

СОДЕРЖАНИЕ МОНООКСИДА АЗОТА И МЕДИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕПЕРФУЗИЕЙ

© 2024 г. Х.Л. Гайнутдинов*, **, В.В. Андрианов*, **, Г.Г. Яфарова*, **, Л.В. Базан*, Т.Х. Богодвид**, ***, В.С. Июдин*, Т.А. Филипович****, Ю.Г. Шанько****, Ю.П. Токальчик****, В.А. Кульчицкий****

*Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН, Сибирский тракт, 10/7, Казань, Республика Татарстан, 420029, Россия

**Казанский (Приволжский) федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

***Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма, Деревня Универсиады, 35, Казань, 420010, Россия

****Центр мозга Института физиологии НАН Беларуси, Академическая ул., 28, Минск, 220072 Беларусь

E-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Для определения содержания оксида азота (NO) и меди в гиппокампе здоровых крыс и крыс после моделирования ишемии использован метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Моделирование ишемии осуществляли как перевязкой сонных артерий, так и перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови. Методом ЭПР-спектроскопии регистрировали сигналы от комплексов (DETC)₂-Fe²⁺-NO и Cu(DETC)₂. Установлено достоверное снижение продукции NO в гиппокампе в среднем на 28% через сутки после моделирования ишемического инсульта, вызванного перевязкой сонных артерий, и на 56% при перевязке сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови. Содержание меди в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии перевязкой сонных артерий достоверно снизилось в среднем на 20%, после перевязки сонных артерий с забором крови наблюдалась тенденция к снижению содержания меди, однако вследствие большого разброса значений достоверность изменений отсутствовала. Таким образом, гипоксия головного мозга, вызываемая перевязкой сонных артерий, сопровождается снижением продукции NO в гиппокампе, а также признаками ослабления антиоксидантной системы, что дополнительно ухудшает функциональное состояние системы гомеостаза.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, спиновая ловушка, оксид азота, медь, гиппокамп, ишемия, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302924010146, EDN: QWHFIP

Монооксид азота (NO) является одной из ключевых сигнальных молекул, которые регулируют физиологические функции организма, включая нервную систему [1–3]. Исследования роли NO в жизнедеятельности организмов начались вскоре после обнаружения регуляции NO нормального сосудистого тонуса, как медиатора вазодилатации [4, 5]. Поскольку NO является химически вы-

сокореактивным свободным радикалом, способным выступать в роли как окислителя, так и восстановителя [6, 7], то возникает предположение об его многообразных эффектах в биологических тканях. Продемонстрировано, что NO участвует в различных функциях нервной системы, вовлекается в процессы нейромодуляции, выполняет функцию нейротрансмиттера, регулирует пролиферацию и дифференциацию нервных клеток [3, 8]. Показано, что функционирование системы NO нарушается при гипоксии и ишемии мозга, церебральная ишемия сопровождается множественными и разнонаправленными изменениями содержания NO в мозге и в передаче сигналов [9–

Сокращения: NO – монооксид азота, NOS – NO-синтаза, nNOS – нейрональная NO-синтаза, eNOS – эндотелиальная NO-синтаза, iNOS – индуцибельная NO-синтаза, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ДЭТК – диэтилдителиокарбамат.

11]. Таким образом, уточнение закономерностей изменений содержания NO в мозге при ишемических процессах в головном мозге является актуальным. Имеющиеся противоречивые сведения позволяют утверждать, что нет единого мнения о роли эндогенного NO в процессах, протекающих при повреждениях нервной системы [12].

Одной из причин такой ситуации является разнообразие источников NO. NO, самая маленькая из известных сигнальных молекул, продуцируется тремя изоформами NO-синтазы (NOS). Нейрональная NOS (nNOS) конститутивно экспрессируется в центральных и периферических нейронах, эндотелиальная NOS (eNOS) в основном экспрессируется в эндотелиальных клетках, а индуцибельная NOS (iNOS) способна экспрессироваться во многих типах клеток. Все они используют L-аргинин и молекулярный кислород в качестве субстратов и требуют несколько кофакторов, все NOS связывают кальмодулин и содержат гем [13]. В образовании NO участвуют не только NOS, но и нитритредуктазные системы, которые связаны с гемсодержащими белками, способными в дезокси-форме восстанавливать нитриты в NO [14, 15]. Также показано, что экзогенный низкомолекулярный динитрозильный комплекс железа с тиолсодержащими лигандами обладает широким спектром биологической активности, которая имитирует активность эндогенного NO [16]. Доказано, что функционирование NO в организме человека и животных обеспечивается его включением в динитрозильные комплексы железа, которые являются «рабочими формами» эндогенного NO, ответственного за его функционирование в качестве универсального регулятора основных метаболических процессов [17, 18].

Другой причиной противоречивых результатов является техническая сложность контроля уровня NO, поскольку NO образуется в процессе быстрых химических реакций с вовлечением широкого спектра молекул и посредников, среди которых металлы, тиолы, свободные радикалы, аминокислоты, кальций, кислород. Существует множество методов измерения продукции NO в биологических системах, но прецизионная оценка как стационарной концентрации NO, так и скорости ее генерации в биологических системах является сложной задачей вследствие невысоких активностей NOS и малого времени полужизни NO [19]. Одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [20, 21]. Это произошло благодаря методике, разработанной профессором А.Ф. Ваниным с сотрудниками [20, 22], в которой они использовали метод спинового захвата.

Важно отметить, что NO при взаимодействии с супероксидом (O_2^-) образует сильный окислитель пероксинитрит ($ONOO^-$) [9]. Основной клеточной защитой от супероксида и пероксинитрита является группа оксидоредуктаз, известных как супероксиддисмутазы, которые катализируют расщепление O_2^- на кислород и H_2O_2 [23]. Дисмутирование супероксида с помощью цитозольного фермента Cu,Zn-супероксиддисмутазы является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления.

Авторами предпринята попытка детализации некоторых биофизических закономерностей образования монооксида азота при ишемии головного мозга. Целью данной работы было исследование методом ЭПР-спектроскопии с применением спиновых ловушек интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в гиппокампе крыс вследствие экспериментального ишемического повреждения мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование ишемического инсульта у крыс. Животных содержали в стандартных условиях вивария (с поддержанием 12/12-часового ритма освещения и темноты, температуры воздуха 23°C и стабильной приточно-вытяжной вентиляцией) при свободном доступе к воде и пище (*ad libitum*) и одинаковом рационе питания в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Эксперименты проводили в светлое время суток на четырехнедельных самцах белых крыс (исходная масса 139–145 г). Животные были разделены на 3 группы (все группы по 10 особей в каждой). Первая группа («Контроль») – интактные крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям. Вторая группа («Ишемия 1») – наркотизированные крысы, подвергавшиеся 10-минутному нарушению кровотока путем аккуратного отделения блуждающего нерва от сонных артерий и перевязки шелковой нитью 4.0 обеих сонных артерий на уровне голосовых связок. Третья группа («Ишемия 2») – крысы, подвергавшиеся 10-минутному нарушению кровотока путем аналогичного отделения блуждающих нервов от сонных артерий и последующей перевязки обеих сонных артерий на уровне голосовых связок и взятию через две минуты из левой общей сонной артерии роstralнее перевязки 3 мл крови) [24–26]. Был применен следующий протокол экспериментов: в контрольной группе крысы находились в клетке в предоперационном помещении и не подвергались никаким воздействиям. Во второй группе («Ишемия 1») осуществляли под наркозом перевязку обеих сонных артерий на уровне голосовых связок путем наложения лигатур на 10 мин и за-

тем завершали обтурацию общих сонных артерий путем снятия лигатур через 10 мин после блокады кровотока. В третьей группе («Ишемия 2»), как и в группе «Ишемия 1», осуществляли перевязку обеих сонных артерий и взятие через 2 мин после начала обтурации из левой общей сонной артерии 3 мл крови. Все операционные процедуры проводили на наркотизированных животных (55.6 мг/кг кетамина, 5.5 мг/кг ксилазина, 1.1 мг/кг ацепромазина, внутривенно) [26, 27]. Через 24 ч от начала ишемии (ишемии-реперфузии) вводили компоненты спиновой ловушки (см. ниже). Смертность крыс после этих операций отсутствовала.

Подготовка образцов для измерения ЭПР-спектров. При подготовке образцов для измерения ЭПР-спектров авторы опирались на методику спиновых ловушек, предложенную профессором А.Ф.Ваниным с сотрудниками [20], с использованием комплекса Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом – $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$ [28, 29]. Как и ранее, ДЭТК-Na вводили внутривенно в дозе 500 мг/кг в 2.5 мл воды [30]. Смесь растворов сульфата железа ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma, США) в дозе 37.5 мг/кг и цитрата натрия в дозе 187.5 мг/кг (в объеме 1 мл воды на 300 г массы животного), приготовленную непосредственно перед введением, вводили подкожно в 3 точки – правое и левое бедра и ретроахиллярную часть межлопаточной области. В смеси сульфата железа и цитрата натрия образуется цитрат железа. ДЭТК-Na и цитрат железа распределяются по организму и при взаимодействии образуют нерастворимый в воде комплекс ДЭТК-Fe^{2+} [20]. Комплекс спиновой ловушки с NO характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора, равным 2.038, и триплетной сверхтонкой структурой. Кроме того, спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя комплекс $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$, который также может быть зарегистрирован методом ЭПР-спектроскопии [31].

Через 30 мин после введения компонента спиновой ловушки осуществляли забор тканей гиппокампа (один образец массой порядка 100 мг). Выбранные участки немедленно замораживали при температуре жидкого азота и транспортировали из Минска в Казань в пластиковых контейнерах с сухим льдом для измерений методом ЭПР-спектроскопии. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$) в таком состоянии хорошо сохраняется, сигнал от комплекса не изменяется не менее месяца.

Измерения ЭПР-спектров. Измерения спектров комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ и $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$ проводили на спектрометрах фирмы Брукер X диапазона (9.50 ГГц) EMX/plus с температурной

приставкой ER 4112HV и ER 200 SRC при модуляции магнитного поля 100 кГц, амплитуды модуляции 2 Гс, мощности СВЧ-излучения 30 мВт, временной константе 200 мс и температуре 77°K в пальчиковом сосуде Дьюара фирмы Bruker (США). 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 100 мг. Амплитуду спектров ЭПР всегда нормировали на вес образца (подробности методики измерений сигналов ЭПР описаны нами ранее [32]).

Статистическая обработка результата. Результат представлен в виде $M \pm m$ (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего). Статистическую обработку данных проводили с применением t -критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом ЭПР-спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции монооксида азота и содержания меди в гиппокампе при моделировании ишемии в модели неполной глобальной ишемии с перевязкой 2 сонных артерий на 10 мин у крыс двух групп («Ишемия 1» и «Ишемия 2»). В группе «Ишемия 1» моделировали ишемию головного мозга путем перевязки двух сонных артерий на 10 мин, а в группе «Ишемия 2» моделировали ишемию в модели реперфузии (помимо обтурации общих сонных артерий на 10 мин осуществляли взятие из общей сонной артерии 3 мл крови) длительностью 1 сутки после осуществления неполной глобальной ишемии с перевязкой двух сонных артерий на 10 мин. Сопоставляли полученные данные в группах «Ишемия 1» и «Ишемия 2» с данными контрольной группы крыс, которые не подвергались гипоксическим воздействиям и находились на стандартном рационе в виварии.

На рис. 1а показан спектр ЭПР гиппокампа контрольной крысы и крысы после моделирования ишемии, вызванной перевязкой на 10 мин обеих сонных артерий (группа «Ишемия 1»). На этом спектре виден характерный триплетный сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ со значением g -фактора, равным 2.038 [28]. Кроме того, в этой же области присутствует сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$. На рис. 1б представлены спектры ЭПР тканей гиппокампа здоровой (контрольной) крысы, а также крысы через сутки после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови (модель «Ишемия 2») Сплошной линией представлен спектр образца,

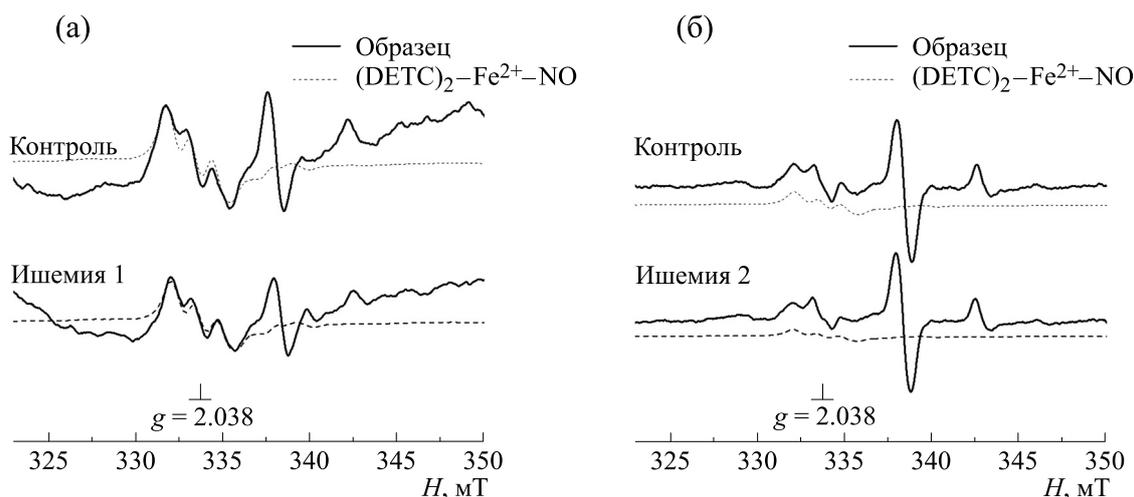


Рис. 1. Примеры спектров ЭПР гиппокампа контрольных крыс, крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий («Ишемия 1»), и крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови («Ишемия 2»).

прерывистой линией – сигнал от оксида азота, связанного со спиновой ловушкой, в составе спектра комплекса $(DETC)_2-Fe^{2+}-NO$. Относительное изменение количества NO-содержащего комплекса и комплекса $Cu(ДЭТК)_2$ оценивали по интегральной интенсивности сигнала от этих комплексов.

На рис. 2а приведены статистические данные по изменению интегральной интенсивности сигналов $(DETC)_2-Fe^{2+}-NO$ в спектрах исследованных образцов биологических тканей. Результаты анализа демонстрируют достоверное ($p < 0.05$) снижение продукции NO после моделирования

ишемии в гиппокампе («Ишемия 1»), вызванной перевязкой сонных артерий (в среднем на 28%), и более выраженное снижение продукции NO (в среднем на 56%) при перевязке сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови («Ишемия 2»). На рис. 2б приведены статистические данные по интегральным интенсивностям сигнала $Cu(ДЭТК)_2$ в спектрах исследованных образцов. Результаты показывают, что содержание меди в гиппокампе через сутки у животных второй группы достоверно ($p < 0.05$) снижается в среднем на 20%, в третьей группе также наблюдалось уменьшение содержания меди, однако вследствие большого разброса значений из-

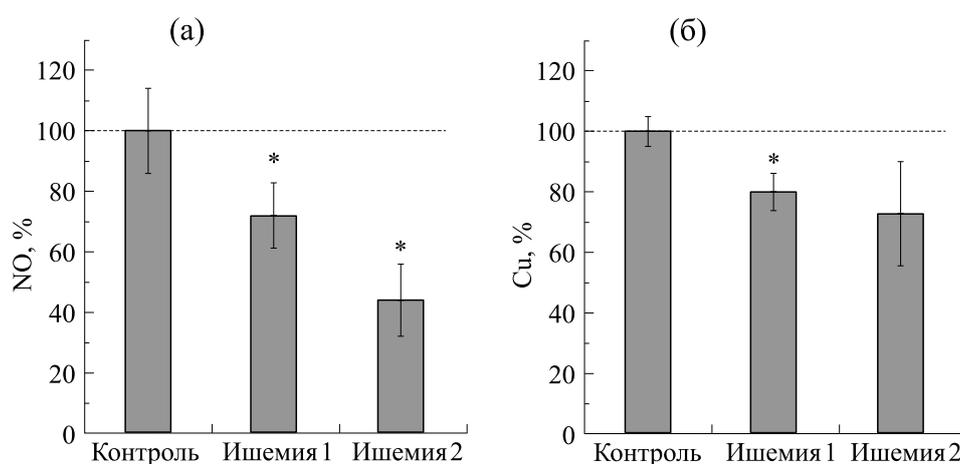


Рис. 2. Относительное содержание NO (а) и меди (б) (в % по отношению к контролю) в гиппокампе крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий («Ишемия 1»), и крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови («Ишемия 2»); * – $p < 0.05$.

менение было статистически недостоверным. Таким образом, ишемия головного мозга, вызываемая перевязкой сонных артерий, сопровождается снижением продукции NO в гиппокампе, а также признаками ослабления антиоксидантной системы гиппокампа, что в совокупности дополнительно ухудшает функциональное состояние нервной системы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Инсульт мозга является ведущей причиной смерти и наиболее частой причиной инвалидности во всем мире [33, 34]. Известно, что гипоксия сопровождается нарушениями снабжения кислородом отделов мозга, что ведет к ишемии мозга, которая часто завершается ишемическим инсультом. С одной стороны, развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с ослаблением церебрального кровотока, а также с нарушениями регуляции кровоснабжения тканей мозга системой NO [10, 35]. С другой стороны, гипоксия, возникшая в результате ишемического инсульта, сопровождается повреждением тканей мозга и нарушением его функций [36]. Ослабление снабжения кислородом отделов мозга возникает также при тромбировании сосуда или разрыве аневризмы, что часто завершается ишемическим или геморрагическим инсультом [37, 38]. В этих процессах гипоксии-ишемии роль NO по результатам исследований представляется противоречивой: NO способен выполнять как нейротоксические, так и нейропротекторные функции [12, 39–41].

Авторами методом ЭПР-спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции монооксида азота и содержания меди (как показателя первой и третьей субъединиц супероксиддисмутазы) в гиппокампе крыс после моделирования ишемии головного мозга. В работе использован разработанный профессором А.В. Ваниным с сотрудниками [20, 28] метод, в котором применяется спиновая ловушка, представляющая нерастворимый в воде комплекс $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$, который способен взаимодействовать с NO с образованием стабильного радикала $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, регистрируемого методом ЭПР-спектроскопии. Типичные спектры ЭПР замороженных образцов (в нашем случае гиппокампа) представляют сигнал ЭПР с $g_{\perp} = 2,038$, $g_{\parallel} = 2,01$ и триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} . Спектр соответствует типичному комплексу радикала NO с ловушкой DETC. На это указывают значение g -фактора сигнала ЭПР и расщепление вследствие взаимодействия с ядром азота. Значение g -фактора и константы сверхтонкого взаимодействия с азотом находятся в соответствии с данными, полученными в работах А.Ф. Ванина и др.

[20]. Ранее было найдено, что спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя комплекс $\text{Cu}(\text{DETC})_2$, который также определяется методом ЭПР-спектроскопии [31]. Авторы продемонстрировали присутствие сигнала от меди в проведенных измерениях. Показано, что содержание меди, ассоциируемое с содержанием супероксиддисмутазы, в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии либо снижалось, либо имело тенденцию к снижению. Данный результат свидетельствует о снижении эффективности антиоксидантной системы в данных моделях.

Полученные в проведенной работе результаты измерения содержания монооксида азота и меди демонстрируют, что гипоксия мозга сопровождается снижением продукции NO в гиппокампе, которое зависит от тяжести воздействия. При этом регистрируется достоверное снижение содержания меди либо тенденция к снижению. Этот результат позволяет считать, что моделируемая здесь гипоксия сопровождается не только снижением продукции NO, но и признаками ослабления антиоксидантной системы гиппокампа, что дополнительно ухудшает функциональное состояние системы.

В ишемии/реперфузионном повреждении головного мозга решающую роль играют окислительный стресс и воспаление. Окислительный стресс вызывается активными формами кислорода во время ишемии головного мозга и с большей вероятностью приводит к гибели клеток и в конечном счете к повреждению мозга после реперфузии [42]. Активация антиоксидантных ферментов является одним из путей защиты от высокотоксичных кислородных радикалов. Большинство из них связано с медь-содержащими ферментами [43, 44]. Это, прежде всего, Cu,Zn-супероксиддисмутаза и цитохром c -оксидаза [44–46]. Цитохром c -оксидаза — это фермент дыхательной цепи переноса электронов, которая катализирует перенос электронов с цитохрома c на кислород. Дисмутирование супероксида (O_2^-) с помощью цитозольного фермента супероксиддисмутазы является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления [23]. Она играет важнейшую роль в антиоксидантной защите практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом. Таким образом, баланс меди в нервной системе необходим для ее нормального функционирования.

Роль NO в развитии ишемии давно привлекает внимание исследователей. Так, при измерении активности NO-синтаз показано, что уже через 10 мин после начала ишемии мозга наблюдается увеличение активности нейрональной NOS [47], а затем начинается экспрессия индуцибельной NOS [48], селективное блокирование которой может являться нейропротекторным фактором

при ишемии [11]. Аналогичный результат усиления продукции NO в первые минуты был получен методом спектроскопии ЭПР [49]. Также показано двукратное увеличение продукции NO в полушариях мозга крысы в модели глобальной ишемии [46]. Были выявлены нейропротекторные свойства доноров NO после кратковременного и постоянного ишемического поражения [39, 51–53]. Авторами ранее на другой модели обнаружено снижение содержания NO после моделирования ишемического инсульта в ишемизированной части коры левого полушария крыс [32].

Гипоксический или ишемический стресс вызывает множество серьезных травм головного мозга, включая инсульт и неонатальную гипоксию ишемической энцефалопатии. Во время процессов гипоксии и ишемии головного мозга NO выполняет нейротоксическую либо нейропротекторную роль в зависимости от таких факторов, как изоформа NOS, тип клеток, с помощью которых вырабатывается NO, и временная стадия после начала гипоксически-ишемического повреждения головного мозга [35, 38, 54, 55]. NO обладает двойной идентичностью, включая нейропротекцию и нейротоксичность во время ишемии-реперфузии. Чрезмерная выработка NO может быть нейротоксичной, приводя к каскадным реакциям эксайтотоксичности, воспалению, апоптозу и ухудшению первичной травмы головного мозга. Напротив, NO, вырабатываемый эндотелиальными NOS, играет нейропротекторную роль, поддерживая мозговой кровоток и предотвращая повреждение нейронов, а также ингибируя адгезию тромбоцитов и лейкоцитов. Иногда индуцируемые NO-производные NOS и нейрональные NOS в отдельных областях мозга также могут играть нейропротекторную роль [34, 55].

Существует множество причин такого разнообразия функций NO. Во-первых, кроме синтеза NO-синтазами, как основного источника NO [3, 10], существует также нитроредуктазная компонента цикла NO, когда NO образуется из нитритов и нитратов [14, 38]. Во-вторых, существует значительное число депо для NO, которые взаимодействуют с комплексами, содержащими железо (например, гемовые структуры), с тиолами и другими соединениями [27, 56, 57]. Значительная роль NO во многих процессах, в том числе и в деятельности нервной системы, а также недостаточность сведений о количестве синтезируемого NO и его функциях при различных патологиях предопределяют значимость дальнейших исследований в данном направлении. Решение вопроса о динамике продукции NO в тканях при развитии различных процессов, включая патологические, представляется чрезвычайно актуальным и может способствовать выработке новых подходов к фармакологической коррекции возникающих нарушений в ткани мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ЭПР-спектроскопии регистрировали сигналы от тройных комплексов (DETC)₂-Fe²⁺-NO и комплекса Cu(DETC)₂. Преимуществом применения данного метода является высокая чувствительность за счет применения спиновых ловушек, что позволяет проводить измерения низких концентраций определяемых соединений. На основе прямых измерений методом ЭПР-спектроскопии показано достоверное снижение на 28% продукции NO в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии перевязкой сонных артерий и на 56% в случае перевязки сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови. Содержание меди в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии перевязкой сонных артерий достоверно снизилось на 20%, снижение содержания меди через сутки после перевязки сонных артерий с забором крови показало отсутствие достоверности при большем разбросе значений. Логично заключить, что применение метода ЭПР-спектроскопии позволило определить не только изменение продукции оксида азота в гиппокампе при моделировании ишемии головного мозга, но и в тех же тканях выявить признаки ослабления антиоксидантной системы по содержанию меди как показателя содержания супероксиддисмутазы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Моделирование ишемии проводили в Центре мозга (Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь), работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант № M23РНФ-067). Измерения спектров ЭПР образцов и их обработку проводили в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН, работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-45-10004. Хранение образцов и часть обработки результатов проводили в КФУ за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («Приоритет – 2030»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись в соответствии с норма-

ми обращения с животными, регламентированными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей. Моделирование ишемии и ишемии-реперфузии проводили в Институте физиологии НАН Беларуси (г. Минск) в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике Института.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. *Биохимия*, **63** (7), 924–938 (1998).
2. Ситдикова Г. Ф. и Зефилов А. Л. Газообразные посредники в нервной системе. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **92**, 872–882 (2006).
3. Steinert J. R., Chernova T., and Forsythe I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*, **16** (4), 435–452 (2010). DOI: 10.1177/1073858410366481
4. Ignarro L. J., Cirino G., Casini A., and Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **34** (6), 879–886 (1999). DOI: 10.1097/00005344-199912000-00016.
5. Lakomkin V. L., Vanin A. F., Timoshin A. A., Kapelko V. I., and Chazov E. I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiolcontaining ligands in conscious normotensive and hypertensive rats. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **16** (4), 413–418 (2007).
6. Thomas D. D., Ridnour L. A., Isenberg J. S., Flores-Santana W., Switzer C. H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolucci N., Ambs S., Colton C. A., Harris C. C., Roberts D. D., and Wink D. A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **45** 18–31 (2008).
7. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a base for new-generation drugs (Review). *Open Conf. Proc. J.*, **4** 31–37 (2013).
8. Hardingham N., Dachtler J., and Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 190 (2013). DOI: 10.3389/fncel.2013.00190
9. Pacher P., Beckman J. S., and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**, 315–427 (2007).
10. Terpolilli N. A., Moskowitz M. A., and Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **32** (7), 1332–1346 (2012).
11. Bolanos J. P. and Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim. Biophys. Acta*, **1411** (2–3), 415–436 (1999).
12. Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J. B., Dinkova-Kostova A. T., and Butterfield D. A. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants and Redox Signaling*, **11**, 2717–2739 (2009).
13. Forstermann U. and Sessa W. C., Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.*, **33** 829–837 (2012). DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304
14. Реутов В. П., Охотин В. Е., Шуклин А. В., Сорокина Е. Г., Косицын Н. С. и Гурин В. Н. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты. *Успехи физиол. наук*, **38** (4), 39–58 (2007).
15. Sparacino-Watkins C. E., Tejero J., Sun B., Gauthier M. C., Thomas J., Ragireddy V., Merchant B. A., Wang J., Azarov I., Basu P., and Gladwin M. T. Nitrite Reductase and Nitric-oxide Synthase Activity of the Mitochondrial Molybdopterin Enzymes mARC1 and mARC2. *J. Biol. Chem.*, **289** (15), 10345–10358 (2014). DOI: 10.1074/jbc.M114.555177
16. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. Sh., Serezhnikov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO-donors. *Nitric Oxide*, **29**, 4–16 (2013).
17. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, **54**, 15–29 (2016).
18. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут как доноры катионов нитрозония подавлять вирусные инфекции (гипотеза). *Биофизика*, **65** (4), 818–823 (2020).
19. Csonka C., Pali T., Bencsik P., Gorbe A., Ferdinandy P., and Csont T. Measurement of NO in biological samples. *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1620–1632 (2015).
20. Vanin A. F., Huisman A., and Van Faassenm E. E. Iron Dithiocarbamate as Spin Trap for Nitric Oxide Detection: Pitfalls and Successes. *Methods Enzymol.*, **359**, 27–42 (2003).
21. Hogg N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 122–129 (2010).
22. Vanin A. F., Mordvintcev P. I., and Kleschyov A. L. Appearance of nitrogen oxide in animal tissues in vivo. *Studia Biophysica*, **102**, 135–143 (1984).
23. Fukai T. and Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.*, **15** (6), 1583–1606 (2011). DOI: 10.1089/ars.2011.3999
24. Roch M., Messlinger K., Kulchitsky V. A., Tichonovich O. G., Azev O. A., and Koulchitsky S. V. Ongoing activity in trigeminal wide-dynamic range neurons is driven from the periphery. *Neuroscience*, **150** (3), 681–691 (2007).
25. Kulchitsky V., Semenik T., Kaliadzich Z., Andrianova T., and Tsishkevich K., The analysis of chemosensitive structures contribution to obstructive sleep apnea development. *Clin. Neurophysiol.*, **125**, S330–S331 (2014). DOI: 10.1016/S1388-2457(14)51089-9
26. Shanko Y., Zamaro A., Takalchik S. Y., Koulchitsky S., Pashkevich S., Panahova E., Navitskaya V., Dosina M.,

- Denisov A., Bushuk S., and Kulchitsky V. Mechanisms of Neural Network Structures Recovery in Brain Trauma Biomed. *J. Sci. Tech. Res.*, **7** (5), MS.ID.001567 (2018).
27. Deryagin O. G., Gavrilova S. A., Gainutdinov Kh. L., Golubeva A. V., Andrianov V. V., Yafarova G. G., Buravkov S. V., and Koshelev V. B., Molecular bases of brain preconditioning. *Front. Neurosci.*, **11**, 427 (2017). DOI: 10.3389/fnins.2017.00427
28. Микоян В. Д., Кубрина Л. Н. и Ванин А. Ф. Оксид азота образуется через L-аргинин зависимый путь в мозге мышей *in vivo*. Биофизика, **39**, 915–918 (1994).
29. Гайнутдинов Х. Л., Андрианов В. В., Июдин В. С., Юртаева С. В., Яфарова Г. Г., Файзуллина Р. И. и Ситдииков Ф. Г. Исследование методом ЭПР спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в организме крыс при гипокинезии. Биофизика, **58** (2), 276–280 (2013).
30. Ismailova A. I., Gnezdilov O. I., Muranova L. N., Obnochny A. A., Andrianov V. V., Gainutdinov Kh. L., Nasyrova A. G., Nigmatullina R. R., Rahmatullina F. F., and Zefirov A. L. ESR Study of the Nitric Oxide Production in Tissues of Animals under the External Influence on the Functioning of the Cardiovascular and Nervous Systems. *Appl. Magn. Res.*, **28**, 421–430 (2005).
31. van Faassen E. E., Koeners M. P., Joles J. A., and Vanin A. F. Detection of basal NO production in rat tissues using iron–dithiocarbamate complexes. *Nitric Oxide*, **18**, 279–286 (2008).
32. Gainutdinov Kh. L., Gavrilova S. A., Iyudin V. S., Golubeva A. V., Davydova M. P., Jafarova G. G., Andrianov V. V., and Koshelev V. B. EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke. *Appl. Magn. Res.*, **40** (3), 267–278 (2011).
33. Donnan G. A., Fisher M., Macleod M., and Davis S. M. Stroke. *Lancet*, **371**, 1612–1623 (2008). DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7
34. Wierónska J. M., Ciéslik P., and Kalinowski L. Nitric Oxide-Dependent Pathways as Critical Factors in the Consequences and Recovery after Brain Ischemic Hypoxia. *Biomolecules*, **11** (8), 1097 (2021). DOI: 10.3390/biom11081097
35. Chen Z. Q., Mou R. T., Feng D. X., Wang Z., and Chen G. The role of nitric oxide in stroke. *Med. Gas. Res.*, **7** (3), 194–203 (2017).
36. Doyle K. P., Simon R. P., and Stenzel-Poore M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, **55**, 310–318 (2008).
37. Liu L. X., Yang Y. J., Jia Y. J. A model of hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rats. *Bull. Hunan Med. University*, **28** (2), 133–136 (2003).
38. Garry P. S., Ezra M., Rowland M. J., Westbrook J., and Pattinson K. T. S. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment – From bench to bedside. *Experim. Neurol.*, **263**, 235–243 (2015).
39. Godinez-Rubi M., Rojas-Mayorquin A. E., and Ortuño-Sahagun D. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2013**, 297357, (2013). DOI: 10.1155/2013/297357
40. Дерягин О. Г., Гаврилова С. А., Буравков С. В., Андрианов В. В., Яфарова Г. Г., Гайнутдинов Х. Л. и Кошелев В. Б. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов и оксида азота в защитном эффекте preconditionирования мозга. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **116** (8), 17–23 (2016). DOI: 10.17116/jnevro20161168217-23
41. Andrianov V. V., Pashkevich S. G., Yafarova G. G., Denisov A. A., Iyudin V. S., Bogodvid T. K., Dosina M. O., Kulchitsky V. A., and Gainutdinov Kh. L. Changes of nitric oxide content in the rat hippocampus, heart and liver in acute phase of ischemia. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (9), 965–976 (2016).
42. Wu L., Xiong X., Wu X., Ye Y., Jian Z., Zhi Z., and Gu L. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 28 (2020). DOI: 10.3389/fnmol.2020.00028
43. Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Kozyreva T., Zovo K., and Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, **465**, 645–648 (2010).
44. Festa R. A. and Thiele D. J. Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol.*, **21** (21), R877–R883 (2011).
45. Miller A.-F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.*, **586**, 585–595 (2012).
46. Sheng Y., Abreu I. A., Cabelli D. E., Maroney M. J., Miller A.-F., Teixeira M., and Valentine J. S. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.*, **114**, 3854–3918 (2014). DOI: 10.1021/cr4005296
47. Samdani A. F., Dawson T. M., and Dawson V. L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, **28**, 1283–1288 (1997).
48. Iadecola C., Zhang F., Casey R., Nagayama M., and Ross M. E. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci.*, **17**, 9157–9164 (1997).
49. Sato S., Tominaga T., Ohnishi T., and Ohnishi S. T., Electron paramagnetic resonance study on nitric oxide production during brain focal ischemia and reperfusion in the rat. *Brain Res.*, **647** (1), 91–96 (1994).
50. Fadiukova O. E., Alekseev A. A., Bashkatova V. G., Tolordava I. A., Kuzenkov V. S., Mikoian V. D., Vanin A. F., Koshelev V. B., and Raevskii K. S. Semax prevents elevation of nitric oxide generation caused by incomplete global ischemia in the rat brain. *Eksp. Klin. Farmakol.*, **64** (2), 31–34 (2001).
51. Willmot M., Gray L., Gibson C., Murphy S., and Bath P. M. A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow. *Nitric Oxide*, **12**, 141–149 (2005).
52. Jung K. H., Chu K., Ko S. Y., Lee S. T., Sinn D. I., Park D. K., Kim J. M., Song E. C., Kim M., and Roh J. K. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against *in vivo* ischemia-reperfusion injury. *Stroke*, **37**, 2744–2750 (2006).

53. Evgenov O. V., Pacher P., Schmidt P. M., Haskó G., Harald H., Schmidt H. W., and Stasch J.-P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature Rev. Drug Discov.*, **5**, 755–768 (2006). DOI: 10.1038/nrd2038
54. Prajapati K. D., Devarakonda C. B., Joshi A. R., Sharma S. S., and Roy N. Role of nitric oxide synthases in cerebral ischemia. *Curr. Res. Information Pharmaceut. Sci.* **11** (3), 50–56 (2011).
55. Haiting L., Jiao L., Fengyan Z., Huiqing W., Yi Q., De-zhi M., Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev. Neurosci.*, **26** (1), 105–117 (2015). DOI: 10.1515/revneuro-2014-0041
56. Yurtaeva S. V., Efimov V. N., Yafarova G. G., Ereemeev A. A., Iyudin V. S., Rodionov A. A., Gainutdinov Kh. L., and Yatsyk I. V. EPR Detection of Iron Storage in Rat Tissues After Simulated Microgravity Model. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (6), 555–565 (2016).
57. Prusakov V. E., Maksimov Y. V., Burbaev D. Sh., Serezhnikov V. A., Borodulin R. R., Tkachev N. A., Mikoyan V. D., and Vanin A. F. EPR and mössbauer characteristics of aqueous solutions of ^{57}Fe -dinitrosyl iron complexes with glutathione and hydroxyl ligands. *Appl. Magn. Reson.*, **50** (7), 861–881 (2019).

Content of Nitrogen Monoxide and Copper in the Hippocampus of a Rat Model of Short-Term Cerebral Ischemia Followed by Reperfusion

Kh.L. Gainutdinov*, ******, **V.V. Andrianov***, ******, **G.G. Yafarova***, ******, **L.V. Bazan***, **T.K. Bogodvid****, *******, **V.S. Iyudin***, **T.A. Filipovich******, **Yu.G. Shanko******, **Yu.P. Tokalchik******, and **V.A. Kulchitsky******

**E.K. Zavoisky Kazan Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences, Sibirsky tract 10/7, Kazan, Tatarstan, 420029 Russia*

***Kazan (Volga Region) Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia*

****Volga Region State University of Physical Culture, Sport and Tourism, Derevnya Universiady 35, Kazan, 420010 Russia*

*****Brain Center, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya ul. 28, Minsk, 220072 Belarus*

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used to determine the content of nitric oxide (NO) and copper in the hippocampus of healthy rats and rat models of ischemia. The rat model of ischemia was established via both carotid arteries ligation and ligation of the carotid arteries with subsequent withdrawal of a 3 ml of blood from the common carotid artery. The EPR signals of the $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ and $\text{Cu}(\text{DETC})_2$ complexes were recorded. The NO level in the hippocampus showed a significantly drop by an average of 28% one day after modeling ischemic stroke caused by carotid artery ligation and by 56% in the rat model of ischemia established via ligation of the carotid arteries with subsequent withdrawal of a 3 ml of blood from the common carotid artery. The copper content decreased significantly in the hippocampus by an average of 20% one day after modeling ischemia by ligation of the carotid arteries and our findings indicate that the copper content tends to decrease in the rat model of ischemia established via ligation of the carotid arteries with subsequent withdrawal of blood. High variability couldn't tell us if there was a significant difference between groups, though. Thus, brain hypoxia of rats subjected to carotid arteries ligation is accompanied not only by a decrease in NO production in the hippocampus, but also by signs of a weakening of the antioxidant system, thus, worsening conditions for the maintenance of homeostasis.

Keywords: electron paramagnetic resonance, spin trap, nitric oxide, copper, hippocampus, ischemia, hypoxia