

Исследование содержания NO и меди в печени крыс после формирования сочетанной травмы головного и спинного мозга методом ЭПР спектроскопии

© Л.В. Базан,¹ В.В. Андрианов,^{1,2} А.И. Арсланов,¹ Д.И. Силантьева,² Т.Х. Богодвид,^{2,3} Г.Г. Яфарова,^{1,2} И.Б. Дерябина,² Л.Н. Муранова,² А.В. Нагибов,⁴ В.М. Рубахова,⁴ Е.В. Федорова,⁴ Т.А. Филипович,⁴ В.А. Кульчицкий,⁴ Х.Л. Гайнутдинов^{1,2}

¹Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр РАН,

420029 Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет (Институт фундаментальной медицины и биологии), 420008 Казань, Россия

³Поволжский университет физической культуры, спорта и туризма, 420010 Казань, Россия

⁴Институт физиологии НАН Беларуси, Центр мозга, 220072 Минск, Беларусь

e-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступило в Редакцию 17 апреля 2024 г.

В окончательной редакции 22 июля 2024 г.

Принято к публикации 2 августа 2024 г.

Для регистрации содержания оксида азота (NO) и меди в тканях печени крыс после формирования сочетанной травмы головного и спинного мозга применен метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Использовали метод спиновой ловушки, регистрировали сигналы от комплексов (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO и Cu(ДЭТК)₂. На основе прямых измерений методом ЭПР спектроскопии показано, что через 7 суток после моделирования сочетанной травмы головного и спинного мозга происходит значительное (достоверное) снижение продукции NO в печени в два раза. Содержание меди в печени также снижалось, но недостоверно.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, спиновая ловушка, оксид азота, сочетанная травма головного и спинного мозга, печень.

DOI: 10.61011/JTF.2024.10.58872.132-24

Введение

Оксид азота (NO) является химически высокореактивным свободным радикалом, он выступает как в роли окислителя, так и в роли восстановителя в различных биохимических процессах [1,2]. Открытие способности клеток млекопитающих к синтезу NO стимулировало огромные усилия исследователей к изучению роли NO во всех областях биологии и медицины [2]. NO, как ключевая сигнальная молекула, участвует в регуляции многих физиологических функций организма, включая нервную систему [3]. NO широко распространен в нервной [4,5], сердечно-сосудистой [6,7] и других функциональных системах организма — в регуляции метаболизма, тонуса кровеносных сосудов, нейротрансмиссии, в обучении и в ряде других функций [3,8–10]. Помимо вазодилатирующих, а также нейротрансмиттерных и стресслимитирующих свойств, продемонстрировано вовлечение NO в реакции оксидантного стресса, глутамат-кальциевого каскада и воспаления [4,11,12].

Большой интерес вызывает участие NO в механизмах развития различных патологических состояний организ-

ма [13,14,15]. Существует множество доказательств того, что нарушение биосинтеза NO является ведущим фактором патофизиологической реакции мозга на гипоксию-ишемию [16,17,18]. Одной из причин вовлечения NO в патологический процесс служит длительная нехватка кислорода, которая ведет к гипоксии мозга [16,19]. Принципиально важно учитывать, что согласованное функционирование системы NO нарушается при развитии гипоксии и ишемии мозга [20,21,22]. Нарушение снабжения кислородом различных отделов мозга возникает также при тромбировании кровеносного сосуда или разрыве аневризмы, что часто завершается развитием ишемического или геморрагического инсульта [16]. В процессах, развивающихся в мозге при гипоксии-ишемии, вновь проявляется амбивалентная роль NO, который, согласно современным представлениям, способен выполнять как нейротоксические, так и нейропротекторные функции [18,22,23]. Появляется все больше свидетельств того, что NO играет важную нейропротекторную роль при инсульте, даже если NO обычно рассматривается как токсичный газ. Следовательно, нам необходимо диалектически относиться к NO, и дальней-

шие исследования, включая исследования на животных и клинические, могут дать новое представление о лечении инсульта и других заболеваний центральной нервной системы [11,21].

К настоящему времени участие окислительного стресса в молекулярно-клеточных механизмах патологических состояний мозга является общепринятым [24]. Окислительный стресс (ОС), возникающий под действием неблагоприятных экзогенных факторов, а также в результате активации эндогенных механизмов генерации активных форм кислорода и азота, ослабления антиоксидантной защиты организма, рассматривается в настоящее время как важное патогенетическое звено при возникновении и развитии многочисленных заболеваний [25,26]. ОС является результатом резкого усиления окислительных процессов в организме при недостаточном функционировании антиоксидантной системы [27,28]. Антиоксидантная защита человека сложна и выполняет задачу установления физиологически важного уровня активных форм кислорода (АФК) в клетке с возможностью функционирования клеточной передачи сигналов, в то же время минимизирует уровни АФК, чтобы не допустить окислительного повреждения [12]. Оценке уровня ОС уделяется большое внимание, так как участие механизмов ОС в патогенезе большого числа заболеваний можно объяснить универсальностью и ключевой ролью окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках организма как в нормальных условиях, так и при реализации типовых общепатологических процессов [24–26,28]. Кроме АФК, в развитии ОС активное участие принимают активные формы азота, прежде всего NO, а также металлы переменной валентности (Cu и Fe) [12,24,29–31].

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) относится к важнейшей проблеме здравоохранения и общества в любой стране. По количеству недожитых лет она оставляет далеко позади своих „конкурентов“ в молодом возрасте превышая летальность от сердечно-сосудистых заболеваний в 10 раз, от рака в — 20 раз. При этом почти в 60% случаев причина смерти — повреждения именно головного мозга [32,33]. „Среди всех причин смертности ЧМТ занимает одно из лидирующих мест. Частота встречаемости ЧМТ в среднем составляет 3–4 случая на 1 000 населения. Ежегодно в России ЧМТ получают около 600 000 человек, 50 000 из них погибают, а еще 50 000 становятся официальными инвалидами“ [34]. Понимание механизма повреждения при ЧМТ важно для разработки профилактических технологий и установления правил, например, в спорте, направленных на предотвращение последствий, которые могут привести к таким травмам. Человеческая изменчивость и невозможность непосредственно измерить эти механизмы повреждения привели к исследованию ЧМТ на моделях животных, физического и численного моделирования в попытке понять лежащую в основе травмы механику [35].

Случаи ЧМТ имеют большую распространенность по всему миру и сопровождаются высоким уровнем инвалидизации и нетрудоспособности. Признано, что самые высокие показатели количества случаев ЧМТ, как правило, наблюдаются в очень молодой возрастной группе (0–4 года), а также у подростков и молодых взрослых (15–24 года) [36,37]. К травме мозга относят повреждение головного мозга в результате воздействия внешней механической силы, которое может привести к временному или постоянному ухудшению состояния [38,39]. Для ЧМТ характерен спазм кровеносных сосудов, а также диффузное или очаговое повреждение ткани мозга [36,40]. Показано, что после первичной травмы наступает каскад развивающихся вторичных повреждений [35,37,40,41]. Имеются сведения, что в этих процессах NO играет важную и многогранную роль. Исследования свидетельствуют, что функциональная роль эндогенного NO в процессах, протекающих при повреждениях нервной системы, противоречива и недостаточно изучена [16,18,31,41–44]. Это обусловлено тем, что NO является примером классического двуликотого Януса [23,45]. Актуальность подобных работ состоит в том, чтобы решить социально значимые проблемы по повышению средней продолжительности жизни населения при геморрагических, ишемических инсультах, а также сочетанных травмах головного и спинного мозга.

Поэтому мы провели исследование содержания NO и меди в печени крыс при сочетанной травме головного и спинного мозга с применением метода ЭПР спектроскопии: оценка продукции NO — как показателя общего уровня продукции NO в организме, и содержания меди — как показателя содержания 1-й и 3-й субъединиц супероксиддисмутазы.

1. Методика эксперимента

1.1. Формирование сочетанной травмы головного и спинного мозга у крыс

Формирование сочетанной травмы головного и спинного мозга проводили в Центре мозга Института физиологии НАН Беларуси в Минске. Формирование травмы осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике (протокол №1 от 31.01.2019 г.; Ethic Committee Name: Ethics Commission of the Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk; Approval Code: Approval code E7/04/2023; Approval Date: dated January 31, 2019) Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск. Опыты проводили в светлое время суток на крысах самцах ($n = 20$), массой 200–400 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (с поддержанием 12/12-часового ритма освещения и темноты, температуры воздуха на уровне $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и стабильной приточно-вытяжной вентиляцией) при свободном доступе к воде и пище (*ad libitum*) и стандартном рационе питания

в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Сначала осуществляли травму головного мозга крысы в прецентральной области мозга слева (лобная доля). Затем наносили травму спинного мозга на уровне первого поясничного позвонка. Наркотизированных лабораторных крыс фиксировали на хирургическом столе в положении пронации с помощью растяжек на конечностях. Удаляли локально надкостницу в проекции прецентральной извилины, с помощью бор-машины, проводили трепанацию черепа и последующее локальное разрушение участка мозга стилетом в прецентральной области мозга слева (это занимает 3–4 min). На следующем этапе продолжали проводить операцию, но уже на уровне поясничного отдела спинного мозга. Погружали стилет в спинной мозг на уровне первого поясничного позвонка и отмечали в дневнике продолжительность кровотечения из раны после удаления стилета. Подробности метода описаны нами ранее [46]. Если рассматривать раны с позиции классической классификации [34,39], то это не сдавление, не ушиб и не сотрясение — по сути это проникающее ранение тканей головного и спинного мозга. Контрольная группа животных не подвергалась хирургическим вмешательствам. Все операционные процедуры проводили на наркотизированных животных (55.6 mg/kg кетамина, 5.5 mg/kg ксилазина, 1.1 mg/kg ацепромазина, внутривенно) [47]. Образцы печени извлекали через семь суток после операции ($n = 5$), столько же животных ($n = 5$) оставляли для оценки эффективности восстановления центрального контроля двигательных функций после операции. Также брали образцы тканей у интактных крыс ($n = 5$) — контрольная группа и 5 животных оставляли для оценки двигательных функций. Данные сроки были выбраны по двум причинам: с одной стороны, в проведенных ранее экспериментах с иммуногистохимическим окрашиванием при моделировании локального участка нейродеструкции в сенсомоторной зоне головного мозга и введения МСК в подслизистую область полости носа крыс было показано, что стволовые клетки перемещаются вдоль волокон *n. olfactorius* в центральные структуры обонятельного анализатора и распределяются в участках разрушения мозга в передней черепной ямке [48,49]. С другой стороны, это поведенческие эксперименты: было обнаружено, что периневральное введение МСК крысам в остром периоде ишемии головного мозга сопровождалось объективными признаками восстановления когнитивных и двигательных функций в течение 1 и 3 дней после операции, а на седьмой день после моделирования ишемии у крыс с введением МСК фактически не было отличительных особенностей в контроле двигательной активности по сравнению с дооперационным периодом у тех же крыс [50,51]. Биологический материал перевозили из Минска в Казань в дьюаре с жидким азотом, в котором хранили вплоть до измерений. В Минске оставалось 10 животных после осуществления травмы головного и спинного мозга, которых продолжали наблюдать в

течение месяца после начала эксперимента для оценки эффективности восстановления центрального контроля двигательных функций.

1.2. Определение оксида азота и меди методом ЭПР спектроскопии

Существует большое количество методов измерения продукции NO в биологических системах [52]. В последнее время одним из наиболее эффективных методов определения NO в биологических тканях является метод ЭПР [53–56]. Это произошло благодаря методике, разработанной А.Ф. Ваниным и др. [57], в которой они использовали так называемый метод спинового захвата. В 1984 г. Ванин с коллегами предложили использовать комплекс двухвалентного железа с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) в качестве ловушки для NO в клетках и тканях животных. Метод основан на формировании комплекса Fe^{2+} с ДЭТК для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$. Метод спинового захвата основан на реакции радикала (в данном случае NO) со спиновой ловушкой. Этим методом с применением данной спиновой ловушки регистрируется общий уровень NO в образце исследуемой ткани, т.е. сумма как свободного NO, так и его стабилизированных форм (например, *S*-нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа, и т.д.) [45,58]. Авторы для определения NO методом спиновых ловушек предложили применение сверхвысоких концентраций NO-ловушек в клетках и тканях [53,58]. Такой подход позволяет измерить максимальное количество NO, однако влечет за собой значительные нарушения в клеточном метаболизме [59,60].

Для формирования спиновой ловушки внутривенно вводили ДЭТК-Na в дозе 500 mg/kg (в объеме 2 ml воды на 300 g веса животного). Далее смесь растворов сульфата железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma, USA) в дозе 37.5 mg/kg и цитрата натрия в дозе 187.5 mg/kg (в объеме 1 ml воды на 300 g веса животного), приготовленную непосредственно перед введением, вводили подкожно в три точки — правое и левое бедро и в роstralную часть межлопаточной области [14,61]. Все компоненты вводили животным за 40 min до забоя животного и изоляции исследуемых органов. В смеси сульфата железа и цитрата натрия образуется цитрат железа. ДЭТК-Na и цитрат железа с током крови распределяются по организму с образованием нерастворимого в воде соединения. В свою очередь, при наличии NO образуется парамагнитный комплекс $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$, который является устойчивым и может сохраняться достаточно долго. Время полураспада этой молекулы при комнатной температуре составляет приблизительно 1.5 h [58]. Комплекс спиновой ловушки с NO $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$ характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением *g*-фактора $g = 2.038$ и тремя компонентами сверхтонкой структуры [58,62,63]. Кроме того, спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя

комплекс $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$, который также может быть зарегистрирован методом ЭПР спектроскопии [63,64].

Измерения спектров комплекса биологических образцов $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ и $\text{Cu}^{2+}\text{-(ДЭТК)}_2$ проводили на спектрометре фирмы Брукер X диапазона (9.5320 GHz) EMX/plus. Образец в пальчиковом Дьюаре фирмы Брукер помещали в полость двойного резонатора (model ER 4105DR), а эталонный образец помещался в другую полость того же резонатора. Так как каждый исследуемый образец находился в одинаковых условиях с эталонным образцом, это позволило соотносить интенсивности сигналов исследуемых образцов, учитывая изменение добротности при измерениях. Частота модуляции магнитного поля 100 kHz, амплитуда модуляции 2 G, мощность СВЧ излучения 2 mW, временная константа 327 ms, температура измерений 77 K. Амплитуда модуляции, усиление и мощность СВЧ во всех экспериментах подбирались с условием отсутствия перемодуляции и насыщения сигнала ЭПР и сохранялись одинаковыми на протяжении всех измерений. Масса образцов составляла около 150–200 mg. Амплитуду спектров ЭПР нормировали на вес образца.

1.3. Статистическая обработка результата

Результат представлен в виде $M \pm m$ (среднее значение — стандартная ошибка среднего). Статистическую обработку данных проводили с применением *t*-критерия Стьюдента с проверкой нормальности и равенства дисперсий. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

2. Результаты исследований

Методом ЭПР спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя 1-й и 3-й субъединиц супероксиддисмутазы) в печени крыс при сочетанной травме головного и спинного мозга. В организме животных содержится значительное число медьсодержащих ферментов [65,66]. Одним из них является Cu, Zn-SOD -супероксиддисмутазы — СОД1 [66,67,68]. Первая и третья субъединицы супероксиддисмутазы в качестве переходного металла содержат медь: Cu, Zn-SOD (медь как кофактор активного центра и цинк как кофактор, стабилизирующий конформацию) [69]. Нейтрализация свободных радикалов супероксида (O_2^-) с помощью цитозольного фермента SOD1 является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления [70].

На рис. 1 показаны типичные спектры ЭПР печени контрольной крысы (вверху) и крысы через семь суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга. Данный спектр получен при микроволновом излучении постоянной частоты при протяжке магнитного поля. В этом спектре присутствуют сигналы от разных парамагнитных частиц (комплексов). В области магнитного поля от 330 до 337 mT наблюдается сигнал

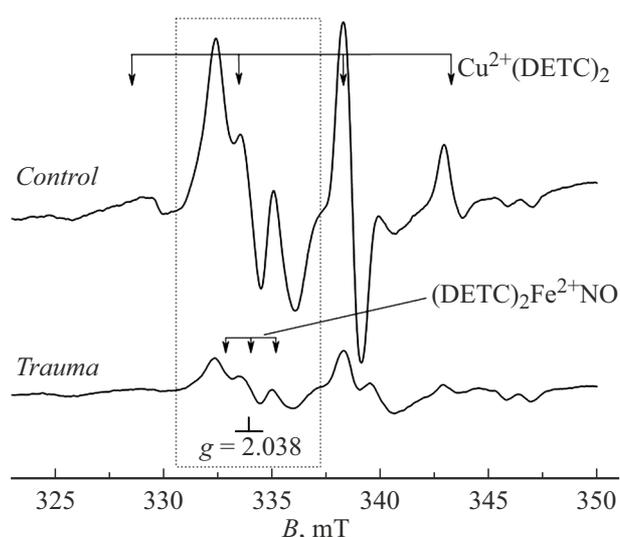


Рис. 1. Примеры спектров ЭПР тканей печени контрольной крысы (вверху) и крысы через семь суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга. Животным производилась инъекция компонентов спиновой ловушки: ДЭТК-Na, сульфат железа и цитрат натрия. Пунктирной рамкой показано положение трех линий комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Стрелками показаны маркеры сверхтонкой структуры соответствующих комплексов.

от комплекса спиновой ловушки с NO $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, который характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением *g*-фактора $g = 2.038$ и тремя компонентами сверхтонкой структуры. *g*-фактор определяется известной формулой $h\nu = g\beta B$ [54,55], где параметрами измерения являются ν — частота (в нашем случае 9.53 GHz) и B — величина индукции магнитного поля. Для $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ мы определяли *g*-фактор по точке, где первая производная центральной компоненты сверхтонкой структуры (СТС) пересекается с нулевой линией. В наблюдаемом диапазоне магнитного поля присутствует спектр ЭПР от комплекса $\text{Cu}^{2+}\text{-(ДЭТК)}_2$ со значением *g*-фактора 2.04. Как известно, спектр этого комплекса расщеплен на четыре компоненты СТС [63,64,71,72].

Среднее содержание NO в образцах печени в контрольной группе составило 15.1 ± 4.6 а.у., а в группе травмированных крыс — 4.9 ± 1.3 а.у. На рис. 2, а приведены статистические данные по относительным интегральным интенсивностям сигнала $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в спектрах исследованных образцов печени. Результаты анализа демонстрируют значительное снижение продукции NO через семь суток после травмы. Видно, что в печени контрольных животных наблюдается разброс данных, однако снижение содержания NO после травмы является достоверным (*t*-test, $p = 0.045$). Среднее содержание Cu в образцах печени в контрольной группе составило 14.6 ± 11.9 а.у., а в группе травмированных крыс — 7.7 ± 3.8 а.у. На рис. 2, б приведены статистические данные по относительным интегральным

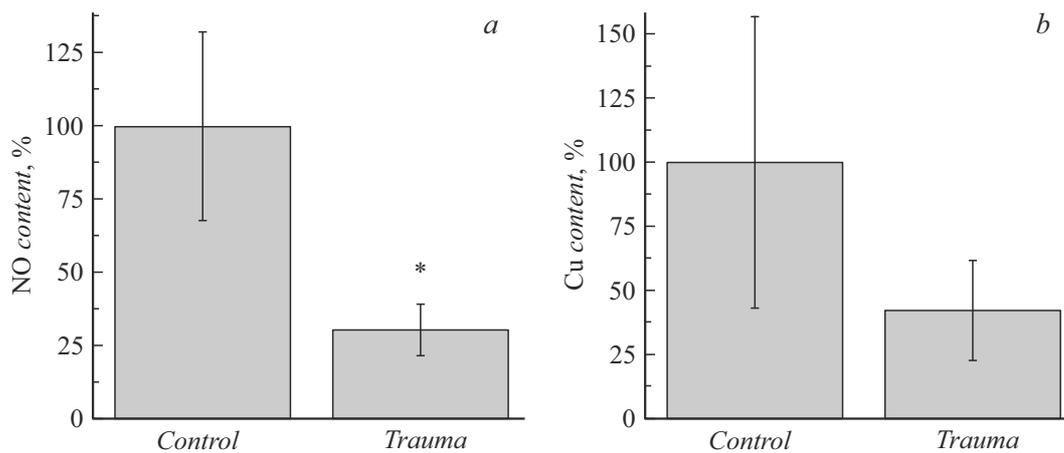


Рис. 2. Среднее содержание NO (a) и Cu (b) в тканях печени контрольных крысы и крыс через семь суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга. Ось ординат — средняя удельная интенсивность сигнала комплексов (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO (a) и Cu(ДЭТК)₂ (b) в образцах тканей печени животных, в процентах от интенсивности сигналов в контрольной группе. * — отличие от контроля (*t*-test, *p* < 0.05).

интенсивностям сигнала Cu²⁺-(ДЭТК)₂ в спектрах исследованных образцов печени. Наблюдается снижение содержания меди более чем в 2 раза, однако из-за большого разброса данных у контрольных животных отличие не является достоверным.

3. Обсуждение

Нарушение структуры головного или спинного мозга при различных повреждениях (инсульты, травмы) сопровождается катастрофическими дисфункциональными последствиями в организме человека и животных [73,74]. Повреждение нейронов и глии усиливается и пролонгируется после инсульта или травмы мозга в силу ослабления кровоснабжения травмированных тканей. Одной из причин и, одновременно, следствий таких патологических процессов в мозге является развитие гипоксии, которая служит предшественником многих патологических процессов в организме [75,76]. Одной из нерешенных социально-значимых проблем является вопрос о реабилитации пациентов с повреждениями головного и спинного мозга [73,77–79]. Решения здесь сильно зависят от понимания патологических механизмов вторичных повреждений [40,41,80,81]. Нарушения работы нейронных сетей при травме спинного мозга любой этиологии (травма, кровоизлияние, опухолевый или воспалительный процессы) сопровождаются не только потерей центрального контроля соматических и вегетативных функций, но и нарастающими деструктивными процессами в нервной ткани [82]. Ослабевает кровоснабжение нервных и глиальных клеток, а также элементов межклеточного матрикса. Возникает каскад событий, которые идентифицируются как „вторичная травма“, когда наряду с повреждением эндотелиальных клеток и нарушением гомеостаза, ишемическое реперфузионное

повреждение запускает полномасштабные воспалительные процессы, возникающие в результате активации клеток врожденного иммунитета (микроглии, олигодендроцитов и астроцитов) и инфильтрации лейкоцитов (нейтрофилов и макрофагов). Эти воспалительные клетки выделяют нейротоксины (провоспалительные цитокины и хемокины, свободные радикалы, эксайтотоксичные аминокислоты, оксид азота (NO)), которые способствуют деструкции аксонов и нейронов [81,83]. Такие процессы фатально изменяют взаимоотношение нейронов, глиальных клеток и межклеточного матрикса.

Травматические и ишемические повреждения мозга продолжают оставаться одной из сложнейших проблем современной медицины [16,18,31,74,81]. Изучение механизмов репаративных процессов в нервной ткани и разработка новых методов восстановления нейрональных структур составляют одно из актуальных направлений в физиологии и медицине и имеют большое значение для разработок новых терапевтических и реабилитационных стратегий [2,18,73,81]. При травме и ишемии головного мозга формируется много патологических механизмов, которые способствуют нарушению целостности нервных и глиальных клеток, а также разрушению межклеточного матрикса и повреждению кровеносных сосудов [84,85]. Сходства в патогенезе этих церебральных повреждений свидетельствуют о том, что тактика терапии, защищающая от ишемии ткани мозга при инсультах, также способна быть реальным выбором для пациентов с травмой мозга. Исследования последних лет показывают, что одним из терапевтических воздействий может являться ингаляция NO [19,86]. Также показано, что в определенных условиях терапевтическое воздействие может оказать блокада индуцибельной NO-синтазы [87]. Механизмы повреждения клеток включают глутаматную эксайтотоксичность, окислительный

стресс, выработку свободных радикалов, апоптоз и воспаление [74,81,88,89].

При травме мозга происходит повреждение не только клеток нервной и глиальной ткани, но и тканей стенок кровеносных сосудов. Снижение локального кровоснабжения поврежденного участка мозга сопровождается усилением деструктивных процессов, которые фактически становятся доминирующими в посттравматический период, когда прямое действие физического фактора, вызвавшего травму, уже отсутствует. В свою очередь, снижение уровня кислорода при гипоксии тканей, последующей после травмы, приводит к нарушению редокс-системы железа, которое способно катализировать реакцию образования свободных радикалов кислорода, вызывающих перекисидацию липидов в поврежденных тканях. Кроме того, повреждение сосудов при травме ведет к высвобождению гемоглобина из эритроцитов, создавая дополнительный источник редокс-активного железа [24,71,91].

Не вызывает сомнения участие окислительного стресса в механизмах патогенеза при ишемических и травматических повреждениях мозга [24]. Окислительным стрессом называется изменение баланса между окислителями (активные формы кислорода — АФК) и антиоксидантами в пользу оксидантов [25]. АФК вырабатываются живыми организмами в результате нормального клеточного метаболизма. При низких и умеренных концентрациях они участвуют в физиологических процессах в клетке, но при высоких концентрациях они вызывают неблагоприятные изменения в клеточных компонентах, таких, как липиды, белки и ДНК [12,24,25]. ОС способствует возникновению многих патологических состояний различных органов [26,92,93]. Поэтому важнейшей компонентой защиты клеток при ОС является антиоксидантная система [25,27].

Одним из эндогенных ферментов, играющих важную роль в удалении АФК, является супероксиддисмутаза [24,25,93]. СОД является важнейшим ферментом антирадикальной защиты. Имеется 3 изоформы этого фермента, два из них — это Cu, Zn супероксиддисмутаза, которая является основным подтипом этого фермента в нервной системе [27]. Известно, что наибольшее количество данного подтипа фермента встречается в печени [94]. Известны также другие элементы антиоксидантной системы, такие, как каталаза, глутатионпероксидаза и другие [27]. Одними из главных индукторов окислительного стресса в тканях являются также редокс-активные ионы железа [24]. Также известно, что медь и железо, поступающие в организм через желудочно-кишечный тракт, транспортируются и затем хранятся в гепатоцитах печени и рекрутируются из печени в кровь при каких-либо патологических состояниях тканей, таких, как ишемия или воспаление [61]. Нами показано значительное снижение содержания Cu в печени при сочетанной травме головного и спинного мозга крысы, что может выступать как подтверждение рекрутирования катиона меди для синтеза CuZn супероксиддисмутазы [46].

Спонтанное восстановление поврежденных сосудов и наступление реперфузии требует определенного времени. NO и его производные играют важную роль в физиологии и патофизиологии печени [63,95]. Основную функцию выполняют эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS) NO-синтазы (NOS). eNOS в основном экспрессируется в эндотелиальных клетках печеночной артерии, воротной вены, центральной вены и лимфатических сосудов. NO, полученный из eNOS, поддерживает гомеостаз печени и подавляет патологические состояния в печени. Напротив, iNOS индуцируется в различных клетках печени, включая гепатоциты, клетки Купфера и другие иммунные клетки.

При многих патологических состояниях iNOS производит большое количество NO, который является основным источником активных форм азота в этой ткани [61,87,95,96]. В печени NO активно реагирует с такими металлами, как Cu и Fe [63,95]. Нами показано значительное снижение содержания NO и Cu в печени при сочетанной травме головного и спинного мозга крысы, что может свидетельствовать о воспалительных процессах, которые развиваются в печени. Подтверждение такого вывода также следует из результатов о том, что повышение концентрации NO может быть использовано в терапевтических целях при некоторых заболеваниях печени [97].

Полученные нами данные показывают, что сочетанная травма головного и спинного мозга сопровождается значительным снижением продукции NO не только в травмированной области мозга [46], но и в печени, т.е. в органе, не имеющем прямого отношения к травмированной части организма, и это доказывает существенную роль изменения кровоснабжения и поступления различных веществ с кровотоком для функционирования организма.

Финансирование работы

Работа поддержана грантом РФФ № 23-45-10004.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов

Информация о вкладе авторов

Х.Л. Гайнутдинов и В.А. Кульчицкий предложили исследование, отвечали за концепцию, дизайн, координацию и окончательное утверждение. Х.Л. Гайнутдинов, В.А. Кульчицкий, В.В. Андрианов, Д.И. Силантьева и Г.Г. Яфарова участвовали в интерпретации результатов. В.А. Кульчицкий, А.В. Нагибов, В.М. Рубахова, Е.В. Федорова, Т.А. Филипович и Г.Г. Яфарова провели моделирование сочетанного повреждения головного и спинного мозга и забор образцов. Л.В. Базан отвечала за работу ЭПР-спектрометра. Л.В. Базан, А.И. Арсланов,

И.Б. Дерябина, Л.Н. Муранова и Д.И. Силантьева провели измерения спектров ЭПР образцов. В.В. Андрианов подготовил методику обработки образцов. В.В. Андрианов и Т.Х. Богодвид провели расчеты и анализ сигналов NO и меди в спектрах ЭПР. В.В. Андрианов сделал оригинальные рисунки.

Список литературы

- [1] D.D. Thomas, L.A. Ridnour, J.S. Isenberg, W. Flores-Santana, C.H. Switzer, S. Donzelli, P. Hussain, C. Vecoli, N. Paolucci, S. Ambs, C.A. Colton, C.C. Harris, D.D. Roberts, D.A. Wink. *Free Radical Biology Medicine*, **45**, 18 (2008).
- [2] A.F. Vanin. *Nitric Oxide*, **54**, 15 (2016). DOI: 10.1016/j.niox.2016.01.006
- [3] J.O. Lundberg, E. Weitzberg. *Cell*, **185**, 2853 (2022). DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.010
- [4] J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe. *Neuroscientist*, **16** (4), 435 (2010). DOI: 10.1177/1073858410366481
- [5] K. Chachlaki, V. Prevot. *British J. Pharmacol.*, **177** (24), 5437 (2020). DOI: 10.1111/bph.14800
- [6] В.П. Реутов, В.Е. Охотин, А.В. Шуклин, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын, В.Н. Гурин. *УФН*, **38** (4), 39 (2007).
- [7] Р.И. Зарипова, Г.Г. Яфарова, В.В. Андрианов, Х.Л. Гайнутдинов, Т.Л. Зефилов. *ЖТФ*, **92** (7), 999 (2022). DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52657.336-21
- [8] L. J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini, C. Napoli. *J. Cardiovasc Pharmacol.*, **34** (6), 879 (1999). DOI: 10.1097/00005344-199912000-00016
- [9] A.G. Tennyson, S.J. Lippard. *Cell Chemical Biology*, **18** (10), 1211 (2011). DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.09.009
- [10] П.М. Балабан, Т.А. Коршунова. *УФН*, **42** (4), 3 (2011).
- [11] T.A. Heinrich, R.S. da Silva, K.M. Miranda, C.H. Switzer, D.A. Wink, J.M. Fukuto. *British J. Pharmacol.*, **169**, 1417 (2013). DOI: 10.1111/bph.12217
- [12] Т.И. Шлапакова, Р.К. Костин, Е.Е. Тягунова. *Биоорганическая химия*, **46** (5), 466 (2020).
- [13] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. *Physiol. Rev.*, **87**, 315 (2007).
- [14] Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, Г.Г. Яфарова, Л.В. Базан, Т.Х. Богодвид, С.Г. Пашкевич, М.О. Досина, А.С. Замаро, А.А. Денисов, В.А. Кульчицкий. *ЖТФ*, **90** (9), 1481 (2020). DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49679.432-19. [Kh.L. Gainutdinov, V.V. Andrianov, G.G. Yafarova, L.V. Bazan, T.Kh. Bogodvid, S.G. Pashkevich, M.O. Dosina, A.S. Zamaro, A.A. Denisov, V.A. Kulchitsky. *Tech. Phys.*, **65** (9), 1421 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090182]
- [15] A.G. Soloveva, P.V. Peretyagin. *Opera Med. Physiol.*, **9** (4), 160 (2022). DOI: 10.24412/2500-2295-2022-4-160-170
- [16] P.S. Garry, M. Ezra, M.J. Rowland, J. Westbrook, K.T. Pattinson. *Exp. Neurol.*, **263**, 235 (2015). DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.10.017
- [17] O.G. Deryagin, S.A. GavriloVA, Kh.L. Gainutdinov, A.V. Golubeva, V.V. Andrianov, G.G. Yafarova, S.V. Buravkov, V.B. Koshelev. *Front. Neurosci.*, **11**, Art. N 427 (2017). DOI: 10.3389/fnins.2017.00427
- [18] J.M. Wierónska, P. Cieřlik, L. Kalinowski. *Biomolecules*, **11**, 1097 (2021). DOI: 10.3390/biom11081097
- [19] P. Jung, E. Ha, M. Zhang, C. Fall, M. Hwang, E. Taylor, S. Stetkevich, A. Bhanot, C.G. Wilson, J.D. Figueroa, A. Obenaus, S. Bragg, B. Tone, S. Eliamani, B. Holshouser, A.B. Blood, T. Liu. *PLoS ONE*, **17** (5), e0268282 (2022). DOI: 10.1371/journal.pone.0268282
- [20] E.B. Manukhina, I.Y. Malyshev, B.V. Smirin, S.Y. Mashina, V.A. Saltykova, A.F. Vanin. *Nitric Oxide*, **3** (5), 393 (1999). DOI: 10.1006/niox.1999.0244
- [21] О.Г. Дерягин, С.А. Гаврилова, С.В. Буравков, В.В. Андрианов, Г.Г. Яфарова, Х.Л. Гайнутдинов, В.Б. Кошелев. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **116** (8), 17 (2016). DOI: 10.17116/jnevro20161168217-23
- [22] Y. Wang, F. Hong, S. Yang. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4243 (2022). DOI: 10.3390/ijms23084243
- [23] V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A.M.G. Stella. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**, 767 (2007). DOI: 10.1038/nrn2214
- [24] E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci. *Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO J.*, **5**, 9 (2012).
- [25] М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайтнина. *Вестник Уральской медицинской академической науки*, **14** (4), 381 (2017). DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-4-381-398
- [26] О.Г. Хурцилава, Н.Н. Плужников, Я.А. Нактис (ред.). *Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство* (Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, СПб., 2012)
- [27] М.С. Карбышев, Ш.П. Абдуллаев. *Биохимия оксидативного стресса. Учебно-методическое пособие* (РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, М., 2018)
- [28] Г.Т. Рихирева, М.Г. Маклецова. *Биофизика*, **65** (2), 376 (2020).
- [29] S.V. Yurtaeva, V.N. Efimov, G.G. Yafarova, A.A. Ereemeev, V.S. Iyudin, A.A. Rodionov, Kh.L. Gainutdinov, I.V. Yatsyk. *EPR Appl. Magn. Reson.* **47** (6) 555 (2016).
- [30] M.A. Jakubowska, J. Pyka, D. Michalczyk-Wetula, K. Baczyński, M. Cieřla, A. Susz, P.E. Ferdek, B.K. Płonka, L. Fiedor, P.M. Płonka. *Redox Biol.*, **34**, 101566 (2020). DOI: 10.1016/j.redox.2020.101566
- [31] V.V. Andrianov, V.A. Kulchitsky, G.G. Yafarova, A.S. Zamaro, Y.P. Tokalchik, L.V. Bazan, T.Kh. Bogodvid, V.S. Iyudin, S.G. Pashkevich, M.O. Dosina, Kh.L. Gainutdinov. *Appl. Magn. Res.*, **52** (11), 1657 (2021).
- [32] А.А. Потапов, Л.М. Рошаль, Л.Б. Лихтерман, А.Д. Кравчук. *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*, **2**, 3 (2009).
- [33] A.A. Mendes, L.F. de Souza, R. Walz, A. Dafre. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 1 (2014). DOI: 10.1155/2014/723060
- [34] Е.И. Гусев, А.Н. Коновалов, А.Б. Гехт (ред.). *Неврология. Национальное руководство*. Кр. изд. (ГЭОТАР-Медиа, М., 2018)
- [35] A. Post, T.B. Hoshizaki. *Trauma*. September, **14** (4). Published online 14 June 2012 (2012). DOI: 10.1177/1460408612446573
- [36] M. Galgano, G. Toshkezi, X. Qiu, T. Russell, L. Chin, L.-R. Zhao. *Cell Transplant.*, **26** (7), 1118 (2017). DOI: 10.1177/0963689717714102
- [37] Р.Ш. Закиров, Е.Г. Сорокина, О.В. Карасева, Ж.Б. Семенова, С.В. Петричук, Л.М. Рошаль, В.Г. Пинелис. *Вестник РАМН*, **70** (6), 710 (2015). DOI: 10.15690/vramn568

- [38] A. Capizzi, J. Woo, M. Verduzco-Gutierrez. *Med. Clin. North Am.*, **104** (2), 213 (2020). DOI: 10.1016/j.mcna.2019.11.001
- [39] А.И. Баранич, А.А. Сычев, И.А. Савин, А.А. Полулан, А.В. Ошоров, А.А. Потапов. *General Reanimatology*, **14** (5), 85 (2018). DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-85-95
- [40] A. Everitt, B. Root, D. Calnan, P. Manwaring, D. Bauer, R. Halter. *Scientific Reports*, **11**, 15454 (2021).
- [41] X. Che, Y. Fang, X. Si, J. Wang, X. Hu, C. Reis, S. Chen. *Front. Neurosci.*, **12**, 392 (2018). DOI: 10.3389/fnins.2018.00392
- [42] S.A. Lipton, Y.B. Choi, Z.H. Pan, E.Z. Lei, H.S. Chen, N.J. Sucher, J. Loscalzo, D.J. Singel, J.S. Stamler. *Nature*, **364**, 626 (1993). DOI: 10.1038/364626a0
- [43] G.C. Brown, V. Borutaite. *Biochim. Biophys. Acta*, 1658 (1–2), **44** (2004). DOI: 10.1016/j.bba-bio.2004.03.016
- [44] J.O. Lundberg, E. Weitzberg. *Cell*, **185**, 2853 (2022). DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.010
- [45] A.F. Vanin. *Cell Biochem. Biophys.*, **77** (4), 279 (2019).
- [46] V.V. Andrianov, V.A. Kulchitsky, G.G. Yafarova, L.V. Bazan, T.K. Bogodvid, I.B. Deryabina, L.N. Muranova, D.I. Silantyeva, A.I. Arslanov, M.N. Paveliev, E.V. Fedorova, T.A. Filipovich, A.V. Nagibov, Kh.L. Gainutdinov. *Molecules*, **28** (21), 7359 (2023). DOI: 10.3390/molecules28217359
- [47] Y. Shanko, V. Navitskaya, A. Zamaro, S. Krivenko, M. Zafranskaya, S. Pashkevich, S. Koulchitsky, Y. Takalchik Stukach, A. Denisov, V. Kulchitsky. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **10** (1), 1 (2018). DOI: 10.26717/BJSTR.2018.10.001884
- [48] Y. Shanko, A. Zamaro, S.Y. Takalchik, S. Koulchitsky, S. Pashkevich, E. Panahova, V. Navitskaya, M. Dosina, A. Denisov, S. Bushuk, V. Kulchitsky. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **7** (5), (2018). DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-2-77-86
- [49] Y. Stukach (Takalchik), Kh. Gainutdinov, M. Dosina, S. Pashkevich, V. Andrianov, A. Denisov, T. Bogodvid, G. Yafarova, S. Bushuk, T. Kuznetsova, V. Kulchitsky. *J. Stem. Cells Regen. Therapy*, **1** (1), 1 (2016).
- [50] T. Bogodvid, S. Pashkevich, M. Dosina, A. Zamaro, Y. Takalchik, G. Yafarova, V. Andrianov, A. Denisov, D. Loiko, K. Gainutdinov, V. Kulchitsky. *Eur. J. Clin. Invest.*, **49** (Suppl 1, P146-T), 161 (2019). DOI: 10.1111/eci.13109
- [51] G. Yafarova, Y. Tokalchik, T. Filipovich, V. Andrianov, L. Bazan, T. Bogodvid, A. Chihab, A. Zamaro, V. Kulchitsky, Kh. Gainutdinov. *BioNanoScience*, **13**, 393 (2023). DOI: 10.1007/s12668-023-01072-7
- [52] C. Csonka, T. Pali, P. Bencsik, A. Gorbe, P. Ferdinandy, T. Csont. *Br.J. Pharmacol.*, **172**, 1620 (2015). DOI: 10.1111/bph.12832
- [53] A.F. Vanin, A. Huisman, E.E. Van Faassen. *Methods in Enzymology*, **359**, 27 (2003).
- [54] A.L. Kleschyov, P. Wenzel, T. Munzel. *J. Chromatography B*, **851**, 12 (2007).
- [55] N. Hogg. *Radical Biol. Medicine*, **49**, 122 (2010).
- [56] S.V. Yurtaeva, V.N. Efimov, G.G. Yafarova, A.A. Ereemeev, V.S. Iyudin, A.A. Rodionov, Kh.L. Gainutdinov, I.V. Yatsyk. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (6), 555 (2016).
- [57] A.F. Vanin, P.I. Mordvintcev, A.L. Kleshchev. *Studia Biophys.*, **102**, 135 (1984).
- [58] В.Д. Микоян, Л.Н. Кубрина, А.Ф. Ванин. *Биофизика*, **39**, 915 (1994).
- [59] A. Vanin, A. Poltorakov. *Front. Biosci.*, **14**, 4427 (2009).
- [60] Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, В.С. Июдин, С.В. Юртаева, Г.Г. Яфарова, Р.И. Файзуллина, Ф.Г. Ситдииков. *Биофизика*, **58** (2), 276 (2013).
- [61] A.I. Ismailova, O.I. Gnezdilov, L.N. Muranova, A.A. Obnochny, V.V. Andrianov, Kh.L. Gainutdinov, A.G. Nasyrova, R.R. Nigmatullina, F.F. Rahmatullina, A.L. Zefirov. *Appl. Magn. Reson.*, **28**, 421 (2005).
- [62] P.M. Plonka, S. Chlopicki, M. Wisniewska, B.K. Plonka. *Acta Biochim. Polonica*, **50** (3), 807 (2003).
- [63] M.A. Jakubowska, J. Pyka, D. Michalczyk-Wetula, K. Baczyński, M. Cieśla, A. Susz, P.E. Ferdek, B.K. Plonka, L. Fiedor, P.M. Plonka. *Redox Biol.*, **34**, 101566 (2020). DOI: 10.1016/j.redox.2020.101566
- [64] E.E. van Faassen, M.P. Koeners, J.A. Joles, A.F. Vanin. *Nitric Oxide*, **18**, 279 (2008).
- [65] L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, T. Kozyreva, K. Zovo, P. Palumaa. *Nature*, **465**, 645 (2010).
- [66] R.A. Festa, D.J. Thiele. *Current Biol.*, **21** (21), R877 (2011).
- [67] A.-F. Miller. *FEBS Lett.*, **586**, 585 (2012).
- [68] Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, M.J. Maroney, A.-F. Miller, M. Teixeira, J.S. Valentine. *Chem. Rev.*, **114**, 3854 (2014). DOI: 10.1021/cr4005296
- [69] Y. Sheng, J. Capri, A. Waring, J.S. Valentine, J. Whitelegge. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **30** (2), 218 (2019). DOI: 10.1007/s13361-018-2075-y
- [70] T. Fukai, M. Ushio-Fukai. *Antioxid Redox Signal.*, **15** (6), 1583 (2011).
- [71] T. Tominaga, S. Sato, T. Ohnishi, S.T. Ohnishi. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **14**, 715 (1994).
- [72] Y. Suzuki, S. Fujii, T. Tominaga, T. Yoshimoto, T. Yoshimura, H. Kamada. *Biochim. Biophys. Acta*, **1335**, 242 (1997).
- [73] C. Koupourtidou, V. Schwarz, H. Aliee, S. Frerich, J. Fischer-Sternjak R. Bocchi, T. Simon-Ebert, X. Bai, S. Sirko, F. Kirchhoff, M. Dichgans, M. Götz, F.J. Theis, J. Ninkovic. *Nat. Commun.*, **15** (1), 2866 (2024). DOI: 10.1038/s41467-024-46625-w
- [74] Е.Г. Сорокина, В.П. Реутов, О.В. Карасева, Ж.Б. Семенова, В.Г. Пинелис, И.Е. Смирнов, З.В. Бакаева. *Российский педиатрический журнал*, **27** (3), 161 (2024). DOI: 10.46563/1560-9561-2024-27-3-161-167
- [75] H. Kumar, D.-K. Choi. *Mediators of Inflammation*, Article ID 584758 (2015). DOI: 10.1155/2015/584758
- [76] Е.В. Иванов, С.А. Гаврилова, В.Б. Кошелев. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, **20** (2), 5 (2021). DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-2-5-19
- [77] И.Н. Шевелев, А.В. Басков, Д.Е. Яриков, И.А. Борщенко. *Вопросы нейрохирургии*, **3**, (2000). <http://www.sci-rus.com/pathology/regeneration.htm>
- [78] Z. Jia, H. Zhu, J. Li, X. Wang, H. Misra, Y. Li. *Spinal Cord.*, **50**, 264 (2012).
- [79] A. Chari, I.D. Hentall, M.C. Papadopoulos, E.A.C. Pereira. *Brain Sci.*, **7**, 18 (2017). DOI: 10.3390/brainsci7020018
- [80] G. Ai, M. Xiong, L. Deng, J. Zeng, Q. Xiao. *Front. Neurol.*, **15**, 1358414 (2024). DOI: 10.3389/fneur.2024.1358414
- [81] A.V. Kozlov, S. Bahrami, H. Redl, C. Szabo. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863** (10 Pt B), 2627 (2017). DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.12.020
- [82] S. Kundi, R. Bicknel, Z. Ahmida. *Neuroscience Research*, **76**, 1 (2013).
- [83] M.A. Anwar, A.T.S. Shehabi, A.H. Eid. *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 98 (2016). DOI: 10.3389/fncel.2016.00098
- [84] K. Maiese. *Histol. Histopathol.*, **16** (2), 633 (2001). DOI: 10.14670/HH-16.633

- [85] Z-N. Guo, A. Shao, L-S. Tong, W. Sun, J. Liu, Y. Yang. *Mol. Neurobiol.*, **53** (6), 3606 (2016).
DOI: 10.1007/s12035-015-9308-x
- [86] V.E. Prusakov, Y.V. Maksimov, D.S. Burbaev, V.A. Serezhenkov, R.R. Borodulin, N.A. Tkachev, V.D. Mikoyan, A.F. Vanin. *Appl. Magn. Reson.*, **50** (7), 861 (2019).
- [87] E.H. Sinz, P.M. Kochanek, C.E. Dixon, R.S.B. Clark, J.A. Carcillo, J.K. Schiding, M. Chen, S.R. Wisniewski, T.M. Carlos, D. Williams, S.T. DeKosky, S.C. Watkins, D.W. Marion, T.R. Billiar. *J. Clin. Invest.*, **104** (5), 647 (1999).
DOI: 10.1172/JCI6670
- [88] G.A. Donnan, M. Fisher, M. Macieod, S.M. Davis. *Stroke. Lancet*, **371**, 1612 (2008).
- [89] V.P. Reutov, N.V. Samosudova, E.G. Sorokina. *Biophysics*, **64** (2), 233 (2019).
- [90] T.S. Anthonymuthu, E.M. Kenny, H. Bayir. *Brain Research*, **1640**, 57 (2016).
- [91] E.D. Hall, R.A. Vaishnav, A.G. Mustafa. *Neurotherapeutics*, **7**, 51 (2010).
- [92] P. Jenner. *Ann. Neurol.*, **53**, S26 (2003).
- [93] S. Kerr, M.J. Brosnan, M. McIntyre, J.L. Reid, A.F. Dominiczak, C.A. Hamilton. *Hypertension*, **33**, 1353 (1999).
- [94] S. Marklund. *Acta Physiolog. Scandinavica. Suppl.*, **492**, 19 (1980).
- [95] Y. Iwakiri, M.Y. Kim. *Trends in Pharmacol. Sci.*, **36** (8), 524 (2015). DOI: 10.1016/j.tips.2015.05.001
- [96] N.B. Gdara, I. Khemiri, A. Belgacem, S. Mannai, L. Bitri. *J. Cardiol. Cardiovasc. Sciences*, **2** (4), 15 (2018)
- [97] P.A. Ismail. *AJBSR.MS.ID.001227*, **8** (1), (2020).
DOI: 10.34297/AJBSR.2020.08.001227