

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ,
ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 612.22, 619, 591.1

**ИНТЕРВАЛЬНОЕ ИНГАЛЯЦИОННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
КИСЛОРОДНО-ГЕЛИЕВОЙ СМЕСИ УСТРАНЯЕТ ПОСЛЕДСТВИЯ
ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ВОЗДУШНОЙ ЭМБОЛИИ У КРЫС**

© 2024 г. В. А. Паликов^{1,2}, Н. Б. Павлов¹, А. М. Исмаилова², Р. Р. Амиров¹,
И. А. Дьяченко², Н. А. Бороздина², А. В. Бервинова², А. Т. Логунов³,
А. Н. Мурашев², В. М. Баранов¹. *

¹Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Филиал Государственного научного центра Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино, Россия

³ЗАО «СКБ ЭО при ИМБИ РАН», Химки, Россия

*e-mail: baranov-vm@mail.ru

Поступила в редакцию 06.05.2024 г.

После доработки 12.06.2024 г.

Принята к публикации 22.07.2024 г.

Кислородно-гелиевая смесь демонстрирует выраженную эффективность на животных моделях ишемии/реперфузии, что открывает возможность использования гелиевых смесей в качестве экстренной меры для терапии сосудистой эмболии. Нами была смоделирована церебральная артериальная воздушная эмболия путем введения пузырька воздуха во внутреннюю сонную артерию бодрствующим крысам. Ингаляция подогретой кислородно-гелиевой смеси в первый час после моделирования артериальной эмболии нормализует физиологические отклонения и предупреждает ишемические повреждения головного мозга, в то время как применение подогретой кислородно-гелиевой смеси через 2 часа после моделирования артериальной эмболии значительно ухудшает состояние животных.

Ключевые слова: кислородно-гелиевая смесь (КГС), церебральная артериальная воздушная эмболия (ЦАВЭ), ишемия головного мозга, крысы SD.

DOI: 10.31857/S0044467724050072

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные окклюзии, вызванные воздушной эмболией, чувствительны ко времени, что требует альтернативной стратегии неотложного лечения и реперфузии. Исследования *in vivo* уже показали, что три 5-минутные ингаляции 70% гелия и 30% кислорода перед окклюзией коронарной артерии и реперфузией значительно уменьшают размер инфаркта миокарда у кроликов (Pagel et al., 2007). Однако лишь немногие исследователи изучали влияние ингаляции КГС на нервную систему. В 2007 и 2011 гг. Рап с соавторами продемонстрировали снижение площади поражения мозга при применении гелиокса (30% кислорода/70% гелия) после окклюзии/реперфузии сосудов головного мозга (Рап et al., 2007, 2011).

Ранее нами была показана эффективность КГС при церебральной воздушной эмболии

(ЦАВЭ) (Palikov et al., 2024). Мы сравнили эффективность КГС с кислородотерапией в нормobarических условиях. При помощи измерения физиологических параметров и стандартного окрашивания фронтальных срезов головного мозга мы показали, что КГС превосходит стандартную кислородотерапию. Более того, применение КГС было сопоставимо по эффективности с группой, где использовалась гипербарическая терапия при давлении 3 АТА. В своей работе мы пришли к выводу, что КГС эффективен в первые минуты после эмболизации. Однако известно, что при инсульте существует промежуток времени, при котором терапия наиболее эффективна и оказывает существенное влияние на исход заболевания (Рап et al., 2007). Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования являлось изучение эффективности КГС в более отдаленные промежутки времени после ЦАВЭ.

МЕТОДИКА

Животные

В исследованиях принимали участие 24 самца крыс SD SPF-статуса в возрасте 8–10 недель. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН. Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены Институтской биоэтической комиссией (протокол № 922/22 от 27.12.2022).

Моделирование церебральной артериальной воздушной эмболии

Перед моделированием ЦАВЭ проводилась катетеризация внутренней сонной артерии. Катетеризация животных проходила под общей интубационной анестезией (Телазол®, 30 мг/кг/Ксила®, 10 мг/кг). Через сутки после катетеризации моделировали ЦАВЭ. Животное помещалось в домик-фиксатор в бодрствующем состоянии. К катетеру, выведенному на холку крысы, подключали шприц, заполненный воздухом и установленный в инфузомат. Скорость подачи воздуха через катетер составляла 10 мкл в минуту, объем воздуха – 100 мкл на животное.

В зависимости от применяемой терапии после ЦАВЭ животные были разделены на 4 группы по 6 животных. В группе 1 животные не подвергались терапии. В группе 2 – ингаляция КГС непосредственно после моделирования ЦАВЭ, в группе 3 ингаляция КГС проводилась через 1 час, и в группе 4 – ингаляция КГС через 2 часа после моделирования ЦАВЭ.

Введение тестируемых газовых смесей

Ингаляция КГС («Дыхательная газовая смесь "Геофарм-3" (гипероксическая)», состав – 32% O₂/68% He, производитель – ЗАО «СКБ ЭО при ИМБП РАН», по ТУ 20.11.12-007-45745482-2019) проводилась с использованием «Лабораторного ингаляционного комплекса для подачи газовых смесей», ЗАО «СКБ ЭО при ИМБП РАН». КГС нагревалась до необходимой температуры и через рассеиватель равномерно подавалась в отверстие, к которым были подсоединены домики-фиксаторы с крысами. Ингаляционный сеанс КГС проводился интервально: 3 раза по 5 минут, с 5-минутными перерывами.

Функциональные тесты

Функциональные тесты на животных проводились до эмболизации, в качестве входного контроля, и через 24 часа после ЦАВЭ.

Температуру тела измеряли с помощью медицинского цифрового термометра (B. Well, Швейцария), с диапазоном работы от 32 °С до 42 °С.

Параметры внешнего дыхания оценивали с помощью системы «PowerLab 8/35» (ADInstruments Pty Ltd., Австралия) с использованием блока спирометра и дыхательной головки FE141 Spirometer. Регистрировалась частота дыхания и дыхательный объем. Минутный объем дыхания рассчитывался исходя из вышеуказанных параметров.

Параметры сердечно-сосудистой системы оценивали с помощью компьютеризированной системы NIBP PowerLab 8/35 (ADInstruments Pty Ltd., Австралия). Датчик пульса с манжетой располагали на основании хвоста на вентральной поверхности, непосредственно под каудальной артерией, добившись четкого пульсового сигнала путем изменения положения датчика на хвосте. При накачивании манжеты регистрировали значения систолического артериального давления.

Локомоторную активность животных оценивали в течение 3 минут с помощью компьютеризированной системы Multiple Activity Cage 47420 with CUB 2005 v.3.0.15 software, Ugo Basile, в которой для подсчета локомоторных движений используются инфракрасные фотодатчики, расположенные по периметру прозрачной пластиковой квадратной клетки.

Гистологический анализ

Животные были подвергнуты эвтаназии спустя сутки после эмболизации при помощи анестезии (Телазол®/Ксила®) с последующим терминальным взятием крови. Была проведена некропсия всех животных. Некропсия включала вскрытие дорзального свода черепа без повреждения ткани мозга с последующим извлечением головного мозга и осмотром мозговых оболочек. Мозг извлекали, нарезали на фронтальные срезы толщиной 2 мм. Затем из этих срезов были изготовлены гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином.

Статистический анализ

Данные для сравнения показателей одной группы до и после моделирования ЦАВЭ были проанализированы с помощью Repeated Measures ANOVA, межгрупповые различия определялись с помощью параметрического однофакторного анализа (ANOVA) с пост-тестом Tukey. Статистический анализ был проведен программой Prism 8.0 (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Понижение температуры тела через 24 часа после моделирования ЦАВЭ было значительно

выражено в группе без терапии, а также в группе с применением КГС через час и 2 часа после моделирования ЦАВЭ (рис. 1 (а)). Однако более выраженное снижение температуры тела наблюдалось при применении КГС через 2 часа после ЦАВЭ.

Минутный объем дыхания статистически значимо снижался через 24 часа после моделирования ЦАВЭ во всех группах, однако наиболее выраженное снижение минутного дыхательного объема наблюдалось в группе с применением КГС через 2 часа после моделирования ЦАВЭ, что показало ухудшенные результаты даже относительно группы без терапии (рис. 1 (б)).

Артериальное давление через 24 часа после моделирования ЦАВЭ было значительно снижено только у животных, которым давалась КГС через час и 2 часа после моделирования ЦАВЭ (рис. 1 (в)). Применение КГС через 2 часа после моделирования ЦАВЭ показало наибольшее снижение артериального давления относительно всех групп.

Локомоторная активность через 24 часа после ЦАВЭ была значительно снижена в группах без терапии, а также с применением КГС через час и 2 часа после ЦАВЭ (рис. 1 (г)). Локомоторная активность животных с терапией КГС через 2 часа через сутки эксперимента была значительно ниже, чем в группе без терапии.

Гистологический анализ

Спустя 24 часа у животных с ЦАВЭ без терапии обнаруживаются мультифокальные очаги ишемического инсульта. В ишемизированных областях наблюдается гибель клеток, характеризующаяся ядерными пикнотическими изменениями (рис. 2 (а)). У животных с применением КГС сразу после ЦАВЭ или спустя 1 час после ЦАВЭ отсутствуют участки повреждения ткани головного мозга (рис. 2 (б-в)). У животных с применением КГС спустя 2 часа после ЦАВЭ наблюдалась геморрагическая трансформация очага ишемического инфаркта (рис. 2 (г)).

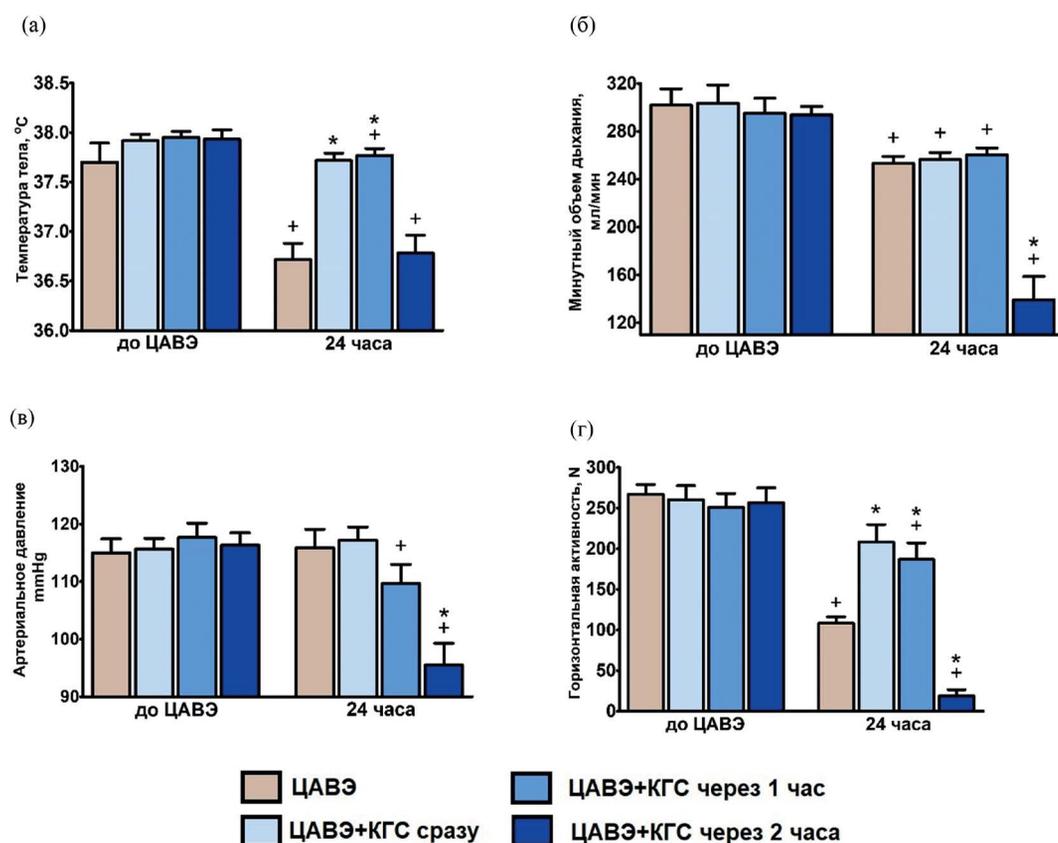


Рис. 1. Результаты функциональных тестов до моделирования ЦАВЭ и через 24 часа после моделирования ЦАВЭ. (а) – температура тела, (б) – минутный объем дыхания, (в) – артериальное давление, (г) – горизонтальная активность в открытом поле. Примечание: * – $p < 0.05$ в сравнении с группой ЦАВЭ, + – $p < 0.05$ в сравнении с параметрами до моделирования ЦАВЭ одной группы.

Fig. 1. Results of functional tests before CAE modeling and 24 hours after CAE modeling. (a) – body temperature, (б) – minute respiratory volume, (в) – blood pressure, (г) – horizontal activity in the open field. Note: * – $p < 0.05$ in comparison with CAE group, + – $p < 0.05$ in comparison with parameters before CAE modelling of one group.

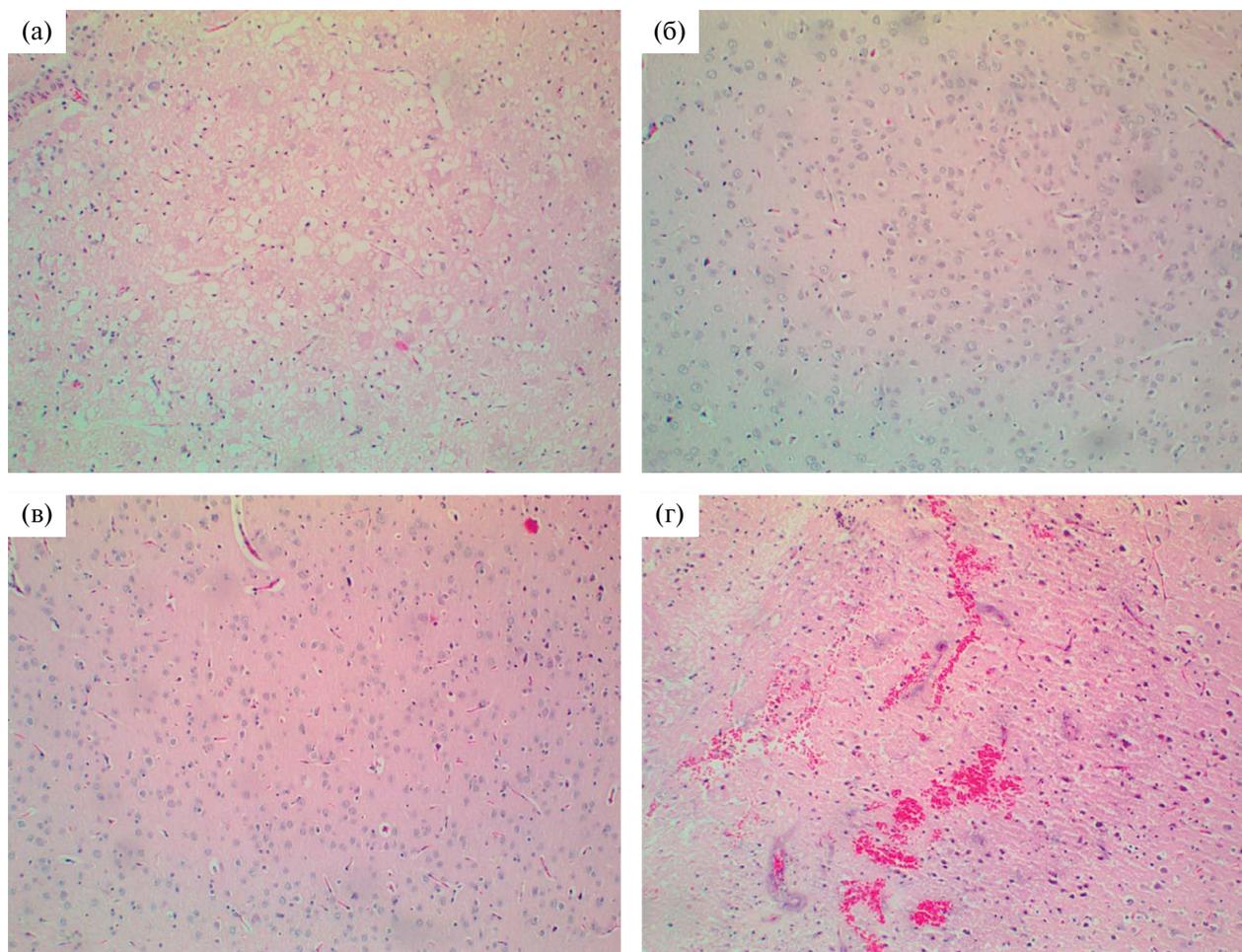


Рис. 2. Гистологические снимки фронтальных срезов головного мозга спустя 24 часа после ЦАВЭ. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$. (а) – очаг ишемического инсульта у животного из группы с ЦАВЭ без терапии; (б) – головной мозг животного из группы с ЦАВЭ и терапией КГС сразу после эмболии; (в) – головной мозг животного из группы с ЦАВЭ и терапией КГС спустя час после эмболии; (г) – очаг геморрагического инсульта у животного из группы с ЦАВЭ и терапией КГС спустя 2 часа после эмболии.

Fig. 2. Histological images of frontal brain slices, 24 hours after CAE. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 100$. (a) – ischemic stroke foci in an animal with CAE; (б) – brain of an animal with CAE and HOM therapy immediately after CAE; (в) – brain of an animal with CAE and HOM therapy one hour after CAE; (г) – hemorrhagic stroke foci in an animal with CAE and HOM therapy 2 hours after CAE.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У бодрствующих крыс нами была смоделирована церебральная артериальная воздушная эмболия путем введения пузырька воздуха в сонную мозговую артерию. Моделирование ЦАВЭ сопровождалось снижением температуры тела, минутного объема дыхания и горизонтальной локомоторной активности через 24 часа. Стоит отметить, что у Рап и соавт. не наблюдалось изменения этих физиологических показателей при окклюзии средней мозговой артерии (Рап et al., 2011). Можно полагать, что, исключив действие наркоза, мы создали клинически и патофизиологически релевантную модель ЦАВЭ на грызунах.

При гистологии обнаруженные изменения в головном мозге у мышей без лечения соответствуют описанным изменениям на мышинных моделях и у человека в ранней фазе ишемического некроза. У животных с применением КГС сразу после ЦАВЭ или спустя 1 час после ЦАВЭ не было обнаружено изменений, соответственно, растворение воздушных эмболов прошло в фазе «терапевтического окна», во время которого должна проводиться реперфузия при инсульте (Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021). Вероятно, незамедлительное применение КГС после ЦАВЭ способствовало предотвращению коагуляции крови вокруг воздушного эмбола, чего не удалось бы избежать через 1 или 2 часа после

моделирования ЦАВЭ (Li et al., 2021). Применение КГС через 2 часа после ЦАВЭ провоцирует восстановление кровотока, что приводит к закономерной геморрагической трансформации очага ишемического инфаркта, что также описано у человека при реперфузии вне «терапевтического окна», вследствие некротических изменений сосудистой стенки в зоне инфаркта, что в результате приводит к большей смертности или инвалидизации (Randhawa et al., 2022).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интервальный ингаляционный сеанс подогретой КГС в первый час после моделирования ЦАВЭ предотвращает развитие физиологических нарушений, а также появление очагов ишемического повреждения головного мозга. Применение КГС спустя 2 часа после эмболизации, напротив, приводит к геморрагической трансформации инсульта и ухудшению состояния животных.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.А. Паликов, И.А. Дьяченко, А.Н. Мурашев, академик РАН В.М. Баранов – концепция и руководство работой; Н.Б. Павлов, А.М. Исмаилова, Р.Р. Амиров, А.В. Бервинова – проведение экспериментов; В.А. Паликов, И.А. Дьяченко, А.Н. Мурашев, Н.Б. Павлов, Р.Р. Амиров, А.Т. Логунов, академик РАН В.М. Баранов, Н.А. Бороздина – обсуждение результатов исследования; Н.А. Бороздина – написание и редактирование текста статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ РАБОТЫ

Авторы не получали финансовой поддержки для проведения исследования и публикации этой статьи.

УКАЗАНИЕ НА ОТСУТСТВИЕ ИЛИ НАЛИЧИЕ КОНФЛИКТА ИНТЕРЕСОВ

Автор А.Т. Логунов работает в ЗАО «Специальное Конструкторское бюро экспериментального оборудования при Институте медико-биологических проблем Российской Академии Наук». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены Институтской

биоэтической комиссией (протокол № 922/22 от 27.12.2022).

УКАЗАНИЕ НА ДОСТУПНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

Первичные данные могут быть получены при обращении на электронную почту корреспондирующего автора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. Клинические рекомендации – Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых – 2021-2022-2023. 2021. 168 с.
- Archer D.P., Walker A.M., McCann S.K., Moser J.J., Apireddy R.M. Anesthetic Neuroprotection in Experimental Stroke in Rodents: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology*. 2017. 126 (4): 653–665.
- Fakkert R.A., Karlas N., Schober P., Weber N. C., Preckel B., van Hulst R. A., Weenink R.P. Early hyperbaric oxygen therapy is associated with favorable outcome in patients with iatrogenic cerebral arterial gas embolism: systematic review and individual patient data meta-analysis of observational studies. *Critical Care*. 2023. 27 (1): 282.
- Li Z., Li G., Li Y., Chen Y., Li J., Chen H. Flow field around bubbles on formation of air embolism in small vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2021. 118(26):e2025406118.
- Pagel P.S., Krolkowski J.G., Shim Y.H., Venkatapuram S., Kersten J.R., Weihrauch D., Wartier D.C., Pratt P.F. Jr. Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo. *Anesth Analg*. 2007. 105 (3): 562–569.
- Palikov V.A., Pavlov N.B., Aмиров R.R., Ismailova A.M., Borozdina N.A., Palikova Y.A., Dyachenko I.A., Khokhlova O.N., Ponomareva T.I., Rykov V.A., Logunov A.T., Murashev A.N., Baranov V.M. Effect of a helium and oxygen mixture on physiological parameters of rats with cerebral arterial air embolism. *Frontiers in physiology*. 2024. 15: 1388331.
- Pan Y., Zhang H., Acharya A.B., Cruz-Flores S., Panne-ton W.M. The effect of heliox treatment in a rat model of focal transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2011. 497 (2): 144–147.
- Pan Y., Zhang H., VanDeripe D.R., Cruz-Flores S., Panne-ton W.M. Heliox and oxygen reduce infarct volume in a rat model of focal ischemia. *Exp Neurol*. 2007. 205 (2): 587–90.
- Randhawa A.S., Pariona-Vargas F., Starkman S., Sannossian N., Liebeskind D. S., Avila G., Stratton S.,

- Gornbein J., Sharma L., Restrepo-Jimenez L., Valdes-Sueiras M., Kim-Tenser M., Villablanca P., Conwit R., Hamilton S., Saver J.L. Beyond the Golden Hour: Treating Acute Stroke in the Platinum 30 Minutes. *Stroke*. 2022. 53 (8): 2426–2434.
- Wang Q., Zhang X., Suo Y., Chen Z., Wu M., Wen X., Lai Q., Yin X., Bao B. Normobaric hyperoxia therapy in acute ischemic stroke: A literature review. *Heliyon*. 2023. 10 (1): e23744.
- Zhong W., Cheng J., Yang X., Liu W., Li Y. Heliox Preconditioning Exerts Neuroprotective Effects on Neonatal Ischemia/Hypoxia Injury by Inhibiting Necroptosis Induced by Ca²⁺ Elevation. *Transl Stroke Res*. 2023. 14 (3): 409–424.

INTERVAL INHALATION APPLICATION OF AN OXYGEN-HELIUM MIXTURE REVERSES THE EFFECTS OF CEREBRAL ARTERIAL AIR EMBOLISM

**V. A. Palikov^{a, b}, N. B. Pavlov^a, A. M. Ismailova^b, R. R. Amirov^a, I. A. Dyachenko^b,
N. A. Borozdina^b, A. V. Bervinova^b, A. T. Logunov^c, A. N. Murashev^b, V. M. Baranov^{a, #}**

^a*Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

^c*Closed joint stock company «Specialized Design Bureau of Experimental Equipment at the Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences», Khimki, Russia*

[#]*e-mail: baranov-vm@mail.ru*

Oxygen-helium mixture demonstrates marked efficacy of helium mixtures in animal models of ischemia/reperfusion, which opens the possibility of its use as an emergency measure for therapy of vascular embolism. We modelled cerebral arterial air embolism by injecting an air bubble into the internal carotid artery of awake rats. Inhalation of a heated oxygen-helium mixture immediately after modelling arterial embolism normalizes physiological abnormalities and prevents ischemic brain damage, whereas application of a heated oxygen-helium mixture 2 hours after modelling arterial embolism significantly worsens the condition of the animals.

Keywords: helium-oxygen mixture (HOM), cerebral arterial air embolism (CAE), cerebral ischemia, SD rats