

14.02

Изменение содержания оксида азота и меди в печени и гиппокампе крыс после моделирования ишемии головного мозга

© Х.Л. Гайнутдинов,^{1,2} В.В. Андрианов,^{1,2} Г.Г. Яфарова,^{1,2} Л.В. Базан,¹ Т.Х. Богодвид,² С.Г. Пашкевич,³ М.О. Досина,³ А.С. Замаро,³ А.А. Денисов,³ В.А. Кульчицкий³

¹ Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 420029 Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия

³ Институт физиологии НАН Беларуси, 220072 Минск, Беларусь
e-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступило в Редакцию 28 декабря 2019 г.

В окончательной редакции 28 декабря 2019 г.

Принято к публикации 17 февраля 2020 г.

Приведены результаты анализа содержания оксида азота и меди в печени и гиппокампе крыс после моделирования ишемии головного мозга. Исследования проведены методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса с использованием методики спиновых ловушек. Было показано, что содержание оксида азота на следующий день после моделирования ишемии мозга в гиппокампе снижалось в среднем на 50%, в тканях печени наблюдалась тенденция к снижению. Через два дня после моделирования ишемии головного мозга содержание оксида азота в гиппокампе восстанавливалось, в печени наблюдалось достоверное увеличение в среднем на 46% относительно контрольных значений. Содержание меди, ассоциируемое с содержанием супероксиддисмутазы, в печени увеличивалось на вторые сутки постишемического периода в среднем в 2,5 раза, в гиппокампе достоверных изменений содержания меди не было обнаружено.

Ключевые слова: оксид азота, ЭПР-спектроскопия, ишемия мозга, медь, печень, гиппокамп.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49679.432-19

Введение

Функционирование тканей организма зависит от ряда факторов. Один из таких факторов — необходимость достаточного количества кислорода, который поставляется с током крови, для протекания окислительных процессов. Нехватка кислорода ведет к патологическим процессам в организме, предшественником которых является гипоксия [1,2]. Гипоксия — патологический процесс, возникающий при недостаточном снабжении тканей организма кислородом или нарушении его утилизации в процессе биологического окисления — состояние кислородного голодания как всего организма в целом, так и отдельных органов и тканей [2,3]; это важный компонент патогенеза многих заболеваний [4–6]. Гипоксия является универсальным патологическим состоянием при самых разнообразных заболеваниях человека — сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности, ишемии миокарда, нарушении мозгового и периферического кровообращения и др. [2,5,7]. При недостатке снабжения кислородом организма и, в частности, мозга, возникает ишемия мозга, которая может завершиться ишемическим инсультом [3,8].

При гипоксии нарушается функционирование нейромедиаторных систем, включая систему оксида азота (NO) [9]. NO известен как одна из важнейших сигналь-

ных молекул, регулирующих физиологические функции организма и метаболизм клеток, он широко распространен в нервной системе [10,11]. Большой интерес вызывает участие NO в механизмах развития различных патологических состояний организма [10,12–14]. В настоящее время развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с нарушениями мозгового кровотока, а также с нарушениями его регуляции системой NO [14–16]. NO выполняет свои физиологические функции, связываясь с ионами железа (Fe) в составе гема, либо через S-нитрозилирование белков, а также принимает участие в целом ряде биохимических реакций [10,17,18]. Обнаружено, что при патологических процессах NO играет как протекторную роль, так и деструктивную, что определяется многими факторами [19].

Поэтому можно говорить о двух диаметрально противоположных влияниях NO: стимулирующее положительное и токсическое повреждающее действия [19]. Возможно, это связано с количеством оксида азота в тканях. Встает вопрос об использовании современного метода обнаружения и количественного определения содержания NO в тканях живых организмов в норме и при экспериментальном моделировании патологий.

Одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях является метод электронного парамагнитного

резонанса (ЭПР) [17,20,21]. Эффективность метода обусловлена методикой, разработанной Ваниным и др. [22], которая основана на реакции радикала (в данном случае NO) со спиновой ловушкой. В результате реакции образуется аддукт с характерным спектром ЭПР. Авторы применили комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом (DETC) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в различных тканях животных. Эти комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора 2.035–2.040 и триплетной сверхтонкой структурой [17,21,23]. Метод обладает чувствительностью 0.04–0.4 нМ, позволяет проводить прямые измерения, является высокочувствительным за счет применения спиновых ловушек [24].

Ранее нашим коллективом методом ЭПР спектроскопии была проведена оценка *in vivo* влияния ишемического инсульта на интенсивность продукции NO в тканях мозга, сердца и печени крыс [25]. Для моделирования ишемического инсульта животные были подвергнуты 5 min гипобарической гипоксии (условный подъем на высоту 4500 m над уровнем моря), в этом случае ишемии подвергается весь организм. Целью настоящей работы было исследование методом ЭПР-спектроскопии интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в тканях печени, а также в гиппокампе крыс при моделировании ишемии мозга с помощью перевязки общих сонных артерий [26,27], что позволяет подвергать ишемическому воздействию только головной мозг.

1. Методика эксперимента

Моделирование ишемического инсульта осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (НАН Беларуси), г. Минск. Моделирование ишемии головного мозга осуществляли лигированием (перевязкой) общих сонных артерий на уровне бифуркации у крыс-самцов линии Вистар ($n=10$) под кетамин–ксилазин–ацепромазиновым наркозом [26,27]. Вторую группу составляли интактные животные ($n=10$), которые не подвергались хирургическим манипуляциям в области мозга. За 30 min до извлечения исследуемых тканей животным вводили компоненты спиновой ловушки для NO. Ткани печени, а также гиппокамп извлекались под кетамин–ксилазин–ацепромазиновым наркозом, образцы сразу замораживались в жидком азоте.

При подготовке образцов для измерения ЭПР спектров мы опирались на методику спиновых ловушек, предложенную проф. А.Ф. Ваниным с сотрудниками [17,28]. Нами в качестве спиновой ловушки был применен комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом — $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$. Комплекс спиновой ловушки с NO

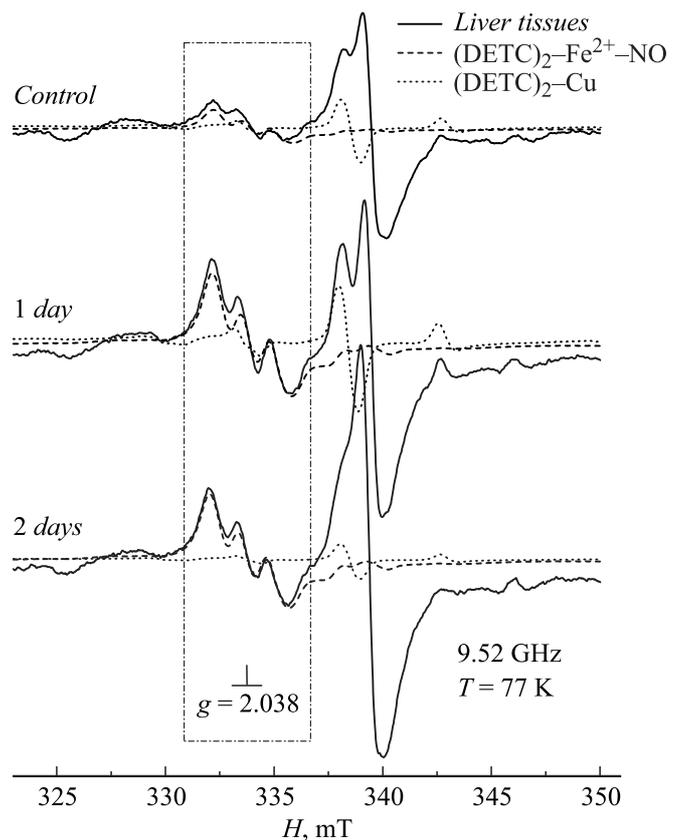


Рис. 1. Спектры ЭПР ткани печени интактной крысы („Control“), крысы на следующий день („1 day“) и через 2 дня („2 days“) после моделирования ишемии мозга. Крысы были инъецированы компонентами спиновой ловушки для образования комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Ось абсцисс — магнитное поле.

$(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора 2.038 и триплетной сверхтонкой структурой [14,17,21]. Как и ранее [20], DETC–Na вводили внутривенно в дозе 500 mg/kg в 2.5 ml воды. Смесь растворов сульфата железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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 ростральную часть межлопаточной области. В смеси сульфата железа и цитрата натрия образуется цитрат железа. DETC–Na и цитрат железа распределяются по организму и при взаимодействии образуют нерастворимый в воде комплекс DETC-Fe^{2+} , способный взаимодействовать с NO с образованием стабильного радикала $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, который может быть зарегистрирован методом ЭПР-спектроскопии. Компоненты спиновой ловушки для оксида азота (DETC–Na, FeSO_4 , sodium citrate) вводили животным за 30 min до извлечения исследуемых тканей. Образцы тканей (печени и гиппокамп) сразу замораживались в жидком азоте и в замороженном состоянии

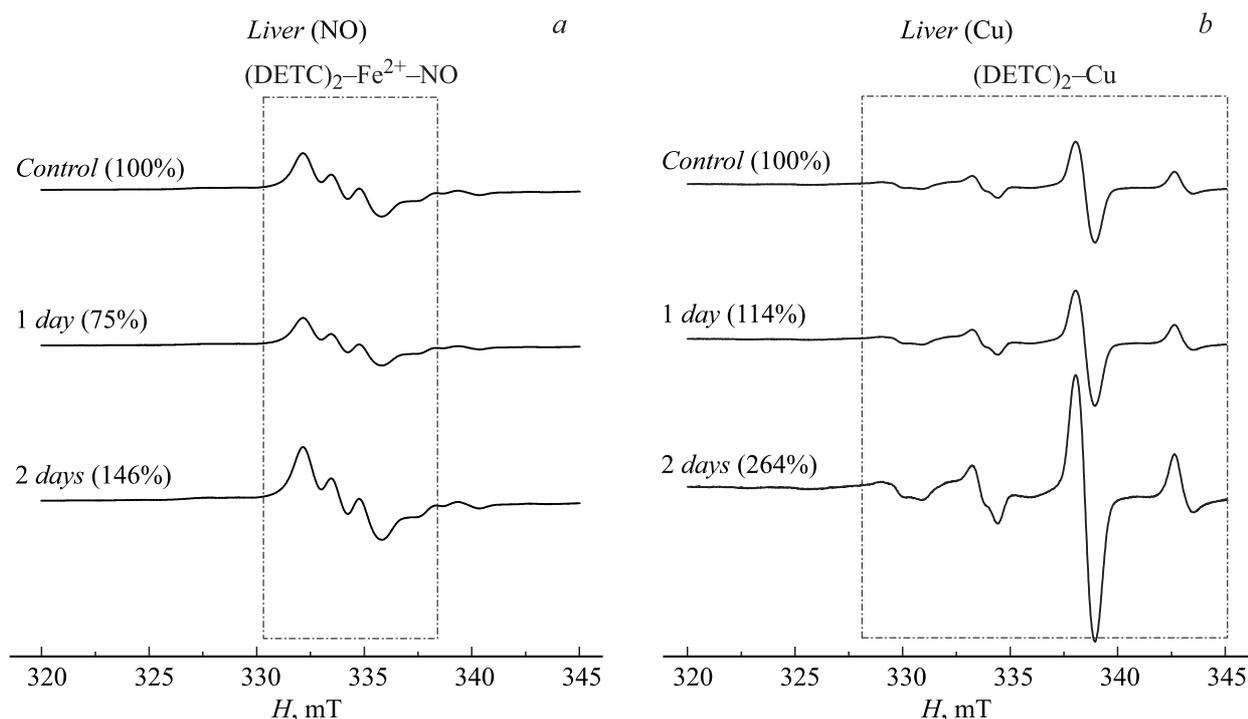


Рис. 2. Средние сигналы комплексов $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ (a) и $(\text{DETC})_2\text{-Cu}$ (b), выделенные из спектров ЭПР тканей печени интактной крысы („Control“), крысы на следующий день („1 day“) и через 2 дня („2 days“) после моделирования ишемии мозга. Штрихпунктиром показаны области комплексов $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ (a) и $(\text{DETC})_2\text{-Cu}$ (b) в наблюдаемом сигнале. Процентами показаны средние уровни сигналов этих комплексов. Ось абсцисс — магнитное поле.

перевозились из Минска в Казань в пластиковых контейнерах с сухим льдом. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$) в таком состоянии хорошо сохраняется, и сигнал от комплекса не изменяется не менее месяца. Масса образцов составляла около 100 mg.

Спиновая ловушка взаимодействует также с Cu, образуя комплекс $\text{Cu}(\text{DETC})_2$, который также может быть зарегистрирован методом ЭПР-спектроскопии [29]. Измерения спектров комплексов $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ и $\text{Cu}(\text{DETC})_2$ проводили на спектрометрах фирмы Брукер X диапазона (9.50 GHz) EMX/plus с температурной приставкой ER 4112HV и ER 200 SRC при модуляции магнитного поля 100 kHz, амплитуды модуляции 2 G, мощности СВЧ излучения 30 mW, временной константе 200 ms и температуре 77 K в пальчиковом дюбаре фирмы Брукер. 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.

2. Результаты исследований и их обсуждение

Нами было проведено исследование интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в тканях печени, а также в

гиппокампе крыс после моделирования ишемии мозга. Моделирование ишемии мозга осуществляли перевязкой общих сонных артерий [26,27], что позволяет подвергать ишемическому воздействию только головной мозг, а не весь организм, как было в нашей предыдущей работе [25]. Пример спектра ЭПР тканей печени интактной (контроль) крысы и крыс через 1 и 2 дня после моделирования ишемии головного мозга приведен на рис. 1. На этих спектрах видны характерный триплетный сигнал от комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ со значением g-фактора, равным 2.038, и сигнал от меди [14,17,24,28]. Эти сигналы ($(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$) и ($(\text{DETC})_2\text{-Cu}$) были выделены из общего спектра ЭПР для тканей печени (рис. 2) и гиппокампа (рис. 3).

На следующий день после моделирования ишемии головного мозга содержание NO в тканях печени имело тенденцию к снижению (рис. 4, a), а в гиппокампе и достоверно снижалось в среднем на 50% (рис. 5, a). Через 2 дня после моделирования ишемии мозга содержание NO восстанавливалось в гиппокампе и достоверно увеличивалось (в среднем на 46%) в тканях печени. Ранее нами при моделировании ишемии всего организма методом гипобарической гипоксии (условный подъем на высоту) нами было получено более значительное снижение содержания NO в тканях организма, и такое же в мозге [25]. Полученные результаты показывают, что при моделировании ишемии всего организма

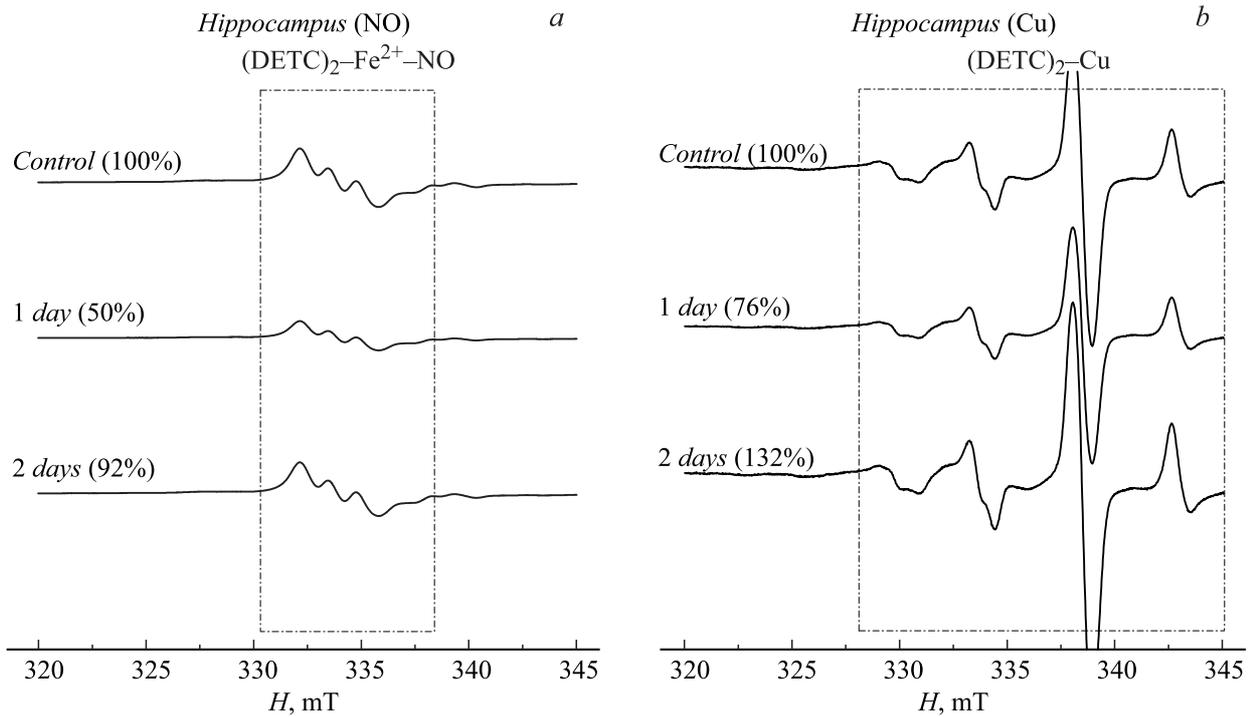


Рис. 3. Средние сигналы комплексов $(DETC)_2-Fe^{2+}-NO$ (a) и $(DETC)_2-Cu$ (b), выделенные из спектров ЭПР тканей гиппокампа интактной крысы („Control“), крысы на следующий день („1 day“) и через 2 дня („2 days“) после моделирования ишемии мозга. Штрихпунктиром показаны области комплексов $(DETC)_2-Fe^{2+}-NO$ (a) и $(DETC)_2-Cu$ (b) в наблюдаемом сигнале. Процентами показаны средние уровни сигналов этих комплексов. Ось абсцисс — магнитное поле.

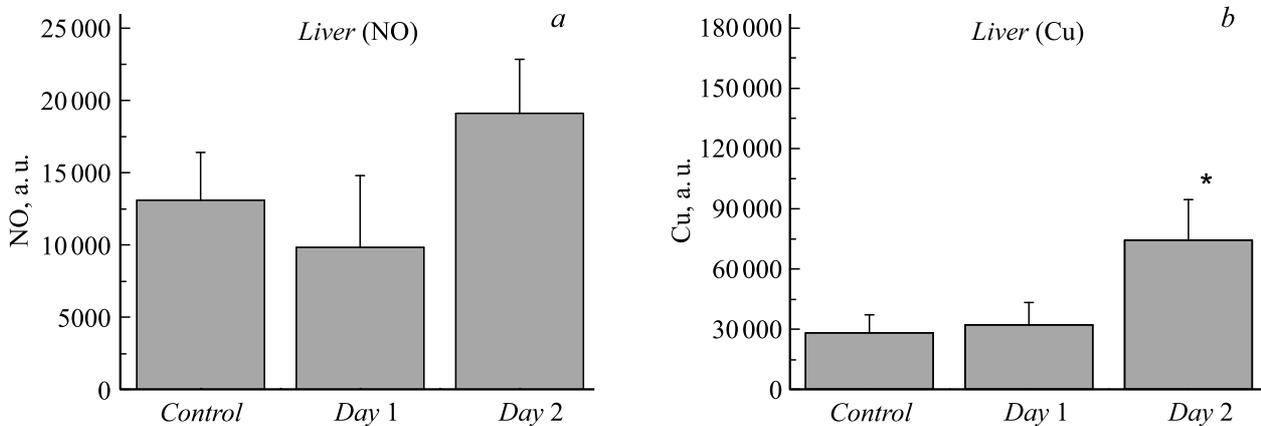


Рис. 4. Относительное содержание NO (a) и Cu (b) в тканях печени интактной крысы („Control“), крысы на следующий день („1 day“) и через 2 дня („2 days“) после моделирования ишемии мозга. Показаны: средние значения и стандартные ошибки среднего, * — отличие от контроля (t-test, $p < 0.05$). Ось ординат — средняя интегральная интенсивность (a.u.) сигнала комплексов $(DETC)_2-Fe^{2+}-NO$ и $(DETC)_2-Cu$.

продукция NO изменяется в тканях периферических органов сильнее, чем при ишемии мозга. В то же время изменение продукции NO в мозге при моделировании ишемии головного мозга и моделировании ишемии всего организма примерно одинаково. Есть предположение, что после всплеска продукции NO в первые часы [30,31] происходит истощение содержания L-аргинина, который был израсходован в начальные минуты, часы после

ишемии/гипоксии [32]. Возможно, по этой причине при моделировании ишемии всего организма снижение содержания NO на первые сутки в тканях более выражено.

Содержание меди на следующий день после моделирования ишемии головного мозга в тканях печени не изменялось (рис. 4, b), и наблюдалась тенденция к снижению в гиппокампе (рис. 5, b). Через 2 дня после моделирования ишемии головного мозга содержание меди недостато-

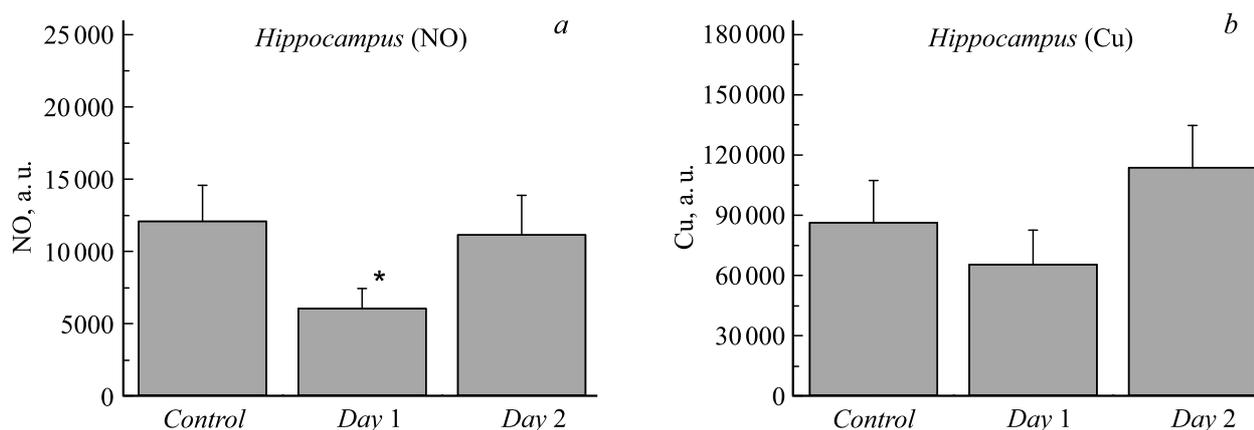


Рис. 5. Относительное содержание NO (a) и Cu (b) в тканях гиппокампа интактной крысы („Control“), крысы на следующий день („1 day“) и через 2 дня („2 days“) после моделирования ишемии мозга. Показаны: средние значения и стандартные ошибки среднего, * — отличие от контроля (t-test, $p < 0.05$). Ось ординат — средняя интегральная интенсивность (a.u.) сигнала комплексов $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ и $(\text{DETC})_2\text{-Cu}$.

верно увеличивалось в гиппокампе, а в тканях печени наблюдали увеличение в среднем в 2.5 раза. Дисмутирование супероксида с помощью цитозольного фермента Cu,Zn-COD (супероксиддисмутазы) является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления [10,12]. Нами показано, что содержание меди, ассоциируемое с содержанием супердисмутазы, в тканях печени и гиппокампе не изменяется через сутки после моделирования ишемии и увеличивается через 2 дня после моделирования ишемии (в печени достоверно). Это демонстрирует сохранение в течение этого времени активности системы антиоксидантной защиты, а на вторые сутки даже усиление в печени, которая может противодействовать гипоксическим факторам. Полученные результаты могут помочь в исследованиях основ для создания лекарств разнообразного терапевтического действия [33].

Заключение

Нами было проведено исследование интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в тканях печени, а также в гиппокампе крыс после ишемии мозга. Моделирование ишемии мозга осуществляли перевязкой общих сонных артерий; при такой методике осуществляется ишемическое воздействие только на мозг, а не на весь организм, как это бывает при гипобарической гипоксии (условный подъем на высоту). Полученные результаты показывают, что при моделировании ишемии всего организма продукция NO изменяется в тканях периферических органов сильнее, чем при ишемии мозга. В то же время продукция NO в мозге изменяется при моделировании ишемии мозга и моделировании ишемии всего организма примерно одинаково.

Финансирование работы

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 18-515-00003) и БРФФИ (грант Б18Р-227), измерение образцов за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Kumar H., Choi D.-K. // Mediators of Inflammation. 2015. ID 584758. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/584758>
- [2] Voronina T.A. // Rev. Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2016. Vol. 14. N 1. P. 63–70.
- [3] Lo E.H., Dalkara T., Moskowitz M.A. // Nat. Rev. Neurosci. 2003. Vol. 4. N 5. P. 399–415.
- [4] Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. // Trends Neurosci. 1999. Vol. 22. N 9. P. 391–397.
- [5] Novikov V.E., Katunina N.P. // Rev. Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2002. Vol. 1. N 2. P. 73–87.
- [6] Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M. // Stroke. Lancet. 2008. Vol. 371. P. 1612–1623.
- [7] LaManna J.C., Chavez J.C., Pichiule P. // J. Experim. Biol. 2004. Vol. 207. P. 3163–3169. DOI: 10.1242/jeb.00976
- [8] Doyle K.P., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P. // Neuropharmacology. 2008. Vol. 55. P. 310–318.
- [9] Manukhina E.B., Malyshev I.Y., Smirin B.V., Mashina S.Y., Saltykova V.A., Vanin A.F. // Nitric Oxide. 1999. Oct. Vol. 3. N 5. P. 393–401.
- [10] Steinert J.R., Chernova T., Forsythe I.D. // Neuroscientist. 2010. August. Vol. 16. N 4. P. 435–452. DOI: 10.1177/1073858410366481
- [11] Vanin A.F. // Nitric Oxide. 2016. Vol. 54. P. 15–29.
- [12] Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. P. 315–427.

- [13] Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Гурин В.Н. // УФН. 2007. Т. 38. № 4. С. 39–58.
- [14] Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S., Golubeva A.V., Davydova M.P., Jafarova G.G., Andrianov V.V., Koshelev V.B. // Appl. Magn. Resonance. 2011. Vol. 40. N 3. P. 267–278.
- [15] Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. // Exp. Biol. Med. 2006. Vol. 231. P. 343–365.
- [16] Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 2012. Vol. 32. N 7. P. 1332–1346.
- [17] Vanin A.F., Huisman A., Van Faassen E.E. // Methods in Enzymology. 2003. Vol. 359. P. 27–42.
- [18] Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R., Darley-Usmar V.M. // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 19699–19704.
- [19] Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J.B., Dinkova-Kostova A.T., Butterfield D.A. // Antioxidants and Redox Signaling. 2009. Vol. 11. P. 2717–2739.
- [20] Ismailova A.I., Gnezdilov O.I., Muranova L.N., Obynochny A.A., Andrianov V.V., Gainutdinov Kh.L., Nasyrova A.G., Nigmatullina R.R., Rahmatullina F.F., Zefirov A.L. // Appl. Magn. Reson. 2005. Vol. 28. P. 421–430.
- [21] Hogg N. // Radical Biology & Medicine. 2010. Vol. 49. P. 122–129.
- [22] Vanin A.F., Mordvintsev P.I., Kleshchev A.L. // Studia Biophys. 1984. Vol. 102. P. 135–143.
- [23] Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Июдин В.С., Юртаева С.В., Яфарова Г.Г., Файзуллина Р.И., Ситдииков Ф.Г. // Биофизика. 2013. Т. 58. № 2. С. 276–280. [Gainutdinov Kh.L., Andrianov V.V., Iyudin V.S., Yurtaeva S.V., Jafarova G.G., Faisullina R.I., Sitdikov F.G. // Biophys. 2013. Vol. 58. N 2. P. 203–205.]
- [24] Kleschyov A.L., Wenzel P., Munzel T. // J. Chromatography B. 2007. Vol. 851. P. 12–20.
- [25] Andrianov V.V., Pashkevich S.G., Yafarova G.G., Denisov A.A., Iyudin V.S., Bogodvid T.Kh., Dosina M.O., Kulchitsky V.A., Gainutdinov Kh.L. // Appl. Magn. Res. 2016. Vol. 47. N 9. P. 965–976.
- [26] Deryagin O.G., Gavrilova S.A., Gainutdinov Kh.L., Golubeva A.V., Andrianov V.V., Yafarova G.G., Buravkov S.V., Koshelev V.B. // Frontiers in Neuroscience. 2017. Vol. 11. N 427.
- [27] Shanko Y., Zamaro A., Takalchik S.Y., Koulchitsky S., Pashkevich S., Panahova E., Navitskaya V., Dosina M., Denisov A., Bushuk S., Kulchitsky V. // J. Sci. Tech. Res. 2018. Vol. 7. N 5. MSID.001567
- [28] Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф. // Биофизика. 1994. Т. 39. С. 915–918.
- [29] Van Faassen E.E., Koeners M.P., Joles J.A., Vanin A.F. // Nitric Oxide. 2008. Vol. 18. P. 279–286.
- [30] Sato S., Tominaga T., Ohnishi T., Ohnishi S.T. // Brain Res. 1994. Vol. 647. P. 91–96.
- [31] Tominaga T., Sato S., Ohnishi T., Ohnishi S.T. // J. Cerebral Blood Flow and Metabolism. 1994. Vol. 14. P. 715–722.
- [32] Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Швалев В.Н., Космачевская О.В., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Свиноа М.М., Косицын Н.С. // Успехи физиол. наук. 2012. Т. 43. № 4. С. 73–93.
- [33] Ванин А.Ф. // Биофизика. 2017. Т. 62. Вып. 4. С. 629–656. [Vanin A.F. // Biophys. 2017. Vol. 62. N 4. P. 509–531.]