
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

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

II. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИШЕМИЧЕСКИХ ОЧАГОВ

© 2025 г. Г. Ф. Закирова¹, К. А. Чернова¹, Г. Ф. Шаймарданова²,
Р. Н. Хазипов^{1,3,*}, А. В. Захаров^{1,4}

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

³Aix-Marseille University, INMED, INSERM, Marseille, France

⁴Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

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

Поступила в редакцию 11.09.2024 г.

После доработки 13.10.2024 г.

Принята к публикации 17.10.2024 г.

В настоящей работе исследовались нейропротекторные эффекты локальной терапевтической гипотермии (ЛТГ) в модели фокальной ишемии, вызываемой эпипиальной аппликацией эндотелина-1 в область соматосенсорной коры головного мозга крыс по морфометрическому анализу ишемических очагов, формирующихся по прошествии 3 ч после аппликации эндотелина-1. Размеры ишемических очагов измерялись в серийных коронарных срезах мозга после окраски 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (TTC). Было обнаружено, что охлаждение поверхности коры до 28°C с помощью субдурального элемента Пельтье с задержкой 0, 10 и 60 мин после аппликации эндотелина-1 вызывает значительное уменьшение размера ишемических очагов по сравнению с нормотермическими условиями. Нейропротекторные эффекты ЛТГ обратно коррелировали с задержкой начала ЛТГ от времени аппликации эндотелина-1 и были наиболее выражены при ЛТГ, начатой с минимальной (0 и 10 мин) задержкой после аппликации эндотелина-1. Также было обнаружено, что размер ишемического очага достоверно коррелирует со степенью подавления электрической активности, которая анализировалась в параллельной работе. В совокупности результаты морфологического и электрофизиологического анализа указывают на выраженные нейропротекторные эффекты поверхностной ЛТГ, особенно значительные при минимальной задержке ЛТГ после начала ишемического процесса, в модели фокальной ишемии, вызываемой эндотелином-1 в коре головного мозга крыс.

Ключевые слова: инсульт, ишемия головного мозга, ишемический очаг, морфометрия, нейропротекция, гипотермия

DOI: 10.31857/S0869813925010068, **EDN:** UKGXGI

ВВЕДЕНИЕ

Локальная терапевтическая гипотермия (ЛТГ) является перспективным методом для лечения ишемического поражения головного мозга. Исследования в клинике у пациентов с ишемическим инсультом и в различных моделях ишемии коры головного мозга у экспериментальных животных показали высокоеэффективное нейропротекторное действие ЛТГ на ранних сроках развития ишемического процесса, а также при реинфузии [1–5]. В то же время временной профиль нейропротекторных эффектов ЛТГ при ишемии коры головного мозга остается слабо детализированным, что является важным, учитывая значимость задержки между началом ишемической атаки и началом эффективной ЛТГ. Кроме того, остается малоизученным вопрос о том, как ЛТГ влияет на вызываемые ишемией функциональные дефициты и морфологическое поражение ткани мозга и на то, как эти морфофункциональные дефициты коррелируют друг с другом. В параллельном исследовании нами была описана экспериментальная модель фокальной ишемии, вызываемой в коре головного мозга крыс при эпипиальном аппликации эндотелина-1, и представлены результаты функционального анализа нейропротекторных эффектов ЛТГ в этой модели. В частности, было показано, что, судя по степени функциональных нарушений электрической активности коры головного мозга, ЛТГ оказывает выраженный нейропротекторный эффект в данной модели. В настоящей работе нами были проанализированы размеры ишемических очагов, формирующихся по прошествии 3 ч после аппликации эндотелина-1, в различных режимах ЛТГ. Для морфометрического анализа ишемических очагов нами была использована окраска 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТС), который является маркером метаболической функции клеток и служит надежным индикатором очагов поражения в экспериментальных моделях ишемии [6–9]. Кроме этого, на основании полученных в этих двух исследованиях данных нами был проведен корреляционный анализ морфофункциональных параметров ишемического поражения и охарактеризованы нейропротекторные эффекты ЛТГ с различными задержками после аппликации ЭТ1 в едином морфофункциональном пространстве.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная модель подробно описана в параллельной статье. Вкратце эксперименты проводились на крысах породы Wistar обоих полов в возрасте 1,5–2 месяцев под уретановым наркозом (1,25 г/кг, внутрибрюшинно). Для ЛТГ использовалась U-образная металлическая пластина с элементом Пельтье [10, 11], которая располагалась эпидурально и зашивалась агаром (4%-ный раствор), покрывая пластину и всю область краниотомии. Температура пластины поддерживалась с помощью элемента Пельтье на уровне 39°C в контроле и 28°C во время охлаждения. ЭТ1 (1 мкМ) апплицировался эпипиально на поверхность коры с помощью микроИнъектора под слой агара (9 мкл в течение 2 мин), а температуру либо поддерживали без изменений на уровне 39°C до конца эксперимента (группа нормотермия, НТ), либо снижали до 28°C в момент аппликации ЭТ1 (группа гипотермия – 0°, ГТ-0°) или с задержкой 10 или 60 мин (группы гипотермия – 10°, ГТ-10° и гипотермия – 60°, ГТ-60°).

Гистологический анализ

По прошествии 3 ч после аппликации ЭТ1 крысы подвергались эвтаназии сверхдозой уретана (4 г/кг). Головной мозг извлекался, помещался в ледяной (2–5°C) раствор следующего состава (в мМ): глюконат калия 140, глюконат натрия 15, NaCl 4, EGTA 0,2, D-AP5 50 мкМ и HEPES 10 (pH 7,4). С помощью вибратора Leica VT 1000 (Leica Biosystems, IL, США) мозг нарезался на серийные коронарные срезы толщиной 0,4 мм. Срезы мозга окрашивали 1%-ным раствором 2,3,5-трифенилтетразолий хлори-

дом (TTC; Sigma-Aldrich, Австрия) в фосфатном буферном растворе (PBS) в течение 2–3 мин при 38°C. Затем срезы промывали в PBS (в течение 1 мин, 3 раза). Микрофотографии срезов, окрашенных TTC, получали с помощью широкогоугольного стереомикроскопа SZX16, оснащенного объективом SDF PLAPO 1 × PF и светодиодной базой проходящего света SZX2-ILLT (Olympus, Токио, Япония). Изображения получали с увеличением $0.7 \times - 1 \times$ с помощью камеры XC50 CCD (Olympus, Токио, Япония) при разрешении 2576×1932 пикселей.

Расчет объема вызванного ишемией очага в серийных срезах был выполнен с помощью программы ImageJ (NIH, США). Фотографии срезов были контрастированы с применением настройки «Brightness/Contrast», что позволяет выделять границы очага. Масштаб для вычислений задавался согласно шкале на фотографиях. Для вычисления объема ишемического очага на контрастированных фотографиях очагов границы повреждения определялись визуально как белые участки ткани, которые не подверглись окрашиванию TTC, и очерчивались вручную с помощью инструмента «freehand selection». Далее автоматически рассчитывалась относительная площадь повреждения в пикселях и конвертировалась в единицы площади (мм^2). Полученные абсолютные значения площади для каждого среза умножались на толщину среза и результаты суммировались для вычисления объема ишемического очага в мм^3 . Необходимо отметить, что в группе нормотермии расчет объема производился в среднем по 6–7 последовательным срезам, в группах ГТ – 0° и 10° по ~2, ГТ – 60° по ~4 срезам. Критерием включения последнего среза в анализ являлось отсутствие окрашивания TTC следующего среза.

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводился с использованием программных инструментов MATLAB Statistics. Для множественного сравнения выборок использовался тест Краскела–Уоллиса (функция *kruskalwallis*), апостериорная оценка достоверности различий между парами выборок производилась с помощью теста Данна. Степень отличия экспериментальных выборок от контрольного уровня оценивалась ранговым тестом Уилкоксона (функция *signrank*). Значимыми считали различия с уровнем вероятности $p < 0.05$. В качестве дополнительного критерия различимости выборок, соответствующих эффектам разных температурных режимов, вычисляли расстояние Махalanобиса между ними в двумерных пространствах (функция *mahal*). Корреляции рассчитывались как коэффициент корреляции Спирмена (функция *corr*). Объединенные данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентиляй, организованных в виде ромбов, горизонтальная диагональ которых обозначает медиану, верхний и нижний угол – 75-й и 25-й квартили соответственно. Вертикальными линиями обозначены пределы выборки, вычисляемые через значения трех квартилей: $Q3 + 1.5*(Q3 - Q1)$ и $Q1 - 1.5*(Q3 - Q1)$.

Электрофизиология

Для оценки уровня функциональной активности измеряли электрическую активность коры мозга животных (см. часть 1). Вкратце записывали внеклеточные электрические сигналы с помощью 16-канальной линейной матрицы иридевых электродов на кремниевой подложке (Neurapexus, США). Электроды вводили до глубины 1.6–1.8 мм перпендикулярно поверхности бочонковой коры, которая получает сенсорный вход от лицевых вибрисс. В качестве основных маркеров изменения функциональной активности рассматривали множественные потенциалы действия (МПД), параметры сенсорно-вызванных потенциалов (СВП) и мощности спонтанных осцилляций потенциала в различных диапазонах. Детекция МПД осуществлялась на исходных записях с частотой дискретизации 32 кГц, для чего сигналы фильтровались в диапазоне частот 300–5000 Гц. За потенциалы действия принимались отрицательно полярные события с амплитудой выше 4 стандартных отклонений. Мощность ЛПП рассчитывалась как средняя спектральная мощ-

ность сигнала в следующих диапазонах частот: дельта (0.5–4 Гц), тета (4–7 Гц), альфа (7–15 Гц), бета (15–30 Гц), гамма (30–90 Гц), быстрая гамма (90–200 Гц) и сверхбыстрая гамма (200–500 Гц). Количество отдельных потенциалов действия во время сенсорно-вызванного потенциала (СВП) было подсчитано в отрезке 0–30 мс от начала СВП. При анализе параметров вызванной и спонтанной электрической активности после 3 ч действия ЭТ1 производили нормирование значений относительно контрольных уровней, которые вычисляли как медианы в 15-минутном отрезке до начала воздействия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной статье представлены результаты морфометрического анализа ишемических очагов, сформировавшихся по прошествии 3 ч после аппликации ЭТ1 в нормотермических условиях и при применении ЛТГ с различной задержкой после аппликации ЭТ1. Нейропротекторные эффекты ЛТГ оценивались по размерам ишемических очагов, формирующихся под действием ЭТ1. Также был проведен корреляционный анализ между размерами ишемических очагов и степенью подавления электрической активности в ишемических очагах, которые описаны в сопутствующей статье, в зависимости от начала применения ЛТГ.

Примеры серийных коронаральных срезов мозга из области ишемического повреждения, сформировавшегося после 3 ч действия ЭТ1 в условиях нормотермии (39°C) и при локальном охлаждении поверхности мозга до температуры 28°C, начатом одновременно, через 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1, представлены на рис. 1. Поскольку ТТС окрашивает в красный цвет только жизнеспособные участки мозга, в которых сохранились функционально активные митохондрии, в ишемических очагах окраска ТТС отсутствовала. Как следует из представленных примеров, как количество срезов, на которых выявлялись слабо окрашенные ТТС ишемические очаги, так и размеры очагов были значительно меньше при применении ЛТГ по сравнению с нормотермическими условиями, в особенности при ЛТГ, начатой с короткой задержкой после аппликации ЭТ1 (0 и 10 мин). В соответствии с результатами предыдущих исследований [9] характерным свойством ишемических очагов, формирующихся при эпипиальной аппликации ЭТ1, было наличие вертикального градиента повреждения, выражющееся в уменьшении степени подавления электрической активности в глубине коры по сравнению с поверхностью. Так, ишемические очаги имели коническую форму с обширным основанием и более узкой вершиной, направленной вглубь коры (рис. 1 и рис. 3, 4). Следует отметить, что для нормотермической группы и группы ГТ-60', в которой ЛТГ применялась через 1 ч после аппликации ЭТ1, было характерно наличие мозговой грыжи, что свидетельствовало о глубокой степени ишемического повреждения в этих группах с развитием тканевого отека.

Количественный морфометрический анализ размеров очагов выявил значительные отличия между экспериментальными группами (рис. 2, а). Так, в группе нормотермии объем ишемического очага составил 3.09 [2.84–6.57] мм^3 ($n = 5$), в то время как в группах с ЛТГ объемы очагов были значительно меньше и составили 0.34 [0.13–0.70] мм^3 ($n = 5$), 0.08 [0.04–0.15] мм^3 ($n = 5$) и 0.93 [0.18–1.56] мм^3 ($n = 6$) для ЛТГ, начатой через 0, 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1 соответственно (рис. 2, а). Помимо этого, была проанализирована зависимость объемов ишемических очагов от задержки охлаждения коры относительно аппликации ЭТ1. Учитывая 3-часовую длительность экспозиции к ЭТ1, которая заканчивалась эвтаназией животного и приготовлением срезов мозга для ТТС-окраски во всех экспериментальных группах, в данном анализе условию нормотермии было придано значение времени 180 мин задержки гипотермии от начала аппликации ЭТ1. В результате этого анализа было обнаружено, что объем ишемического очага значительно увеличивается с увеличением временной задержки начала применения ЛТГ от аппликации ЭТ1 (рис. 2, б).

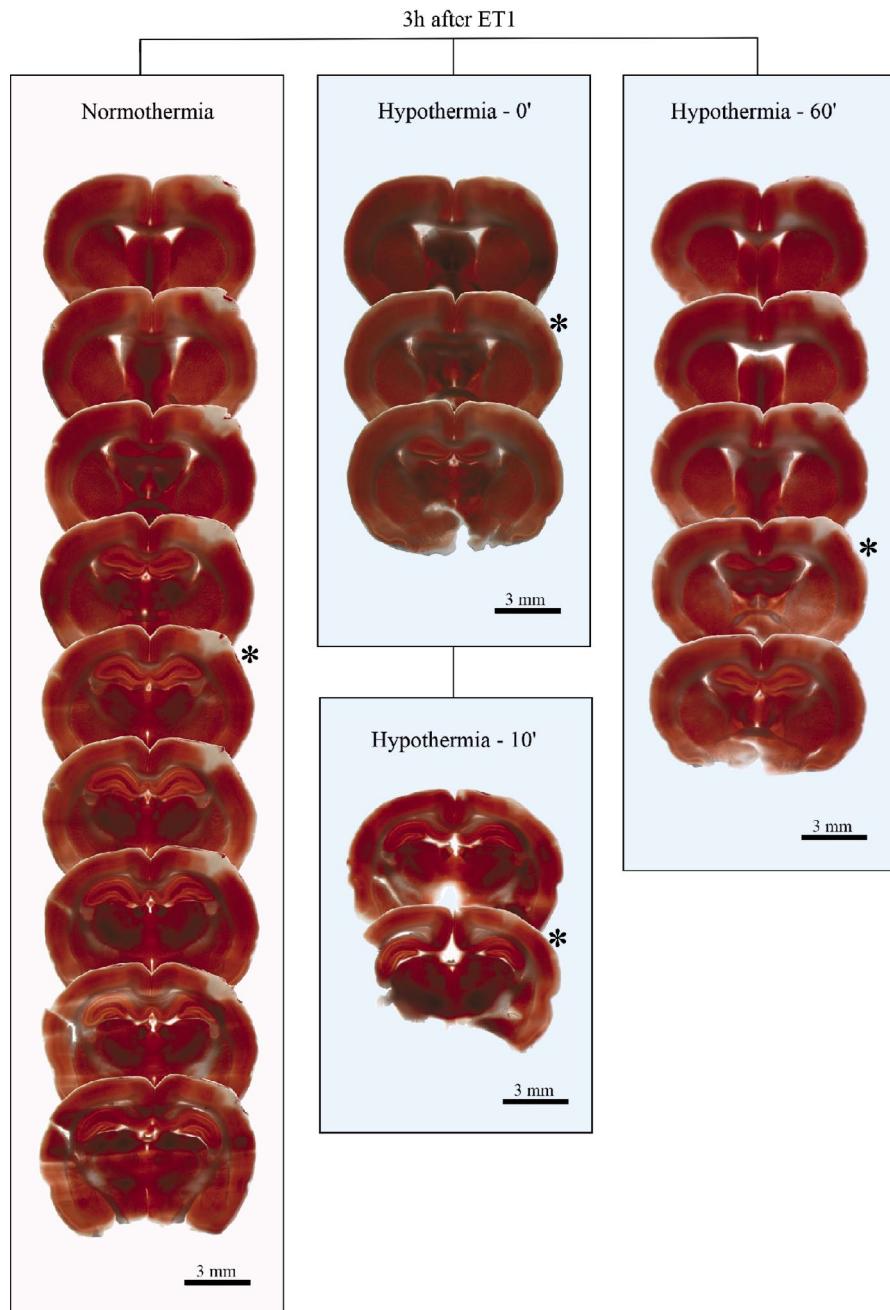


Рис. 1. Ишемические очаги, формирующиеся под действием ЭТ1, при нормотермии и ЛТГ. Серия последовательных коронарных срезов мозга с областью ишемического повреждения, сформировавшегося после 3 ч действия ЭТ1 у животных из 4 экспериментальных групп: в условиях нормотермии (39°C) и при локальном поверхностном охлаждении коры до 28°C , началом одновременно, через 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1. Срезы окрашены TTC (окрашенная живая ткань имеет красный цвет, а неокрашенные участки ишемического повреждения – белого цвета) и расположены в ростро-каудальном направлении. Толщина срезов 400 мкм. * указаны срезы, в которых проводилась регистрация электрической активности (представлены на большом увеличении на рис. 3).

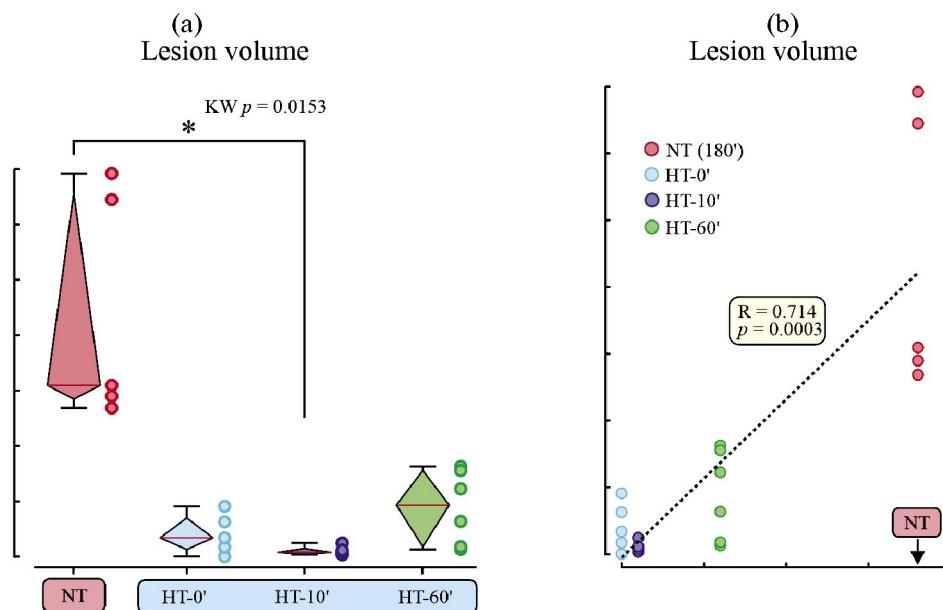


Рис. 2. Влияние локальной гипотермии на объем ишемического очага, вызванного ЭТ1. (а) – объем ишемических очагов, формирующихся по прошествии 3 ч после аппликации ЭТ1 (1 мкМ) в условиях нормотермии (39°C) и при поверхностном локальном охлаждении до температуры 28°C, начатом одновременно, через 10 мин и через 1 ч после аппликации ЭТ1. Над боксами указаны вероятности статистических различий между группами по тесту Краскела–Уоллиса (KW p); достоверные различия между группами выявлены по тесту Данна (звездочка); (б) – корреляция объемов ишемических очагов от времени начала охлаждения. Нормотермические эксперименты учтены с временем задержки 180 мин. Черной пунктирной линией показана линейная аппроксимация. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

Поскольку помимо морфологического анализа в рамках данного исследования также проводился анализ функциональных нарушений в ишемических очагах по параметрам электрической активности, представляло интерес исследовать корреляцию между морфологическими и функциональными характеристиками ишемического повреждения, а также охарактеризовать нейропротекторные эффекты ЛТГ в пространстве интегральных морфофункциональных метрик повреждения. В качестве морфологической метрики ишемического очага в данном анализе было решено взять площадь ишемического очага в срезах того участка мозга, в котором проводилась регистрация электрической активности. Поскольку электроды располагались в центре той области, на поверхность которой апплицировался ЭТ1, размеры ишемических очагов в этих срезах были максимальными. Примеры таких ишемических очагов у животных из 4 экспериментальных групп представлены на рис. 3, а групповые данные в виде кумулятивных гистограмм очагов, полученных путем наложения контуров очагов у всех животных каждой группы, представлены на рис. 4, а. Анализ площади ишемических очагов в данных срезах показал, что в группах с применением ЛТГ площадь очага значительно меньше по сравнению с нормотермической группой (рис. 4, б). Так, в группе нормотермии площадь ишемического повреждения составила 1.55 [1.46–2.20] мм², в группе ГТ-0° – 0.43 [0.38–0.95] мм², ГТ-10° – 0.37 [0.19–0.42] мм² и в группе ГТ-60° – 1.11 [0.99–1.28] мм². Анализ зависимости площади ишемических очагов от задержки ЛТГ также выявил значительное увеличение площади ишемического очага с увеличением временной задержки начала применения ЛТГ от аппликации ЭТ1 (рис. 4, с), что

полностью согласуется с результатами аналогичного анализа объемов ишемических очагов, представленных на рис. 2, б.

Результаты морфометрического анализа ишемических очагов, представленного в настоящей работе, и функциональных дефицитов, выявленных путем регистрации электрической активности и представленных в сопутствующей работе, позволили охарактеризовать зависимость интегрального морфофункционального ишемического повреждения от времени задержки начала ЛТГ после аппликации ЭТ1. В качестве морфологической метрики в данном анализе использовалась площадь ишемических очагов в области регистрации, а в качестве функциональных метрик были выбраны наиболее значимые маркеры поражения в ишемическом очаге, обнаруженные по прошествии 3 ч после аппликации ЭТ1. Эти функциональные метрики включали степень подавления суммарной частоты спонтанных множественных потенциалов действия (МПД) по всем слоям коры (рис. 5, а), амплитуды сенсорно-вызванных потенциалов (СВП, рис. 5, б) и частоты сенсорно-вызванных МПД (рис. 5, с), а также мощности осцилляций в тета- (4–7 Гц), альфа- (7–15 Гц) и бета- (15–30 Гц) частотных диапазонах (рис. 5, д). Полученные морфофункциональные метрики были далее сгруппированы в кластеры соответственно задержкам ЛТГ после аппликации ЭТ1. Эти кластеры представлены на рис. 5 со следующим цветовым кодированием: нормотермия (без ЛТГ) – красный кластер, ЛТГ с задержкой 0 мин – голубой кластер, ЛТГ с задержкой 10 мин – синий кластер, ЛТГ с задержкой 60 мин – зеленый кластер. В метриках морфофункциональных пространств, представленных на рис. 5, случаи с наиболее

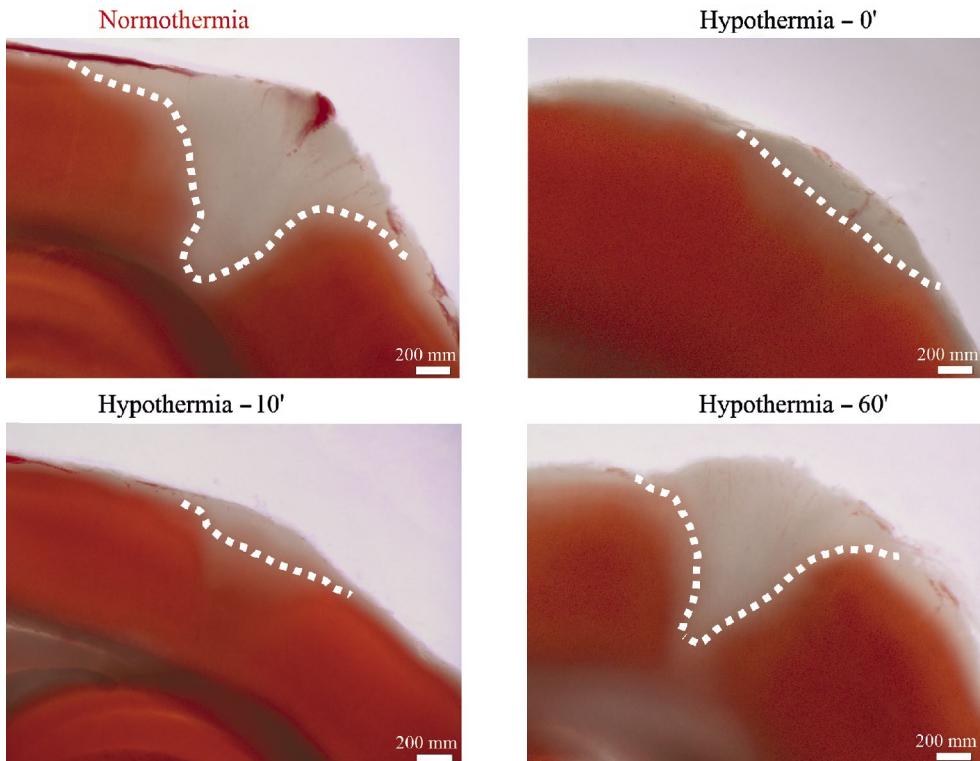


Рис. 3. Примеры ишемических очагов, вызванных аппликацией ЭТ1, при нормотермии и ЛТГ в области регистрации электрической активности. Срезы, отмеченные * на рис. 1, на большом увеличении для примеров из 4 экспериментальных групп. Границы ишемических очагов обведены белой пунктирной линией.

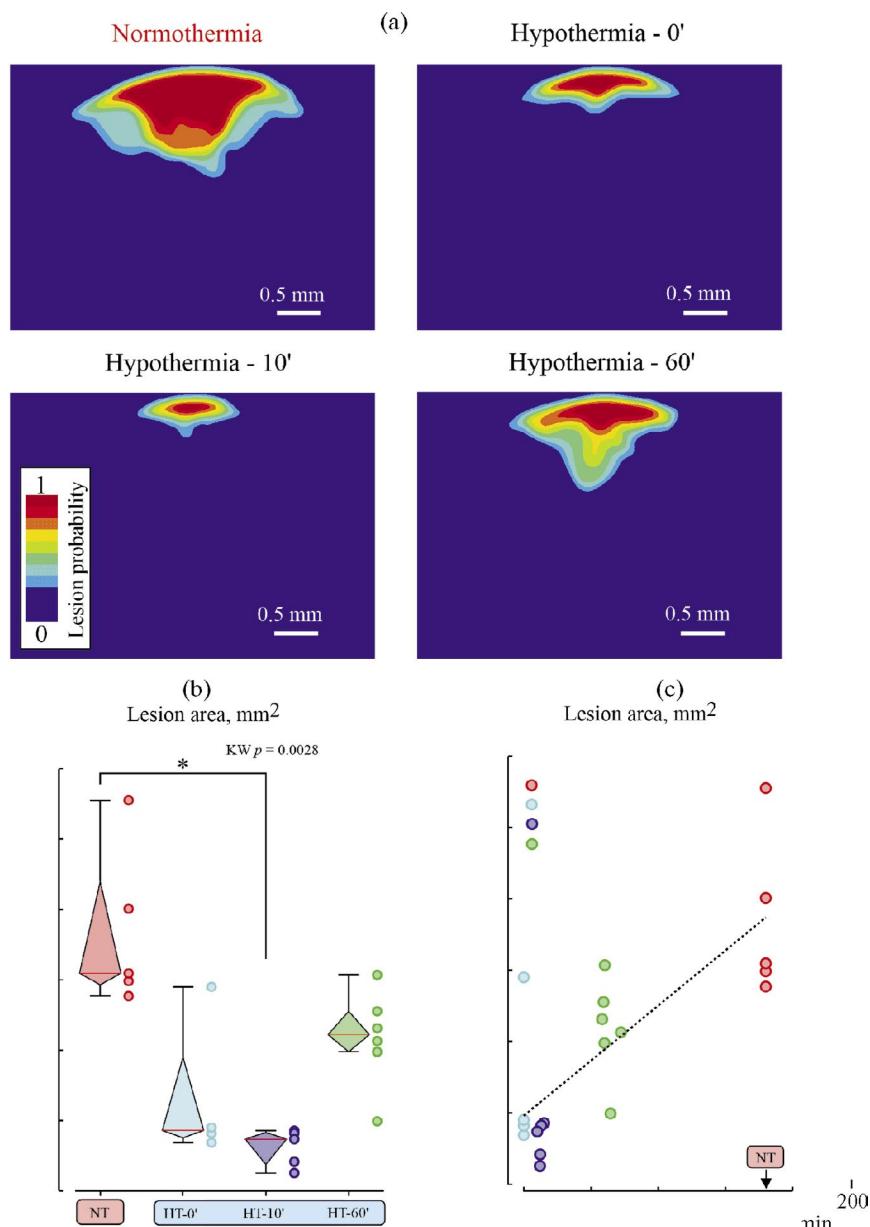


Рис. 4. Влияние локальной гипотермии на площадь ишемического очага, вызванного ЭТ1, в области регистрации электрической активности. (а) – кумулятивное изображение ишемического повреждения, полученное путем наложения контуров очагов из отдельных экспериментов для групп нормо- и гипотермии. Цветовая шкала отражает вероятность повреждения (lesion probability); (б) – зависимость площади очага на срезе из области регистрации активности от условий нормо- и гипотермии. Над боксами указаны вероятности статистических различий между группами по тесту Краскела–Уоллса (KW p); достоверные различия между группами выявлены по тесту Данна (звездочка); (в) – график зависимости площади ишемического поражения в срезах из области регистрации от времени начала ЛТГ после аппликации ЭТ1. Нормотермические эксперименты учтены с временем задержки ЛТГ 180 мин. Черной пунктирной линией показана линейная аппроксимация. В рамке показан коэффициент корреляции Спирмена и соответствующий уровень достоверности. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

тяжелым морфофункциональным повреждением располагаются в верхнем левом углу, а случаи с наименьшим повреждением – в нижнем правом углу. Для оценки степени удаленности кластеров друг от друга рассчитывалось расстояние Махalanобиса, и результаты значений этого параметра для сравнений между всеми кластерами представлены на рис. 5. В соответствии с результатами отдельного морфометрического и функционального анализа, представленными выше и в сопутствующей статье, было обнаружено, что наибольшее морфофункциональное повреждение наблюдалось в кластере нормотермии, в которой ЛТГ не применялась вовсе, в то время как в кластерах с ЛТГ морфофункциональное повреждение было менее выражено. При этом кластеры с минимальной задержкой ЛТГ (0 и 10 мин) были наиболее удалены от кластера нормотермии, что свидетельствует о наибольшей нейропротекторной эффективности ЛТГ, начатой с минимальной задержкой после аппликации ЭТ1.

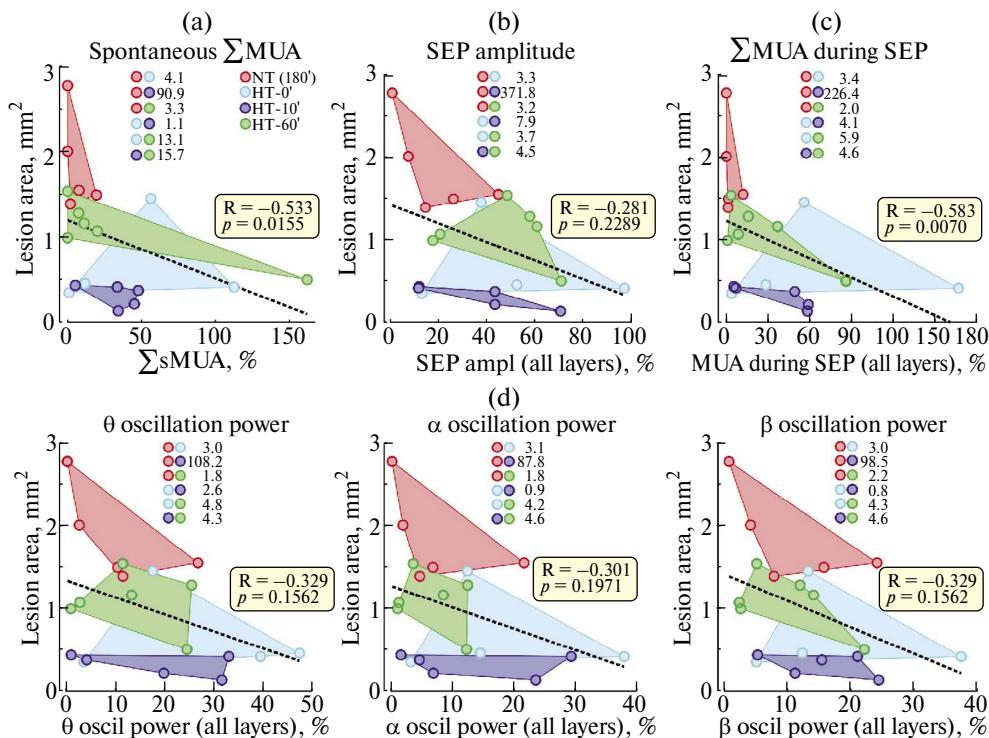


Рис. 5. Кластерный анализ морфофункциональных метрик ишемического повреждения, вызванного ЭТ1 в различных температурных режимах. Графики зависимости площади ишемического очага в срезах из участка регистрации электрической активности от степени подавления различных параметров электрической активности в ишемическом очаге: (а) – суммарной частоты спонтанных МПД по всем слоям коры; (б) – амплитуды СВП; (с) – частоты сенсорно-вызванных МПД; (д) – мощности осцилляций в тета- (4–7 Гц), альфа- (7–15 Гц) и бета- (15–30 Гц) частотных диапазонах. Каждая точка соответствует одному животному. Точки объединены кластеры в соответствии с задержкой ЛТГ после аппликации ЭТ1: нормотермия (без ЛТГ) – красный кластер, ЛТГ с задержкой 0 мин – голубой кластер, ЛТГ с задержкой 10 мин – синий кластер, ЛТГ с задержкой 60 мин – зеленый кластер. Столбцы вверху в центре указывают значения расстояний Махalanобиса между соответствующими кластерами и характеризуют степень удаленности кластеров друг от друга. Чёрная пунктирная линия показывает линейную регрессию для данных, полученных в ЭТ1-модели ишемии без контроля температуры [9]. NT – нормотермия, HT – гипотермия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным выводом настоящего исследования является демонстрация высокой эффективности ЛТГ в нейропротекции коры головного мозга от ишемического повреждения, вызванного ЭТ1. Этот вывод следует из меньшего размера ишемических очагов и меньшей степени функциональных нарушений, вызываемых ЭТ1, при применении ЛТГ. Наиболее значительный нейропротекторный эффект ЛТГ был обнаружен при раннем начале применения ЛТГ после аппликации ЭТ1 – либо одновременно, либо с задержкой в 10 мин от времени аппликации ЭТ1. Нейропротекторные эффекты ранней гипотермии, обнаруженные в настоящем исследовании, в целом согласуются с результатами, полученными в других моделях ишемического инсульта [12, 13]. Оригинальностью настоящего исследования является комплексный анализ нейропротекторных эффектов ЛТГ, который позволил охарактеризовать как морфологические, так и функциональные метрики ишемического повреждения. Среди этих метрик есть, в частности, такие клинически доступные параметры, как мощность ЭЭГ осцилляций и сенсорно-вызванные ответы, которые могут быть полезным инструментом для функционального мониторинга развития ишемического повреждения в исследованиях по применению ЛТГ при ишемических инсультах в других моделях, а также в клинических исследованиях. Во-вторых, новизной нашего исследования является более детализированный временной профиль нейропротекторной эффективности ЛТГ в стандартной модели ишемии в клинически релевантных диапазонах задержек применения ЛТГ от начала ишемического инсульта. Эта временная детализация является весьма значимой, поскольку локальное охлаждение пораженного ишемией участка коры головного мозга является не только весьма эффективным, но, возможно, единственным доступным способом для нейропротекции и продления периода «золотого часа» при инсульте при ведении пациента во временном отрезке, предшествующем устраниению причины ишемического инсульта (удаление тромба) [14]. Практическому внедрению ЛТГ, однако, должны предшествовать доклинические исследования, которые должны охарактеризовать временной профиль и оптимальные температурные режимы ЛТГ в различных моделях ишемии, в том числе у более крупных животных с более приближенной к человеку толщиной черепа и структурой мозга, у которых, возможно, потребуется использование более низких температур для эффективного охлаждения ткани мозга. Кроме того, в то время как в настоящей работе были показаны нейропротекторные эффекты ЛТГ в острой фазе ишемии с временным ограничением в 3 ч после начала инсульта, представляет интерес исследование долговременных нейропротекторных эффектов ЛТГ по предотвращению поведенческих и неврологических дефицитов, а также изучение ЛТГ на предмет возможных нежелательных побочных эффектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cheng H, Shi J, Zhang Q, Yin H, Wang L (2006) Epidural cooling for selective brain hypothermia in porcine model. *Acta Neurochir (Wien)* 148: 559–564.
<https://doi.org/10.1007/s00701-006-0735-3>
- Noguchi Y, Nishio S, Kawauchi M, Asari S, Ohmoto T (2002) A new method of inducing selective brain hypothermia with saline perfusion in the subdural space: effects on transient cerebral ischemia in cats. *Acta Med Okayama* 56: 279–286.
<https://doi.org/10.18926/AMO/31690>
- Straus D, Prasad V, Munoz L (2011) Selective therapeutic hypothermia: a review of invasive and noninvasive techniques. *Arg Neuropsiquiatr* 69(6): 981–987.
<https://doi.org/10.1590/s0004-282x2011000700025>. PMID: 22297891
- Hong JM, Choi ES, Park SY (2022) Selective Brain Cooling: A New Horizon of Neuroprotection. *Front Neurol* 13: 873165.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.873165>
- Lee H, Ding Y (2020) Temporal limits of therapeutic hypothermia onset in clinical trials for acute ischemic stroke: How early is early enough? *Brain Circ* 6(3): 139–144.
https://doi.org/10.4103/bc.bc_31_20
- Ye J, Shang H, Du H, Cao Y, Hua L, Zhu F, Liu W, Wang Y, Chen S, Qiu Z, Shen H (2022) An optimal animal model of ischemic stroke established by digital subtraction angiography-guided autologous thrombi in cynomolgus monkeys. *Front Neurol* 13: 864954
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.864954>
- Sanchez-Bezanilla S, Nilsson M, Walker FR, Ong LK (2019) Can We Use 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride-stained brain slices for other purposes? The application of western blotting. *Front Mol Neurosci* 30(12): 181.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00181>
- Juzekaeva E, Nasretdinov A, Gainutdinov A, Sintsov M, Mukhtarov M, Khazipov R (2017) Preferential initiation and spread of anoxic depolarization in layer 4 of rat barrel cortex. *Front Cell Neurosci* 11: 390.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00390>
- Vinokurova D, Zakharov A, Chernova K, Burkhanova-Zakirova G, Horst V, Lemale CL, Dreier JP, Khazipov R (2022) Depth-profile of impairments in endothelin-1 – induced focal cortical ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 42(10): 1944–1960.
<https://doi.org/10.1177/0271678X221107422>
- Sherozya M, Timofeev I (2015) Moderate cortical cooling eliminates thalamocortical silent states during slow oscillation. *J Neurosci* 35: 13006–13019.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-15.2015>
- Burkhanova G, Chernova K, Khazipov R, Sherozya M (2020) Effects of cortical cooling on activity across layers of the rat barrel cortex. *Front Syst Neurosci* 14: 52.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.00052>
- Van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR (2007) Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain* 130(Pt 12): 3063–3074.
<https://doi.org/10.1093/brain/awm083>
- He Y, Fujii M, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, Oka F, Shirao S, Owada Y, Kida H, Kunitsugu I, Yamakawa T, Tokiwa T, Yamakawa T, Suzuki M (2013) Neuroprotective effects of focal brain cooling on photochemically-induced cerebral infarction in rats: analysis from a neurophysiological perspective. *Brain Res* 1497: 53–60.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.041>
- Al-Ajlan FS, Alkhiri A, Alamri AF, Alghamdi BA, Almaghrabi AA, Alharbi AR, Alansari N, Almilbary AZ, Hussain MS, Audebert PJ, Grotta JC, Shuaib A, Saver JL, Alhazzani A (2024) Golden hour intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Ann Neurol* 96: 582–590.
<https://doi.org/10.1002/ana.27007>

Neuroprotective Effects of Local Surface Hypothermia during Endothelin-1-Induced Focal Ischemia in Rat Cerebral Cortex. II. Morphometric Analysis of Ischemic Lesions

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

^a*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^b*Kazan Scientific Centre of RAS, Kazan, Russia*

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

^d*Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

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

In the present study, we investigated the neuroprotective effects of local therapeutic hypothermia (LTH) in a model of focal ischemia induced by epipial application of Endothelin-1 to the somatosensory cortex of the rat brain by morphometric analysis of ischemic foci formed 3 hours after Endothelin-1 application. The size of ischemic foci was measured in serial coronal brain slices after staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). It was found that cooling the cortical surface to 28°C using a subdural Peltier element at 0, 10 and 60 minutes delay after Endothelin-1 application, caused a significant reduction in the size of ischemic focus compared to normothermic conditions. The neuroprotective effects of LTH were inversely correlated with the delay of LTH onset from the time of Endothelin-1 application and were most pronounced with LTH initiated with the shortest (0 and 10 minutes) delay after Endothelin-1 application. The size of the ischemic focus was also found to correlate significantly with the degree of electrical activity suppression analyzed in parallel paper. Taken together, the results of morphological and electrophysiological analysis indicate pronounced neuroprotective effects of surface LTH, particularly significant at minimal LTH latency after ischemic onset, in a model of Endothelin-1-induced focal ischemia in the rat cerebral cortex.

Keywords: stroke, cerebral ischemia, ischemic focus, morphometry, neuroprotection, hypothermia