, RUDN University,
Moscow, Russian Federation*

⁴*Kizhner Research Center, Tomsk Polytechnic University,
Tomsk, Russian Federation*

⁵*Department of Ultrasound and Functional Diagnostics, Altay State Medical University,
Barnaul, Russian Federation*

*E-mail: tregub_p_p@staff.sechenov.ru

Abstract. In this study, we evaluated the possibility of potentiating the neurorehabilitation effect of hypercapnic hypoxia (HyperH) by the JNK (c-Jun-N-terminal kinase) inhibitor IQ-1 (11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one oxime) after photochemically induced cerebral thrombosis in rats. Forty male Wistar rats were divided into 4 equal groups (n = 10), which underwent a course of respiratory HyperH exposures for 30 min a day, 15 sessions: (1) HyperH group (PO₂ ≈ 90 mm Hg, PCO₂ ≈ 50 mm Hg); (2) HyperH + IQ-1 group; (3) Con (control) group; (4) Soc (sham-operated control) comparison group. After completion of the rehabilitation course, HyperH-exposed animals showed a two-fold reduction in infarct volume compared to the Con group, and an improvement in motor-coordination functions. Combining HyperH with IQ-1 administration enhanced HyperH efficacy only in terms of restoring motor functions (assessed in the rotarod test) and reducing the serum concentration of neuron-specific enolase (NSE). The obtained data indicate that isolated HyperH exposure exerts a pronounced neurorehabilitation effect after focal ischemic injury (p < 0.05). However, combining respiratory training with the JNK blocker IQ-1 shows only a partial potential for enhancing the neurorehabilitation effect of HyperH, which may be due to the delayed blocker administration.

Keywords: hypercapnic hypoxia, ischemic stroke, neurorehabilitation, IQ-1

Funding. This study was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 25-25-00101, <https://rscf.ru/project/25-25-00101/>.

Ethics declarations. All experimental procedures were approved by the Local Ethics Committee of the Russian Center for Neurology and Neuroscience on February 22, 2021 (Protocol No. 81/2021) and were conducted in accordance with the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes.

Conflict of interests. The authors declare no explicit or potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Authors contribution. TPP, KVP – study conception and experimental design; TPP, CPA, ZGM, IMA – data collection; BAK, NED – data processing; TPP, KAR, CPA, KVP – writing and editing of the manuscript.

Acknowledgements. We express our gratitude to Ya.V. Lagoyskaya, E.V. Shvetsova, S.A. Eliseev, M.D. Egorov, A.-A.G. Li, and M.G. Kosenko for their assistance in conducting the behavioral testing of the animals. All named individuals have given their consent to be acknowledged.

For Citation: Chekulaev P.A., Zembatov G.M., Namiot E.D., Ignatyuk M.A., Berdnikov A.K., Kovrizhina A.R., Kulikov V.P., Tregub P.P. JNK inhibition potentiates neurorehabilitative outcomes induced by hypercapnic hypoxia. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026; 112(6):1600–1622. (In Russ.)
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26060113>

ВВЕДЕНИЕ

Поиск эффективных стратегий нейрореабилитации после ишемического инсульта остается одной из наиболее актуальных проблем как в клинической, так и в экспериментальной нейронауке. Гипоксические дыхательные тренировки представляют собой перспективный терапевтический подход при неврологических расстройствах, включая ишемический инсульт [1]. Ряд исследований свидетельствует о терапевтическом потенциале интермиттирующей гипоксической экспозиции на различных экспериментальных моделях повреждения центральной нервной системы, таких как перинатальное повреждение головного мозга и церебральная ишемия [2–4]. В последнее время растет объем исследований, изучающих терапевтическую эффективность перmissive гиперкапнии [5, 6]. Эти исследования указывают на то, что контролируемая ингаляция диоксида углерода в безопасных концентрациях может оказывать нейропротекторное действие в случаях гипоксического повреждения головного мозга.

Одним из перспективных подходов является воздействие гиперкапнической гипоксии (ГГ) – сочетания нормобарической гипоксии и permissive гиперкапнии [7]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии оказывает более выраженный нейропротекторный эффект по сравнению с их отдельным применением [8, 9]. ГГ показала высокую эффективность как средство стимуляции репаративных и адаптационных процессов на этапе нейрореабилитации после ишемического инсульта [10]. Так, было показано, что регулярные сеансы ГГ в восстановительном периоде после инсульта способствуют ускорению регенеративных процессов, улучшают моторные

функции и снижают признаки неврологического дефицита как в экспериментальных условиях *in vivo* у крыс [7], так и в клинических условиях у пациентов спустя 24–72 ч после ишемического инсульта [10]. Однако для достижения устойчивого нейропротекторного эффекта необходимо проводить не менее 3–7 сеансов гиперкапнически-гипоксических респираторных воздействий [4], что ограничивает варианты их клинического применения. Поэтому актуальной задачей является поиск и разработка способов потенцирования эффектов ГГ.

Перспективным вариантом для потенцирования защитной эффективности респираторных тренировок представляется комбинация гиперкапнически-гипоксических воздействий с фармакологическими активаторами базовых нейропротекторных механизмов. Фармакологическое модулирование этих сигнальных путей в комбинации с респираторными воздействиями может вызывать суммирование их протекторных эффектов. К таким соединениям относится ингибитор с-Jun-N-терминальных киназ (JNK), IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим), известный своими противовоспалительными и мембранопротекторными свойствами [11].

Настоящее экспериментальное исследование было проведено с целью оценки возможности потенцирования нейрореабилитационного эффекта ГГ при помощи комбинации с ингибитором с-Jun-N-терминальных киназы IQ-1, увеличивающего толерантность головного мозга к ишемии/гипоксии на модели фокальной ишемии головного мозга у крыс по выраженности двигательных-координационных нарушений, объема ишемического повреждения головного мозга и содержанию в крови маркеров повреждения нервных клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследование проводилось с использованием 40 самцов крыс линии Вистар со средней массой тела 250–300 г. Животные были рандомизированы с помощью программного обеспечения Statistics for Windows 10.0 (StatSoft, Inc., Тулса, Оклахома, США). Крысы содержались в стандартных клетках при контролируемой комнатной температуре (~23 °C), в условиях естественного освещения, со свободным доступом к пище и воде. Масса тела животных регистрировалась до и после проведения экспериментальных процедур.

Группы и дизайн эксперимента

Исследование включало серию экспериментов на четырех группах животных, которые различались по уровню парциального давления кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2). Группы подвергались воздействию специфических газовых смесей с различным парциальным давлением кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2). ГГ ($pO_2 \approx 90$ мм рт. ст., $pCO_2 \approx 50$ мм рт. ст.; баланс – N_2). ГГ + IQ1 (гиперкапническая гипоксия + IQ-1): $pO_2 \approx 90$ мм рт. ст., $pCO_2 \approx 50$ мм рт. ст.; баланс – N_2 , животные в этой группе получали ингибитор JNK IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим) за 10 мин до каждой дыхательной сессии. Контроль: $pO_2 \approx 150$ мм рт. ст., $pCO_2 \approx 1$ мм рт. ст.; баланс – N_2 , животные подвергались всем экспериментальным процедурам, кроме воздействия газа, и дышали атмосферным воздухом в проточной камере. КЛЮ (ложнооперированный контроль): $pO_2 \approx 150$ мм рт. ст., $pCO_2 \approx 1$ мм рт. ст.; баланс – N_2 . Эти животные подвергались

всем процедурам, но вместо введения бенгальского розового получали инъекцию физиологического раствора, таким образом, фотохимически индуцированный тромбоз (ФИТ) у них не проводился, и, следовательно, ишемия в этой группе не индуцировалась. Животные дышали атмосферным воздухом. Группа КЛЮ служила дополнительным контролем нормальной нервной ткани крыс при гистологической оценке и поведенческом тестировании.

Мы выбрали $pO_2 \approx 90$ мм рт. ст. для моделирования умеренной нормобарической гипоксии ($\sim 12\%$ эквивалент O_2), что достаточно для активации метаболических путей, чувствительных к недостатку кислорода, избегая при этом выраженной гипоксемии и поведенческого стресса во время 30-минутных сеансов. $pCO_2 \approx 50$ мм рт. ст. — концентрация, характерная для использования в режиме перmissive гиперкапнии. Комбинированный режим ГГ ($pO_2 \approx 90$ мм рт. ст.; $pCO_2 \approx 50$ мм рт. ст.) основан на наших предыдущих работах, показавших преобладающую нейропротекторную эффективность по сравнению с изолированной гипоксией или гиперкапнией [7–9]. Контрольная газовая смесь ($pO_2 \approx 150$ мм рт. ст.; $pCO_2 \approx 1$ мм рт. ст.) приблизительно соответствует по составу комнатному воздуху и является физиологичной.

Все животные ($n = 40$) были подвергнуты фокальной церебральной ишемии, выполненной по модели ФИТ [12]. Осуществлялось посткондиционирование гипоксически-гиперкапнической смесью без прекондиционирования.

Спустя 72 ч после ишемического повреждения было проведено поведенческое тестирование, включавшее тест с вращающимся стержнем (ротарод), тест с сужающейся дорожкой и оценку по шкале NSS.

В течение последующих 15 дней каждая группа ежедневно подвергалась 30-минутным воздействиям соответствующей газовой смеси. Воздействия проводились в герметичной камере специальной конструкции, обеспечивающей стабильное и равномерное перемешивание молекул дыхательных газов.

По завершении курса дыхательных тренировок животные были повторно протестированы с использованием тех же поведенческих тестов, что и после инсульта. Через 24 ч после последнего поведенческого тестирования животные были наркотизированы, и у них была собрана венозная кровь из нижней полой вены для ИФА-оценки маркера цитолиза нервной ткани: белка астроцитарной глии S-100 и нейрон-специфической енолазы (NSE). После этого проводилась перфузионная фиксация посредством интракраниального введения раствора параформальдегида, декапитация и извлечение головного мозга. Впоследствии были подготовлены гистологические срезы головного мозга для определения объема инсульта.

Применение блокатора JNK

Ингибитор JNK IQ-1 (1*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим) [11] вводился внутривентрикулярно в дозе 25 мг/кг. Препарат предварительно растворялся в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 20 мкл Tween 80 на 1 мл раствора. Инъекции выполнялись на поздних этапах нейрореабилитации в период с 12-й по 17-й день после индукции фокальной церебральной ишемии за 10 мин до каждой дыхательной сессии (всего 6 раз). Животным в контрольных группах вместо активного соединения вводили эквивалентный объем PBS/Tween 80 (растворителя).

Оценка неврологического дефицита по шкале NSS

Перед тестированием по шкале NSS (Neurological Severity Score) [13] животных проверяли на наличие признаков выраженного стресса или аномальной двигательной активности, не связанных с неврологическим дефицитом, как это рекомендовано в подобных протоколах; однако в данном исследовании животных с такими признаками выявлено не было, и ни одно животное не было исключено.

Все тесты проводились в стандартных лабораторных условиях (температура 22–24 °С, умеренная освещенность). Животных акклиматизировали в помещении для тестирования в течение 30 мин до начала оценки. Неврологический дефицит оценивали с помощью 10-балльной системы, где 0 баллов соответствовали нормальной функции, а 10 баллов представляли наиболее тяжелый неврологический дефицит.

Тест NSS включал следующие параметры: двигательную активность, координацию (тест на наклонной плоскости), рефлекс (вздрагивание, рефлекс отдергивания), симметричность движений и ориентировочно-исследовательское поведение.

Оценка каждого животного проводилась в течение 5 мин. Общий балл по шкале NSS представлял собой сумму баллов по всем тестовым заданиям. Подсчет баллов проводили два независимых исследователя, а окончательным результатом служило среднее арифметическое (М) их оценок. Тестирование повторяли на 1, 3 и 7-й день после экспериментального вмешательства для мониторинга динамики функционального восстановления.

Тест с сужающейся дорожкой

Сенсомоторная функция оценивалась с помощью теста ходьбы по сужающейся дорожке (OpenScience, Красногорск, Россия) [14]. Все испытания проводились в стандартных лабораторных условиях (температура 22–24 °С, умеренное освещение). Животных акклиматизировали в среде, где проводилось тестирование, в течение 30 мин до начала эксперимента.

Регистрировались следующие параметры: количество постановок лап на нижнюю доску (классифицировались как ошибки), количество соскальзываний (частичное или полное смещение лапы с верхней доски на нижнюю), общее количество шагов, сделанных животным от стартовой точки до входа в темный отсек. Результаты регистрировались отдельно для передних и задних конечностей. Поведенческие сессии записывались на видео и анализировались покадрово с использованием программного обеспечения RealTime, версия 7.6 (Minitab LLC, Стейт-Колледж, Пенсильвания, США).

Для каждого животного данные усреднялись по среднему значению (М) по двум последовательным пробам. Степень сенсомоторного дефицита рассчитывалась по формуле: дефицит (%) = [(ошибки + 0,5 × соскальзывания) / общее количество шагов] × 100. Тестирование проводилось в трех временных точках для оценки динамики функционального восстановления. Животные проверялись на наличие признаков выраженного стресса или аномальной двигательной активности, не связанных с неврологическим дефицитом. Ни одно животное не показало таких признаков, поэтому ни одно не было исключено. Все оценки проводились двумя независимыми исследователями, и для минимизации субъективности использовались средние значения.

Ротарод

Двигательная активность и выносливость оценивались с помощью теста ротарод [15]. Все испытания проводились в стандартных лабораторных условиях (температура 22–24 °С). Животные акклиматизировались в течение 30 мин до тестирования и проходили адаптацию на неподвижном или медленно вращающемся стержне (Rotarod for Mice and Rats, Модель I-755, Campden Instruments, Лафборо, Великобритания).

Скорость вращения стержня линейно увеличивалась с 4 до 40 оборотов/мин в течение 300 с (5 мин), при максимальной продолжительности теста 300 с.

Каждая крыса тестировалась в трех независимых пробах с интервалами для отдыха 15–20 мин для предотвращения утомления. Животное помещали на вращающийся стержень и регистрировали время до падения (в секундах), при этом максимально возможный результат составлял 300 с. Если животное падало в первые 10 с, пробу повторяли (не более 3 повторений на одну попытку).

Для каждого животного рассчитывали среднее время до падения по трем успешным пробам. Дополнительно регистрировали латентное время до первого падения и количество потребовавшихся повторных проб. Перед тестом животных контролировали на наличие признаков выраженного стресса или аномальной двигательной активности, не связанных с неврологическим дефицитом, как это рекомендовано в подобных протоколах; однако в данном исследовании таких животных выявлено не было, и ни одно не было исключено. Для обеспечения объективности все оценки проводились двумя независимыми исследователями, и результаты усреднялись.

Протокол респираторных воздействий

Для проведения респираторных воздействий использовалась проточная камера, описанная ранее [8]. Экспериментальные группы крыс подвергались воздействию гиперкапнической гипоксии ($pO_2 \approx 90$ мм рт. ст.; $pCO_2 \approx 50$ мм рт. ст.). Животные контрольной группы и группы КЛЮ помещались в ту же камеру в идентичных условиях, но вместо газовой смеси в камеру подавался атмосферный воздух с помощью компрессора. Состав дыхательной газовой среды внутри камеры постоянно контролировался с помощью газоанализатора Microlux O2+CO2 (ООО «Микролюкс», Челябинск, Россия). Животные находились в камере объемом 60 л³ со скоростью газового потока 15 л/мин.

Хирургические манипуляции и фотохимически индуцированный тромбоз

Перед индукцией фокальной церебральной ишемии все животные были выдержаны на голодной диете в течение ночи, с сохранением неограниченного доступа к воде. Анестезия вызывалась внутрибрюшинной инъекцией раствора, содержащего гидрохлорид тилетамина и гидрохлорид золазепама (25 мг/кг). В левой паховой области производился разрез, и в левую бедренную вену вводился 4%-ный раствор бенгальского розового (Sigma Aldrich, Штайнхайм, Германия) в 0,9%-ном NaCl в дозе 40 мг/кг.

Фокальная ишемия коры головного мозга индуцировалась методом ФИТ, описанным Barth и Mody [12]. Зеленый лазер (532 нм, 20 мВт) воздействовал на скальпированный череп в течение 10 мин в области диаметром 2 мм, расположенной на середине расстояния между точками брегма и лямбда и в 2 мм латеральнее сагитального шва, что вызывало фотоактивацию красителя и приводило к локальному

тромбозу и окклюзии артерии в облучаемой зоне. Животные в группе КЛО получали физиологический раствор вместо красителя при идентичном лазерном облучении для контроля хирургических/лазерных эффектов.

Гистология и оценка объема ишемического повреждения

Перед декапитацией животным проводили перфузионную фиксацию интракардиальным введением 500 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) с последующей перфузией 250 мл 4%-ного раствора параформальдегида на PBS. Извлеченный головной мозг помещали в 10%-ный нейтральный забуференный формалин на 24 ч для сохранения морфологии ткани. После фиксации мозг извлекали из раствора и выделяли ишемизированный участок с помощью микрохирургических инструментов.

Выделенный фрагмент помещали в гистологическую кассету и обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, а затем заливали в парафин. Парафиновые блоки секционировали на срезы толщиной 10 мкм с интервалом 190 мкм через область инфаркта. Срезы окрашивались толуидиновым синим по методу Ниссля и заключались в нейтральную синтетическую смолу для последующего цифрового сканирования на микроскопе Leica Aperio CS2 (Leica Biosystems, Дир-Парк, Иллинойс, США).

Срезы сканировали, а площадь инфаркта на каждом срезе измерял исследователь, не располагающий информацией о принадлежности образца к определенной группе. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения eSlide Manager (Leica Biosystems, Дир-Парк, Иллинойс, США). Объем инфаркта рассчитывали по формуле: $V = x \times t \times \Sigma S$, где x – интервал между срезами, t – толщина среза, а ΣS – сумма площадей инфаркта на всех срезах [16].

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя (Cloud-Clone, Китай). Все реагенты перед использованием доводили до комнатной температуры (18–25 °С). Стандарты ресуспендировали в 0,5 мл стандартного разбавителя до конечных рабочих концентраций 10 нг/мл (S100) и 40 нг/мл (NSE) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре при легком перемешивании. Калибровочную кривую из 7 точек готовили последовательным двукратным разведением в стандартном разбавителе, начиная с 250 мкл ресуспендированного стандарта. В последней пробирке находился только разбавитель (0 нг/мл). Реагенты А и В центрифугировали и разводили 1 : 100 с использованием разбавителей А и В для анализа соответственно. Буфер для промывки готовили путем разведения 20 мл концентрата в 580 мл деионизированной воды (конечный объем: 600 мл).

В каждую лунку микропланшета вносили по 100 мкл либо разведенных сывороточных образцов, либо стандартов и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Без промывки в каждую лунку добавляли по 100 мкл реагента А и инкубировали в течение дополнительного часа при 37 °С. Затем лунки трижды промывали 350 мкл буфера для промывки (1–2 мин на промывку), после чего добавляли 100 мкл реагента В и инкубировали 30 мин при 37 °С. Лунки промывали пять раз, затем инкубировали с 90 мкл субстрата ТМВ в течение 10–20 мин при 37 °С в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-раствора, что вызывало изменение цвета

на желтый. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с использованием ридера для микропланшетов (INNO-S, ЛТек, Соннам-си, Южная Корея).

Оптическую плотность стандартов усредняли, вычитая фоновое значение (нулевой стандарт). Кривую строили в координатах «концентрация (нг/мл) – оптическая плотность» с использованием линейной регрессии. Дубликаты и трипликаты отсутствовали.

Статистический анализ

Объем выборки для всей когорты и для каждой экспериментальной группы рассчитывали на основе предыдущих исследований с использованием метода количественной шкалы [17]. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistics for Windows 10.0 (StatSoft, Талса, Оклахома, США). Для оценки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро–Уилка. В связи с отсутствием нормального распределения для нескольких переменных, межгрупповые сравнения проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Для коррекции множественных сравнений использовался метод Даннетта. Количественные данные представлены в виде медианы (Me), нижнего (25%) и верхнего квартилей (75%). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты теста ходьбы по сужающейся дорожке (табл. 1) продемонстрировали общее улучшение моторной координации после курса дыхательных тренировок в группах воздействия. В частности, снижение индекса соскальзывания было отмечено как для передних, так и для задних лап в группе ГГ и группе ГГ + IQ1, по сравнению с результатом после инсульта ($p < 0,05$). Несмотря на эти тенденции, указывающие на положительный эффект в отношении сенсомоторной функции, наблюдаемые изменения были статистически незначимыми по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1. Результаты тестирования на сужающейся дорожке

Table 1. Narrow beam walking test results

	Индекс соскальзывания			
	Передние лапы		Задние лапы	
	После инсульта	После лечения	После инсульта	После лечения
Контроль	18,4 [3,8–30,7]	17,5 [10,1–27,9]	23,2 [13,9–28,8]	25,0 [13,7–29,2]
ГГ	15,5 [13,0–30,0]	12,5 [6,0–17,7]	23,6 [18,8–38,2]	16,9 [12,8–29,0]
ГГ + IQ1	15,1 [9,6–33,3]	10,9 [4,2–20,0]	30,3 [19,6–39,1]	25,0 [17,9–36,2]
КЛО	19,0 [13,8–26,6]	17,6 [16,2–36,8]	24,9 [18,3–38,7]	23,2 [17,3–30,8]

ГГ – гиперкапническая гипоксия; ГГ + IQ1 – гиперкапническая гипоксия с применением IQ-1; Контроль – контрольная группа; КЛО – контрольная группа, ложнооперированные животные. Полужирный шрифт используется для выделения статистически значимых результатов ($p < 0,05$). Данные представлены в виде Me [25–75%].

HyperH – hypercapnic hypoxia; HyperH + IQ1 – hypercapnic hypoxia with IQ-1; Con – control group; CSO – control, sham-operated. Bold font is used to highlight statistically significant results ($p < 0.05$).

При тестировании на ротароде (табл. 2) ни одна из групп не показала статистически значимого улучшения результатов к концу эксперимента. Однако группа ГГ + IQ1 и КЛО показали лучшие результаты по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 2. Результаты тестирования на ротароде

Table 2. Rotarod test results

	После инсульта, с	После лечения, с
Контроль	128,7 [121,9–150,4]	117,9 [80,1–137,7]
ГГ	138,6 [123,1–171,8]	142,3 [114,2–148,0]
ГГ + IQ1	120,1 [107,2–205,1]	147,7 [89,0–180,2]
КЛО	137,0 [104,4–143,9]	138,6 [107,3–161,8]

ГГ – гиперкапническая гипоксия; ГГ + IQ1 – гиперкапническая гипоксия с применением IQ-1; Контроль – контрольная группа; КЛО – контрольная группа, ложнопериоперированные животные. Полуужирный шрифт используется для выделения статистически значимых результатов ($p < 0,05$). Данные представлены в виде Ме [25–75%].

HyperH – hypercapnic hypoxia; HyperH + IQ1 – hypercapnic hypoxia with IQ-1; Con – control group; CSO – control, sham-operated. Bold font is used to highlight statistically significant results ($p < 0.05$).

Оценка неврологического дефицита по шкале NSS не показала статистически значимых различий как до и после реабилитации, так и между экспериментальными и контрольными группами. Баллы по шкале NSS варьировались в диапазоне от 2 до 4 во всех группах.

Объем инфаркта, выраженный в процентах от общего объема мозга у животных из групп, подвергавшихся тренировочному воздействию гиперкапнической гипоксии (ГГ и ГГ+IQ1), оказался почти вдвое меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 1а).

Измерения сывороточной концентрации биомаркеров повреждения нервной ткани выявили более низкие уровни белка S100 в группах ГГ (1,30 нг/мл) и ГГ + IQ1 (1,14 нг/мл) по сравнению с контрольной группой (1,41 нг/мл) (рис. 2а). Динамика уровняNSE показала достоверное снижение только в группе ГГ + IQ1 (2,71 нг/мл) по сравнению с контрольной группой (2,85 нг/мл) (рис. 2б), но при этом не было выявлено статистически значимого отличия от группы ГГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших предыдущих экспериментальных исследованиях была продемонстрирована высокая нейропротекторная эффективность гипоксии и гиперкапнии при использовании в качестве защитной стратегии для формирования ишемической/гипоксической толерантности головного мозга [7–9]. Эти работы последовательно указывали на превосходство сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии над их изолированным воздействием. Предполагается, что повышенная эффективность обусловлена взаимным потенцированием протекторных механизмов гипоксии и гиперкапнии, включая активацию HIF-1 α ,

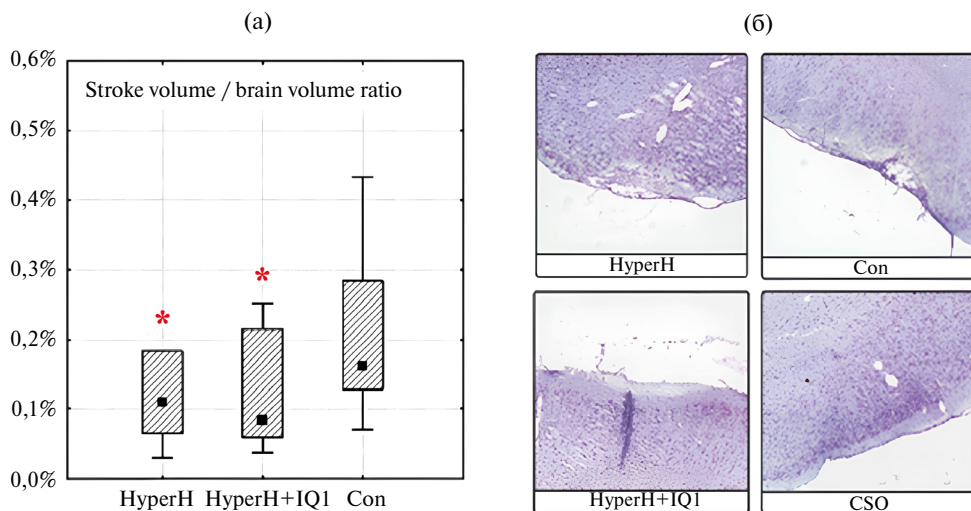


Рис. 1. Отношение объема инсульта к объему головного мозга. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. HyperH – гиперкапническая гипоксия; HyperH + IQ1 – гиперкапническая гипоксия с IQ-1; Con – контрольная группа; CSO – контроль, ложнооперированные. Медианное значение указано черным квадратом в пределах прямоугольника

Fig. 1. Stroke volume to brain volume ratio. * – $p < 0.05$ compared to the control group. HyperH – hypercapnic hypoxia; HyperH + IQ1 – hypercapnic hypoxia with IQ-1; Con – control group; CSO – control, sham-operated. The median value is indicated by the black square within the box

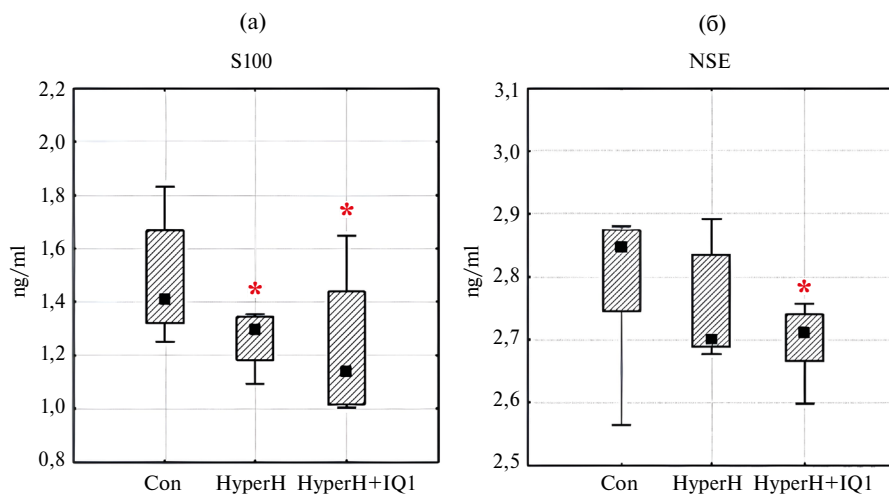


Рис. 2. Уровни S100 и NSE в сыворотке крови крыс. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; HyperH – гиперкапническая гипоксия; HyperH + IQ1 – гиперкапническая гипоксия с применением IQ-1; Con – контрольная группа. Медианное значение указано черным квадратом внутри прямоугольника

Fig. 2. Serum levels of S100 and NSE. * $p < 0.05$ compared to the control group. HyperH – hypercapnic hypoxia; HyperH + IQ1 – hypercapnic hypoxia with IQ-1; Con – control group. The median value is indicated by the black square within the box

метаболическую и клеточную адаптацию, модуляцию апоптоза и сохранение целостности гематоэнцефалического барьера [18]. Подтверждая эти экспериментальные данные, результаты рандомизированного плацебо-контролируемого клинического исследования продемонстрировали клиническую эффективность гиперкапнической гипоксии как стратегии нейрореабилитации в остром постинсультном периоде [10].

При оценке реабилитационного потенциала протоколов газового воздействия с помощью теста ходьбы по сужающейся дорожке существенных различий между экспериментальными группами выявлено не было. Примечательно, что в тесте с ротародом не было обнаружено существенных различий между группами ГГ и контроля. Этот результат может быть объяснен компенсаторной гипокапнией, индуцированной гипервентиляцией во время дыхательных сеансов в обеих экспериментальных группах – явлением, ранее описанным в контексте изолированной гипоксической тренировки [19]. Гипокапния, как было показано, повышает экспрессию проапоптотического белка Вах и индуцирует повреждение митохондрий [20]. Негативное влияние гипокапнии на исходы инсульта и другие неврологические состояния дополнительно подтверждается клиническими данными [21]. При этом группа комбинирования ГГ с препаратом IQ-1 показала лучшие результаты, по сравнению с группой контроля, что свидетельствует об усилении нейрореабилитационного потенциала ГГ при введении ингибитора JNK.

В нашем исследовании не было выявлено статистически значимых различий между группами при оценке неврологического дефицита по шкале NSS. Возможно, это связано с небольшим размером зоны инсульта, что приводило к слабо выраженным сенсомоторным нарушениям, которые не удавалось дифференцировать между разными экспериментальными группами.

При проведении морфометрии мы обнаружили значимое снижение объема инфаркта в экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой. Кроме того, при проведении ИФА после воздействия гиперкапнической гипоксии в комбинации с ингибитором JNK наблюдалось снижение сывороточных уровней S100 и NSE, тогда как гиперкапническая гипоксия привела только к снижению S100. Это различие может отражать более эффективное восстановление целостности нервной ткани и/или функции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) после воздействия гиперкапнической гипоксии в комбинации с препаратом IQ-1.

Эти находки согласуются с нашими предыдущими данными, демонстрирующими, что сочетанное воздействие гиперкапнии и гипоксии приводит к уменьшению проницаемости ГЭБ [18]. Вероятным механизмом, лежащим в основе этого эффекта, является противовоспалительное действие гиперкапнии и его потенцирование при помощи введения ингибитора JNK. При воспалении активация NF- κ B увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-6 и IL-8, а также молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), которые облегчают инфильтрацию иммунных клеток через сосудистую стенку [22, 23]. Гиперкапния подавляет как классические, так и неклассические пути активации NF- κ B, тем самым снижая экспрессию цитокинов и молекул адгезии [24, 25]. Также было показано, что воздействие гиперкапнии напрямую подавляет выработку TNF- α [26] и снижает секрецию провоспалительных интерлейкинов IL-1 β , IL-6 и IL-8 [27], одновременно способствуя выработке противовоспалительного цитокина IL-10 [28]. Кроме того, повышенная экспрессия белков теплового

шока, наблюдаемая после гиперкапнически-гипоксического воздействия [19], может дополнительно ослаблять NF- κ B-опосредованные воспалительные реакции [29]. Более того, гиперкапния может напрямую влиять на метаболизм макрофагов, снижая гликолитическую активность и способствуя переходу от провоспалительного фенотипа M1 к противовоспалительному фенотипу M2 [30]. Еще одним важным механизмом может быть активация митофагии в нейронах и глиальных клетках во время гиперкапнической гипоксии, которая поддерживает контроль качества митохондрий и снижает вторичную активацию воспалительных процессов [31].

Другим фактором, который может способствовать восстановлению целостности ГЭБ и подавлению нейровоспаления при гиперкапнической гипоксии, является ингибирование матриксных металлопротеиназ (ММР). Было показано, что гипоксическое прекондиционирование может снижать активность ММР-2 и ММР-9 – ферментов, участвующих в повышении проницаемости ГЭБ при ишемически-реперфузионном повреждении [32, 33].

В настоящем исследовании мы сочетали интермиттирующую гиперкапническую гипоксию с ингибитором JNK IQ-1, чтобы оценить, может ли этот фармакологический нейропротектор потенцировать восстановление после инсульта. Выбор IQ-1 был основан на предыдущих данных, когда внутрибрюшинное введение препарата крысам после инсульта уменьшало как неврологический дефицит, так и объем инфаркта [34]. Благоприятные эффекты ингибирования JNK могут способствовать постишемическому восстановлению через несколько защитных механизмов. В частности, блокада JNK ингибирует апоптоз, снижает активность ММР-9, каспазы-3 и TNF- α [35] и помогает сохранять селективность ГЭБ [36]. Кроме того, подавление нейровоспаления за счет снижения активности NF- κ B является еще одним потенциальным механизмом JNK-опосредованной нейропротекции [37]. Возможно, что именно эти свойства ингибитора JNK привели к улучшению ряда показателей нейрореабилитационного эффекта в группе комбинированного воздействия ГГ и IQ-1.

Несмотря на обнаруженные отличия между экспериментальными группами (снижение концентрации NSE, двигательные-координационные улучшения), препарат IQ-1 не показал выраженного потенцирующего эффекта в тесте с сужающейся дорожкой и при морфометрии области инсульта. Отсутствие выраженного потенцирующего эффекта препарата в комбинации с гиперкапнической гипоксией может быть связано с поздним началом его введения после индукции фокального инсульта, недостаточной дозировкой или низкой биодоступностью из-за выбранного пути введения и частоты инъекций. Как следствие, противовоспалительные и антиапоптотические эффекты блокады JNK могли быть менее эффективными в фазе реабилитации, когда острые проявления ишемического повреждения уже были компенсированы. В то же время ингибирование JNK могло положительно влиять на восстановление ГЭБ через увеличение секреции VEGF, что может объяснить более выраженное снижение уровня NSE в сыворотке [38]. Следует также отметить, что некоторые исследования предполагают, что отсроченное введение ингибиторов JNK может быть неэффективным или даже вредным, потенциально усугубляя неврологический дефицит и размер инфаркта за счет нарушения сосудистого ремоделирования после инсульта [39]. Помимо упомянутых выше факторов, на наблюдаемую неэффективность IQ-1 могли повлиять его фармакокинетические особенности. Учитывая, что проницаемость ГЭБ является динамическим показателем, который изменяется после инсульта, восстановление селективной

проницаемости ГЭБ могло снизить поступление IQ-1 в мозг, тем самым влияя на его эффективность [40].

Потенцирование гиперкапнической гипоксии оценивалось только для одной дозы IQ-1 (25 мг/кг) и одного пути введения (внутрибрюшинно), при отсроченном окне применения (12–17-е сутки после инсульта) и ограниченном числе инъекций (6 введений). Отсутствовали данные о фармакокинетике и целевом взаимодействии (концентрации IQ-1 в плазме и ткани мозга, степени ингибирования JNK), что не позволяет однозначно отделить недостаточную экспозицию препарата от истинного отсутствия эффекта. В дальнейшем целесообразны исследования дозозависимости, оптимизации кратности введения и сравнения альтернативных путей доставки (внутривенно, перорально, интраназально), а также более ранних и/или более длительных схем в подостром периоде.

Полученные результаты подтверждают потенциал гиперкапнической гипоксии как неинвазивного адьювантного подхода в постинсультной реабилитации, ассоциированного с уменьшением объема инфаркта и улучшением отдельных показателей моторной функции. Наблюдаемое дополнительное снижение NSE и тенденция к лучшему восстановлению на ротароде при добавлении ингибитора JNK поддерживают гипотезу о роли нейровоспаления и восстановления целостности ГЭБ как терапевтических мишеней комбинированных вмешательств. Вместе с тем экстраполяция на клиническую практику требует оценки безопасности режимов гиперкапнии/гипоксии у пациентов (с учетом дыхательной и сердечно-сосудистой коморбидности), а также разработки клинически применимых и безопасных модуляторов JNK с определенными профилями эффективности и риска.

Перспективными задачами являются: подтверждение эффекта в более крупных выборках и на моделях с большей вариабельностью дефицита; включение обоих полов и коморбидных животных; расширение набора конечных точек (проницаемость ГЭБ, нейровоспалительные маркеры, нейрогенез и ангиогенез, нейровизуализация), а также определение оптимального окна и параметров комбинированного воздействия для достижения устойчивого функционального восстановления.

Таким образом, интермиттирующая гиперкапническая гипоксия после фотохимически индуцированного тромбоза у крыс приводила к значимому уменьшению объема инфаркта и сопровождалась улучшением ряда показателей сенсомоторного восстановления. Добавление ингибитора JNK IQ-1 проявило частичный потенциал к потенцированию эффекта гиперкапнической гипоксии, наиболее заметный по данным ротарода и снижению сывороточной концентрации NSE. Учитывая ограничения дизайна и неопределенность оптимальной схемы применения IQ-1, полученные результаты следует рассматривать как основание для дальнейшей оптимизации дозировок/путей введения и подтверждающих исследований с расширенным набором конечных точек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan H., Liu J., Gu Y. et al. Intermittent hypoxia conditioning as a potential prevention and treatment strategy for ischemic stroke: current evidence and future directions. *Front. Neurosci.* 2022. Vol. 16. 1067411. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1067411>

2. Sharp F.R., Ran R., Lu A. et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx*. 2004. Vol. 1. Pp. 26–35. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.1.26>
3. Pietrogrande G., Zalewska K., Zhao Z. et al. Low oxygen post-conditioning as an efficient non-pharmacological strategy to promote motor function after stroke. *Transl. Stroke Res*. 2019. Vol. 10. Pp. 402–412. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0656-5>
4. Sprick J.D., Mallet R.T., Przyklenk K. et al. Ischaemic and hypoxic conditioning: potential for protection of vital organs. *Exp. Physiol*. 2019. Vol. 104. Pp. 278–294. <https://doi.org/10.1113/EP087122>
5. Tao T., Liu Y., Zhang J. et al. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. *Brain Res*. 2013. Vol. 1533. Pp. 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.014>
6. Pruijboom L., Muskiet F.A.J. Intermittent living: the use of ancient challenges as a vaccine against the deleterious effects of modern life—a hypothesis. *Med. Hypotheses*. 2018. Vol. 120. Pp. 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.08.002>
7. Куликов В.П., Беспалов А.Г., Якушев Н.Н. Эффективность тренировок с гиперкапнической гипоксией при реабилитации ишемического повреждения мозга в эксперименте. *Вестник восстановительной медицины*. 2008. № 2. С. 59–61.
8. Куликов В.П., Трегуб П.П., Беспалов А.Г. и др. Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в повышении устойчивости организма к острой гипоксии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013. № 3. С. 59–61.
9. Alekseeva T.M., Topuzova M.P., Kulikov V.P. et al. Hypercapnic hypoxia as a method of rehabilitation of patients after ischemic stroke. *Neurol. Res*. 2024. Vol. 46. Pp. 695–705. <https://doi.org/10.1080/01616412.2024.2343510>
10. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Hammaker D. et al. Anti-inflammatory effects and joint protection in collagen-induced arthritis after treatment with IQ-1, a selective c-Jun N-terminal kinase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2015. Vol. 353. Pp. 505–516. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.220251>
11. Barth A.M., Mody I. Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. *J. Neurosci*. 2011. Vol. 31. Pp. 851–860. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-10.2011>
12. Chen J., Li Y., Wang L. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001. Vol. 32. Pp. 1005–1011. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.4.1005>
13. Modi A.D., Parekh A., Patel Z.H. Methods for evaluating gait-associated dynamic balance and coordination in rodents. *Behav. Brain Res*. 2024. Vol. 456. 114695. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114695>
14. Balduini W., De Angelis V., Mazzoni E. et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*. 2000. Vol. 859. Pp. 318–325. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01997-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01997-1)
15. Keiner S., Wurm F., Kunze A. et al. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia*. 2008. Vol. 56. Pp. 516–527. <https://doi.org/10.1002/glia.20632>

16. Dell R.B., Holleran S., Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J.* 2002. Vol. 43. Pp. 207–213. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>
17. Tregub P.P., Kulikov V.P., Ibrahimli I. et al. Molecular mechanisms of neuroprotection after the intermittent exposures of hypercapnic hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25. 3665. <https://doi.org/10.3390/ijms25073665>
18. Varis N., Leinonen A., Parkkola K. et al. Hyperventilation and hypoxia hangover during normobaric hypoxia training in Hawk simulator. *Front. Physiol.* 2022. Vol. 13. 942249. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.942249>
19. Lasso Pirot A., Fritz K.I., Ashraf Q.M. et al. Effects of severe hypocapnia on expression of bax and bcl-2 proteins, DNA fragmentation, and membrane peroxidation products in cerebral cortical mitochondria of newborn piglets. *Neonatology.* 2007. Vol. 91. Pp. 20–27. <https://doi.org/10.1159/000096967>
20. Scudellari A., Dudek P., Marino L. et al. Ventilation targets for patients undergoing mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: a systematic review. *J. Clin. Med.* 2023. Vol. 12. 4925. <https://doi.org/10.3390/jcm12154925>
21. Li J., Dong S., Quan S. et al. Nuciferine reduces inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion injury through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Phytomedicine.* 2024. Vol. 125. 155312. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155312>
22. Guo Q., Jin Y., Chen X. et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther.* 2024. Vol. 9. 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>
23. Keogh C.E., Scholz C.C., Rodriguez J. et al. Carbon dioxide-dependent regulation of NF- κ B family members RelB and p100 gives molecular insight into CO₂-dependent immune regulation. *J Biol Chem.* 2017. Vol. 292. Pp. 11561–11571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755090>
24. Tang S.E., Wu S.Y., Chu S.J. et al. Pre-Treatment with Ten-Minute Carbon Dioxide Inhalation Prevents Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Mice via Down-Regulation of Toll-Like Receptor 4 Expression. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20. 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms20246293>
25. Lu Z., Casalino-Matsuda S.M., Nair A. et al. A role for heat shock factor 1 in hypercapnia-induced inhibition of inflammatory cytokine expression. *FASEB J.* 2018. Vol. 32. Pp. 3614–3622. <https://doi.org/10.1096/fj.201701164R>
26. Ding H., Li Y., Li X. et al. Treatment with 7% and 10% CO₂ Enhanced Expression of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in Hypoxic Cultures of Human Whole Blood. *J Int Med Res.* 2020. Vol. 48. 300060520912105. <https://doi.org/10.1177/0300060520912105>
27. Kimura D., Totapally B.R., Raszynski A. et al. The Effects of CO₂ on Cytokine Concentrations in Endotoxin-Stimulated Human Whole Blood. *Crit Care Med.* 2008. Vol. 36. Pp. 2823–2827. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318186f556>
28. Yang L.L., Ji X.P., Liu Z. et al. Effects of Hypercapnia on Nuclear Factor- κ B and TNF- α in Acute Lung Injury Models. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2004. Vol. 20. Pp. 396–400.
29. Phelan D.E., Mota C., Strowitzki M.J. et al. Hypercapnia alters mitochondrial gene expression and acylcarnitine production in monocytes. *Immunol Cell Biol.* 2023. Vol. 101. Pp. 556–577. <https://doi.org/10.1111/imcb.12642>
30. Nadeev A.D., Kritskaya K.A., Fedotova E.I. et al. “One Small Step for Mouse”: High CO₂ Inhalation as a New Therapeutic Strategy for Parkinson’s Disease. *Biomedicines.* 2022. Vol. 10. 2832. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112832>

31. Zitta K., Meybohm P., Bein B. et al. Serum from patients undergoing remote ischemic preconditioning protects cultured human intestinal cells from hypoxia-induced damage: Involvement of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Mol Med.* 2012. Vol. 18. Pp. 29–37. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00278>
32. Chao C.M., Chen C.L., Niu K.C. et al. Hypobaric hypoxia preconditioning protects against hypothalamic neuron apoptosis in heat-exposed rats by reversing hypothalamic overexpression of matrix metalloproteinase-9 and ischemia. *Int J Med Sci.* 2020. Vol. 17. Pp. 2622–2634. <https://doi.org/10.7150/ijms.47560>
33. Atochin D.N., Schepetkin I.A., Khlebnikov A.I. et al. A novel dual NO-donating oxime and c-Jun N-terminal kinase inhibitor protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Neurosci Lett.* 2016. Vol. 618. Pp. 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.033>
34. Nadel G., Maik-Rachline G., Seger R. JNK Cascade-Induced Apoptosis—A Unique Role in GqPCR Signaling. *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24. 13527. <https://doi.org/10.3390/ijms241713527>
35. Plotnikov M.B., Anishchenko A.M., Khlebnikov A.I. et al. Regulation of Blood-Brain Barrier Permeability via JNK Signaling Pathway: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke, Alzheimer’s Disease and Brain Tumors. *Molecules.* 2025. Vol. 30. 2353. <https://doi.org/10.3390/molecules30112353>
36. Zheng J., Dai Q., Han K. et al. JNK-IN-8, a c-Jun N-terminal kinase inhibitor, improves functional recovery through suppressing neuroinflammation in ischemic stroke. *J Cell Physiol.* 2020. Vol. 235. Pp. 2792–2799. <https://doi.org/10.1002/jcp.29183>
37. He B., Fu G.H., Du X.F. et al. Halofuginone protects HUVECs from H₂O₂-induced injury by modulating VEGF/JNK signaling pathway. *J Chin Med Assoc.* 2019. Vol. 82. Pp. 92–98. <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000008>
38. Murata Y., Fujiwara N., Seo J.H. et al. Delayed inhibition of c-Jun N-terminal kinase worsens outcomes after focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2012. Vol. 32. Pp. 8112–8115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0219-12.2012>
39. Bernardo-Castro S., Sousa J.A., Brás A. et al. Pathophysiology of Blood-Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Front Neurol.* 2020. Vol. 11. 594672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>

REFERENCES

1. Yuan H., Liu J., Gu Y. et al. Intermittent hypoxia conditioning as a potential prevention and treatment strategy for ischemic stroke: current evidence and future directions. *Front. Neurosci.* 2022; **16**:1067411. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1067411>
2. Sharp F.R., Ran R., Lu A. et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx.* 2004; **1**:26–35. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.1.26>
3. Pietrogrande G., Zalewska K., Zhao Z. et al. Low oxygen post-conditioning as an efficient non-pharmacological strategy to promote motor function after stroke. *Transl. Stroke Res.* 2019; **10**:402–412. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0656-5>
4. Sprick J.D., Mallet R.T., Przyklenk K. et al. Ischaemic and hypoxic conditioning: potential for protection of vital organs. *Exp. Physiol.* 2019; **104**:278–294. <https://doi.org/10.1113/EP087122>

5. Tao T., Liu Y., Zhang J. et al. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. *Brain Res.* 2013;**1533**:52–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.014>
6. Pruijboom L., Muskiet F.A.J. Intermittent living: the use of ancient challenges as a vaccine against the deleterious effects of modern life—a hypothesis. *Med. Hypotheses.* 2018;**120**:28–42. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.08.002>
7. Kulikov V.P., Bespalov A.G., Yakushev N.N. Effektivnost' trenirovok s giperkapnicheskoy gipoksiyey pri reabilitatsii ishemicheskogo povrezhdeniya mozga v eksperimente [The effectiveness of training with hypercapnic hypoxia in the rehabilitation of ischemic brain damage in the experiment]. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny.* 2008;(2):59–61. (In Russ.)
8. Kulikov V.P., Tregub P.P., Bespalov A.G. et al. Sravnitel'naya effektivnost' gipoksii, giperkapnii i giperkapnicheskoy gipoksii v povyshenii ustoychivosti organizma k ostroy gipoksii u krysa [Comparative efficacy of hypoxia, hypercapnia and hypercapnic hypoxia in increasing resistance of the organism]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2013;(3):59–61. (In Russ.)
9. Alekseeva T.M., Topuzova M.P., Kulikov V.P. et al. Hypercapnic hypoxia as a method of rehabilitation of patients after ischemic stroke. *Neurol. Res.* 2024;**46**:695–705. <https://doi.org/10.1080/01616412.2024.2343510>
10. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Hammaker D. et al. Anti-inflammatory effects and joint protection in collagen-induced arthritis after treatment with IQ-1, a selective c-Jun N-terminal kinase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015;**353**:505–516. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.220251>
11. Barth A.M., Mody I. Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. *J. Neurosci.* 2011;**31**:851–860. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-10.2011>
12. Chen J., Li Y., Wang L. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2001;**32**:1005–1011. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.4.1005>
13. Modi A.D., Parekh A., Patel Z.H. Methods for evaluating gait-associated dynamic balance and coordination in rodents. *Behav. Brain Res.* 2024;**456**:114695. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114695>
14. Balduini W., De Angelis V., Mazzoni E. et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 2000;**859**:318–325. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)01997-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)01997-1)
15. Keiner S., Wurm F., Kunze A. et al. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia.* 2008;**56**:516–527. <https://doi.org/10.1002/glia.20632>
16. Dell R.B., Holleran S., Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J.* 2002;**43**:207–213. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>
17. Tregub P.P., Kulikov V.P., Ibrahimli I. et al. Molecular mechanisms of neuroprotection after the intermittent exposures of hypercapnic hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;**25**:3665. <https://doi.org/10.3390/ijms25073665>
18. Varis N., Leinonen A., Parkkola K. et al. Hyperventilation and hypoxia hang-over during normobaric hypoxia training in Hawk simulator. *Front. Physiol.* 2022;**13**:942249. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.942249>

19. Lasso Pirot A., Fritz K.I., Ashraf Q.M. et al. Effects of severe hypocapnia on expression of bax and bcl-2 proteins, DNA fragmentation, and membrane peroxidation products in cerebral cortical mitochondria of newborn piglets. *Neonatology*. 2007;**91**:20–27. <https://doi.org/10.1159/000096967>
20. Scudellari A., Dudek P., Marino L. et al. Ventilation targets for patients undergoing mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: a systematic review. *J. Clin. Med.* 2023;**12**:4925. <https://doi.org/10.3390/jcm12154925>
21. Li J., Dong S., Quan S. et al. Nuciferine reduces inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion injury through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Phytomedicine*. 2024;**125**:155312. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155312>
22. Guo Q., Jin Y., Chen X. et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications. *Signal Transduct. Target Ther.* 2024;**9**:53. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>
23. Keogh C.E., Scholz C.C., Rodriguez J. et al. Carbon dioxide-dependent regulation of NF- κ B family members RelB and p100 gives molecular insight into CO₂-dependent immune regulation. *J. Biol. Chem.* 2017;**292**:11561–11571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755090>
24. Tang S.E., Wu S.Y., Chu S.J. et al. Pre-treatment with ten-minute carbon dioxide inhalation prevents lipopolysaccharide-induced lung injury in mice via down-regulation of Toll-like receptor 4 expression. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;**20**:6293. <https://doi.org/10.3390/ijms20246293>
25. Lu Z., Casalino-Matsuda S.M., Nair A. et al. A role for heat shock factor 1 in hypercapnia-induced inhibition of inflammatory cytokine expression. *FASEB J.* 2018;**32**:3614–3622. <https://doi.org/10.1096/fj.201701164R>
26. Ding H., Li Y., Li X. et al. Treatment with 7% and 10% CO₂ enhanced expression of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in hypoxic cultures of human whole blood. *J. Int. Med. Res.* 2020;**48**:300060520912105. <https://doi.org/10.1177/0300060520912105>
27. Kimura D., Totapally B.R., Raszynski A. et al. The effects of CO₂ on cytokine concentrations in endotoxin-stimulated human whole blood. *Crit. Care Med.* 2008;**36**:2823–2827. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318186f556>
28. Yang L.L., Ji X.P., Liu Z. et al. Effects of hypercapnia on nuclear factor- κ B and TNF- α in acute lung injury models. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2004;**20**:396–400.
29. Phelan D.E., Mota C., Strowitzki M.J. et al. Hypercapnia alters mitochondrial gene expression and acylcarnitine production in monocytes. *Immunol. Cell Biol.* 2023;**101**:556–577. <https://doi.org/10.1111/imcb.12642>
30. Nadeev A.D., Kritskaya K.A., Fedotova E.I. et al. “One Small Step for Mouse”: High CO₂ inhalation as a new therapeutic strategy for Parkinson’s disease. *Biomedicines*. 2022;**10**:2832. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112832>
31. Zitta K., Meybohm P., Bein B. et al. Serum from patients undergoing remote ischemic preconditioning protects cultured human intestinal cells from hypoxia-induced damage: Involvement of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Mol. Med.* 2012;**18**:29–37. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00278>
32. Chao C.M., Chen C.L., Niu K.C. et al. Hypobaric hypoxia preconditioning protects against hypothalamic neuron apoptosis in heat-exposed rats by reversing hypothalamic overexpression of matrix metalloproteinase-9 and ischemia. *Int. J. Med. Sci.* 2020;**17**:2622–2634. <https://doi.org/10.7150/ijms.47560>
33. Atochin D.N., Schepetkin I.A., Khlebnikov A.I. et al. A novel dual NO-donating oxime and c-Jun N-terminal kinase inhibitor protects against

- cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Neurosci. Lett.* 2016;**618**:45–49. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.033>
34. Nadel G., Maik-Rachline G., Seger R. JNK cascade-induced apoptosis—A unique role in GqPCR signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;**24**:13527. <https://doi.org/10.3390/ijms241713527>
35. Plotnikov M.B., Anishchenko A.M., Khlebnikov A.I. et al. Regulation of blood-brain barrier permeability via JNK signaling pathway: mechanisms and potential therapeutic strategies for ischemic stroke, Alzheimer’s disease and brain tumors. *Molecules.* 2025;**30**:2353. <https://doi.org/10.3390/molecules30112353>
36. Zheng J., Dai Q., Han K. et al. JNK-IN-8, a c-Jun N-terminal kinase inhibitor, improves functional recovery through suppressing neuroinflammation in ischemic stroke. *J. Cell Physiol.* 2020;**235**:2792–2799. <https://doi.org/10.1002/jcp.29183>
37. He B., Fu G.H., Du X.F. et al. Halofuginone protects HUVECs from H₂O₂-induced injury by modulating VEGF/JNK signaling pathway. *J. Chin. Med. Assoc.* 2019;**82**:92–98. <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000008>
38. Murata Y., Fujiwara N., Seo J.H. et al. Delayed inhibition of c-Jun N-terminal kinase worsens outcomes after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 2012;**32**:8112–8115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0219-12.2012>
39. Bernardo-Castro S., Sousa J.A., Brás A. et al. Pathophysiology of blood-brain barrier permeability throughout the different stages of ischemic stroke and its implication on hemorrhagic transformation and recovery. *Front. Neurol.* 2020;**11**:594672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Трегуб Павел Павлович – д-р мед. наук; ст. науч. сотр., Российский центр неврологии и нейронаук; проф. кафедры патологической физиологии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова; ст. науч. сотр., научно-образовательный ресурсный центр «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа», Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва, Российская Федерация
E-mail: tregub_p_p@staff.sechenov.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3650-6121>

Чекулаев Павел Андреевич – лаборант, Институт мозга, Российский центр неврологии и нейронаук; студент, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация
E-mail: pavelch1733@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0005-4826-9337>

Зембатов Георгий Маратович – ординатор, Российский центр неврологии и нейронаук, Москва, Российская Федерация
E-mail: georgiythebear@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0825-8909>

Намиот Евгения Дмитриевна – ординатор, Российский центр неврологии и нейронаук,
Москва, Российская Федерация
E-mail: janenamiot@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3725-6360>

Игнатюк Михаил Александрович – мл. науч. сотр., Научно-образовательный
ресурсный центр «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового
пространственного профилирования и ультраструктурного анализа», Российский
университет дружбы народов (РУДН), Москва, Российская Федерация
E-mail: ignatyuk-ma@rudn.ru
<https://orcid.org/0009-0007-3552-5551>

Бердников Арсений Константинович – асп. 3 года обучения очной формы, Российский
центр неврологии и нейронаук, Москва, Российская Федерация
E-mail: akberdnikov@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0007-4195-2533>

Коврижина Анастасия Руслановна – науч. сотр., Научно-образовательный центр
имени Н.М. Кижнера, Томский политехнический университет,
Томск, Российская Федерация
E-mail: anaskowry@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9316-0964>

Куликов Владимир Павлович – д-р мед. наук; проф.; зав. каф. Алтайского
государственного медицинского университета, Барнаул, Российская Федерация
E-mail: kulikov57@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4869-5465>

Поступила в редакцию 27.10.2025
После доработки 23.02.2026
Принята к публикации 24.02.2026

ABOUT THE AUTHORS

Tregub, Pavel P. – Ph.D. (Medicine); Senior Research Officer, Russian Center of Neurology and Neuroscience; Professor at the Department of Pathophysiology, First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov; Senior Research Officer, Scientific and educational resource center “Innovative technologies of immunophenotyping, digital spatial profiling and ultrastructural analysis”, People’s Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, Russian Federation
E-mail: tregub_p_p@staff.sechenov.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3650-6121>

Chekulaev, Pavel A. – Laboratory Assistant, Brain Institute, Russian Center of Neurology and Neuroscience; Student of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation
E-mail: pavelch1733@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0005-4826-9337>

Zembatov, Georgiy M. – Resident, Russian Center of Neurology and Neuroscience, Moscow, Russian Federation
E-mail: georgiythebear@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0825-8909>

Namiot, Evgeniya D. – Resident, Russian Center of Neurology and Neuroscience, Moscow, Russian Federation
E-mail: janenamiot@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3725-6360>

Ignatyuk, Mikhail A. – Research Assistant, Scientific and educational resource center “Innovative technologies of immunophenotyping, digital spatial profiling and ultrastructural analysis”, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, Russian Federation
E-mail: ignatyuk-ma@rudn.ru
<https://orcid.org/0009-0007-3552-5551>

Berdnikov, Arseniy K. – 3rd-Year Full-Time Postgraduate, Russian Center of Neurology and Neuroscience, Moscow, Russian Federation
E-mail: akberdnikov@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0007-4195-2533>

Kovrizhina, Anastasia R. – Research Officer, N.M. Kizhner Scientific and Educational Center, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation
E-mail: anaskowry@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9316-0964>

Kulikov, Vladimir P. – Ph.D. (Medicine); Full Professor; Head of the Department, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation
E-mail: kulikov57@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4869-5465>

Received October 27, 2025
Revised February 23, 2026
Accepted February 24, 2026