

УДК 577.334.61: 616.831-005.4: 612.861
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-2-77-86

В. В. АНДРИАНОВ¹, В. А. КУЛЬЧИЦКИЙ², Г. Г. ЯФАРОВА^{1, 3},
Ю. П. ТОКАЛЬЧИК², А. С. ЗАМАРО², Л. В. БАЗАН¹,
Т. Х. БОГОДВИД^{3, 4}, В. С. ИЮДИН¹, С. Г. ПАШКЕВИЧ²,
М. О. ДОСИНА², Х. Л. ГАЙНУТДИНОВ¹

Содержание оксида азота и меди в обонятельной луковице мозга крыс после моделирования ишемии головного мозга и интраназального введения мезенхимальных стволовых клеток

¹ Казанский физико-технический институт им. Е. К. Завойского, г. Казань, Россия
420029, Казань, ул. Сибирский тракт, д. 10/7

² Государственное научное учреждение «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
Беларусь, Минск, Академическая ул., д. 28

³ Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия
Россия, г. Казань, Кремлевская ул., д. 18

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма» Министерства спорта Российской Федерации, г. Казань, Россия
420010, Россия, г. Казань, Деревня Универсиады, д. 35
E-mail: slava_snail@yahoo.com

Статья поступила в редакцию 03.02.21 г.; принята к печати 02.04.21 г.

Резюме

Введение. При снижении содержания кислорода во вдыхаемом воздухе, нарушениях церебрального кровотока наступает ишемия мозга, которая может завершиться ишемическим инсультом. **Цель** – проведение сравнительного анализа интенсивности продукции оксида азота (NO) и содержания меди в тканях обонятельной луковицы мозга крыс-самцов линии «Вистар» после моделирования ишемического инсульта. **Материалы и методы.** Моделирование ишемического инсульта лигированием на уровне бифуркации обеих общих сонных артерий и измерение содержания NO и меди методом ЭПР-спектроскопии. **Результаты.** Относительное изменение количества NO-содержащих комплексов и содержания меди оценивали по интегральной интенсивности сигнала комплексов (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO и (ДЭТК)₂-Cu. В группе ишемизированных крыс обнаружено достоверное снижение содержания NO в обонятельной луковице мозга крыс на 47 % через 1 и на 57 % через 2 суток соответственно после моделирования ишемии. Уровень продукции NO у крыс, которым моделирование ишемии было проведено с одновременным интраназальным введением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) также был сниженным – на 51 % через 1 и на 70 % через 2 суток соответственно после моделирования ишемии. Не выявлено достоверного отличия содержания NO у крыс, которым проводили моделирование ишемии с одновременным интраназальным введением МСК, относительно ишемизированных крыс. Содержание меди, которое соответствует уровню супероксиддисмутаза 1 и 3, в обонятельной луковице крысы имело тенденцию к увеличению после моделирования ишемии и сохранялось на протяжении 2 дней наблюдения (увеличение на 50 % в обоих случаях). Интраназальное введение МСК сопровождалось достоверным увеличением содержания Cu (на 89 %) через 1 день после моделирования ишемии, а через 2 дня – уменьшением его содержания на 36 % (по сравнению с контролем). У контрольных животных, которые не подвергались хирургическим операциям, изменений содержания NO и меди не наблюдалось. **Заключение.** Проведенные опыты показали снижение содержания NO в обонятельной луковице мозга крыс в 2 раза через 1 и 2 суток после моделирования ишемии и продемонстрировали, что интраназальное введение МСК не влияет на интенсивность продукции NO на 1-й и 2-й дни после моделирования ишемии мозга, однако сопровождается повышением антиоксидантной защиты нервной ткани через 1 день после ишемии.

Ключевые слова: ишемия, гипоксия, оксид азота, медь, электронный парамагнитный резонанс, спиновая ловушка, мезенхимальные стволовые клетки

Для цитирования: Андрианов В. В., Кульчицкий В. А., Яфарова Г. Г., Токальчик Ю. П., Замаро А. С., Базан Л. В., Богодвид Т. Х., Июдин В. С., Пашкевич С. Г., Досина М. О., Гайнутдинов Х. Л. Содержание оксида азота и меди в обонятельной луковице мозга крыс после моделирования ишемии головного мозга и интраназального введения мезенхимальных стволовых клеток. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021; 20(2): 77–86. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-2-77-86.

V. V. ANDRIANOV¹, V. A. KULCHITSKY², G. G. YAFAROVA^{1, 3},
 Yu. P. TOKALCHIK², A. S. ZAMARO², L. V. BAZAN¹,
 T. Kh. BOGODVID^{3, 4}, V. S. IYUDIN¹, S. G. PASHKEVICH²,
 M. O. DOSINA², Kh. L. GAINUTDINOV¹

Content of nitric oxide and copper in the olfactory bulbs of the rats brain after modeling of cerebral stroke and intranasal administration of mesenchymal stem cells

¹ Zavoisky Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Kazan

10/7, Sibirsky tract, Kazan, Russia, 420029

² Brain Center, Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

8, Akademicheskaya str., Minsk, Belarus

³ Kazan Federal University, Kazan, Russia

18, Kremlyovskaya str., Kazan, Russia

⁴ Volga Region State Academy of Physical Culture, Sport and Tourism, Kazan, Russia

35, Derevnya Universiadi, Kazan, Russia, 420010

E-mail: slava_snail@yahoo.com

Received 03.02.21; accepted 02.04.21

Summary

Introduction. With a decrease in the oxygen content in the inhaled air, violations of the cerebral blood flow, brain ischemia occurs, which can end in an ischemic stroke. **Aim.** Comparative analysis of the intensity of nitric oxide (NO) production and the copper content in the olfactory bulb tissues of the brain of male Wistar rats after modeling an ischemic stroke. **Materials and methods.** Modeling of ischemic stroke by ligation at the bifurcation level of both common carotid arteries and measuring the content of NO and copper by EPR spectroscopy. **Results.** The relative changes in the number of NO-containing complexes and the copper content were estimated from the integrated signal intensity of the complexes (DTC)2-Fe²⁺-NO and (DTC)2-Cu. A significant decrease by 47 % after 1 and 57 % after 2 days, respectively, in the NO content in the olfactory bulb of the rat brain was found after the ischemia modeling. The level of NO production in rats that underwent ischemia simulation with simultaneous intranasal administration of mesenchymal stem cells (MSCs) was also reduced by 51 % after 1 and 70 % after 2 days, respectively, after ischemia modeling. There was no significant difference in the NO content in the rats after ischemia modeling with simultaneous intranasal administration of MSCs compared to the ischemic rats. The copper content, which corresponds to the level of superoxide dismutase 1 and 3, in the rat's olfactory bulb tended to increase after ischemia modeling and it persisted for two days of observation (an increase of 50 % in both cases). Intranasal administration of MSCs was accompanied by a significant increase in the Cu content (by 89 %) 1 day after the ischemia modeling, and 2 days later – by a decrease in its content by 36 % (compared to the control). In the control animals that were not subjected to surgical operations, no changes in the content of NO or copper were observed. **Conclusion.** The experiments showed a 2-fold decrease in the NO content in the olfactory bulb of the rat brain 1 and 2 days after the ischemia modeling, and demonstrated that the intranasal administration of MSCs did not affect the intensity of NO production on the 1st and 2nd days after the brain ischemia modeling, but was accompanied by an increase in the antioxidant protection of the nervous tissue one day after ischemia.

Keywords: ischemic brain stroke, hypoxia, nitric oxide, cooper, electron paramagnetic resonance, spin trap, mesenchymal stem cells

For citation: Andrianov V. V., Kulchitsky V. A., Yafarova G. G., Tokalchik Yu. P., Zamaro A. S., Bazan L. V., Bogodvid T. Kh., Iyudin V. S., Pashkevich S. G., Dosina M. O., Gainutdinov Kh. L. Content of nitric oxide and copper in the olfactory bulbs of the rats brain after modeling of cerebral stroke and intranasal administration of mesenchymal stem cells. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2021;20(2):77–86. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-2-77-86.

Введение

Гипоксия является предшественником многих патологических процессов в организме [1, 2]. Она возникает при недостаточном снабжении тканей организма кислородом или нарушении его утилизации в процессе биологического окисления; это ключевой компонент патогенеза многих заболеваний [3, 4]. При снижении содержания кислорода во вдыхаемом воздухе, нарушениях церебрального кровотока, ведущих к недостатку снабжения кислородом отделов мозга, наступает ишемия мозга, которая может завершиться ишемическим инсультом, который сопровождается повреждением тканей мозга и нарушением его функций [4, 5].

При гипоксии и ишемии мозга нарушается функционирование нейромедиаторных систем, включая систему монооксида азота. Оксид азота (NO) известен как одна из важнейших сигнальных молекул, регулирующих физиологические функции организма и метаболизм клеток [6]. NO является химически высокореактивным свободным радикалом, способным выступать как в роли окислителя, так и в роли восстановителя [7]. Исследования роли NO в передаче сигналов в нервной системе начались вскоре после его открытия [8]. С тех пор продемонстрировано, что NO участвует в различных функциях нервной системы, регулирует пролиферацию и дифференциацию нервных клеток [9]. Также установлено, что NO

выполняет функцию нейротрансмиттера, обеспечивающего расслабление гладких мышц [10]. Доказана регулирующая роль NO в пищеварительном, дыхательном и мочеполовом трактах, в работе сердечно-сосудистой системы [11, 12].

В последние годы появилось много фактов, свидетельствующих о том, что биосинтез NO является одним из ключевых факторов в патофизиологическом ответе мозга на гипоксию-ишемию [13, 14]. Одной из причин вовлечения NO в патологический процесс является длительная нехватка кислорода, которая возникает вследствие несоответствия снабжения тканей организма кислородом той реальной потребности, в которой нуждаются ткани [14]. NO активирует растворимую гемосодержащую гуанилатциклазу и ADP-рибозилтрансферазу [15]. В результате при гидролизе циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) специфически образуется фосфодиэстераза 5-го типа [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 [7, 9]. Помимо этого, NO участвует также в регуляции внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , вовлекается в контроль pH на фоне церебральной ишемии [17]. Обнаружено, что при патологических процессах NO играет как протекторную роль, так и деструктивную, что определяется многими факторами [18].

Церебральная ишемия вызывает множественные и разнонаправленные изменения содержания NO в мозге и в передаче сигналов [19]. При измерениях активности NO-синтазы (NOS) найдено увеличение продуктивности нейрональной NOS (nNOS) в самом начале ишемии [20], а также начало экспрессии индуцибельной NOS (iNOS) через сутки после ишемии [21]. Увеличение продукции NO в течение 60 мин после ишемии продемонстрировано методом спектроскопии ЭПР [22]. Этим данным противоречат результаты других исследователей [23], в которых показано отсутствие эффекта блокады NOS на объем инфаркта мозга или даже увеличение очага разрушения [24]. Существуют данные об успешном применении доноров NO в качестве нейропротекторных агентов после ишемического поражения мозга [25, 26]. Показано, что устойчивость мозга к дефициту кровоснабжения может повышаться при применении прекодиционирования [27, 28], под действием кратковременной гипотермии [29] и других умеренных стрессорных влияний, способных активировать эндогенные защитные механизмы и повышать устойчивость ткани к последующей тяжелой ишемии [30, 31]. Было показано участие в этих процессах АТФ-зависимых K-каналов [32].

В последние несколько десятилетий появились доказательства того, что физиологическое обновление и регенерация тканей в течение всей жизни животного и человека происходят благодаря стволовым клеткам [33, 34]. Важнейшей популяцией стволовых клеток взрослого организма являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [35]. Большой интерес представляют стволовые клетки мозга. В физиологических условиях эндогенные стволовые клетки в этих областях

мозга генерируют нейробласты, которые мигрируют к тем участкам мозга, где требуется интенсивное образование новых нейронных сетей [36]. Нами в экспериментах на грызунах установлено, что интраназальное введение МСК в остром периоде ишемии мозга сопровождалось более быстрым восстановлением контроля двигательной активности [37, 38].

Целью работы было исследование методом ЭПР-спектроскопии интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в обонятельных луковицах мозга крыс при моделировании ишемического инсульта мозга, а также изучение эффекта интраназального введения МСК в остром периоде после обтурации общих сонных артерий.

Материалы и методы исследования

Моделирование ишемического инсульта у крыс, введение ловушки для оксида азота и мезенхимальных стволовых клеток. Моделирование ишемического инсульта осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике (протокол № 1 от 31.01.2019 г.) Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (г. Минск). Животных содержали в стандартных условиях вивария (с поддержанием 12/12-часового ритма освещения и темноты, температуры воздуха на уровне 23 ± 1 °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. Моделирование ишемии головного мозга осуществляли лигированием общих сонных артерий на уровне бифуркации у крыс-самцов линии «Вистар» ($n=20$) под кетамин-ксилазин-ацепромазиновым наркозом [39]. Экспериментальные животные были разделены на две группы по 10 особей в каждой: 1) животные после ишемического поражения; 2) животные, которым через 10 мин после моделирования ишемии мозга вводили МСК.

Для имплантации использовали первичную культуру МСК, полученную из жировой ткани самок крыс ($n=4$), массой 240–280 г, по методике, утвержденной Ученым советом Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 8 от 26.08.2010 г.). В стерильных условиях жировую ткань выделяли из большого сальника и околопочечной жировой клетчатки наркотизированных самок крыс (55,6 мг/кг кетамина, 5,5 мг/кг ксилазин-1, 1 мг/кг ацепромазина, внутривенно). Полученную жировую массу помещали в пробирку, заполненную фосфатным буферным раствором (*Sigma-Aldrich*, США, pH=7,4). В условиях ламинарного шкафа (*BioHazard*, США) ткань, промытую в фосфатном буферном растворе, измельчали ножницами в чашке Петри до образования однородной массы. Ферментизацию проводили в CO_2 -инкубаторе при 37 °C (*ShellLab Series 3517*, США) в течение 40 мин 0,075 %-м раствором коллагеназы I типа (*Sigma-Aldrich*, США) или в течение 30 мин 0,25 %-м трипсином EDTA (*Sigma-Aldrich*, США). Объемное соотношение жировой массы и энзима – 1:1. Для нейтрализации активности энзи-

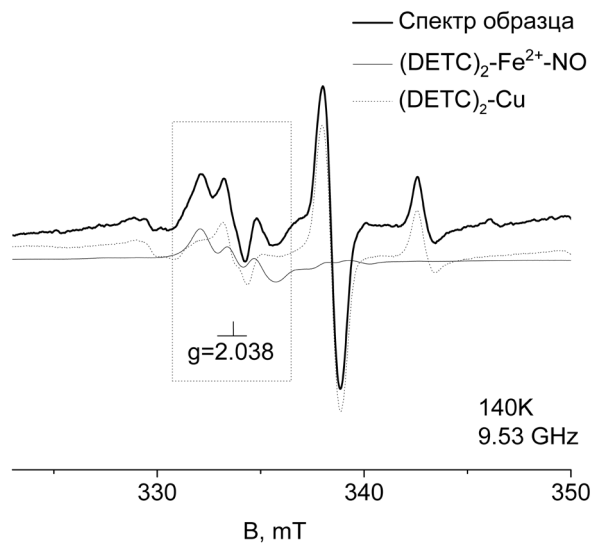


Рис. 1. Спектр ЭПР тканей обонятельной луковицы здоровой (интактной) крысы. Отдельно показан сигнал от комплекса NO со спиновой ловушкой (ДЭТК)₂-Fe²⁺. Прямоугольником выделен характерный триплетный сигнал от всего комплекса (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO со значением g-фактора, равным 2,038. Ось абсцисс – магнитное поле H, мТ. Температура – 77 °К. Крысы были инъецированы (ДЭТК)₂-Fe²⁺-цитрат

Fig. 1. EPR spectra of the olfactory bulb of a healthy (intact) rat. The signal from the NO complex with a spin trap (DETC)₂-Fe²⁺ is shown separately. The rectangle shows a characteristic triplet signal from the entire complex (DETC)₂-Fe²⁺-NO with a g-factor value of 2.038. The abscissa axis is the magnetic field H, mT. Temperature 77 °K. The rats were injected with (DETC)₂-Fe²⁺-citrate

ма добавляли равный объем питательной среды Игла, модифицированной Дульбекко с низким содержанием глюкозы 1000 мг/л (DMEM) (*Sigma–Aldrich*, США), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки (*Gibco*, США) и 100 мкг/мл сульфата гентамицина. Полученную суспензию клеток центрифугировали 10 мин со скоростью 1500 об./мин. Сформировавшуюся пленку из адипоцитов и супернатант удаляли. Клеточный осадок дважды отмывали в фосфатном буферном растворе в течение 10 мин при 1500 об./мин. После центрифугирования клеточный осадок ресуспензировали в полной питательной среде, содержащей питательную среду DMEM, 10 % фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл сульфата гентамицина. Высеивали в пластиковые культуральные флаконы.

Через 48 ч из чашки удаляли среду, промывали культуру фосфатным буферным раствором, удаляя остатки среды и сыворотки, добавляли 1 мл раствора трипсина и инкубировали 3 мин при температуре 37 °С. Затем клетки отмывали от трипсина, центрифугируя в 3–5 мл фосфатного буферного раствора в присутствии 10 % сыворотки в течение 10 мин со скоростью 1500 об./мин. Надосадочную жидкость удаляли. Осадок ресуспензировали в полной питательной среде и высеивали в культуральные флаконы.

МСК вводили с помощью инсулинового шприца под слизистую оболочку полости носа крысы в 50 мкл суспензии, содержащей 400 тысяч МСК (интраназальное введение) [39]. В обеих сериях в день опыта крыс наркотизировали путем внутрибрюшинного введения смеси кетамин-ксилазин-ацепромазин (55,6 мг, 5,5 мг и 1,1 мг/кг соответственно). Третью группу крыс линии Вистар составляли интактные

животные (n=10), которые не подвергались хирургическим манипуляциям в области мозга. Компоненты спиновой ловушки для оксида азота (DETC-Na, FeSO₄, *sodium citrate*) вводили животным за 30 мин до извлечения исследуемых тканей. Через 24 и 48 ч после моделирования ишемии проводили забор тканей обонятельной луковицы. Фрагменты мозга крыс размером 1,5×1,5 мм были немедленно изолированы и замораживались при температуре жидкого азота. Фрагменты тканей хранились и передавались из Минска в Казань в пластиковых контейнерах с сухим льдом для измерений методом ЭПР-спектроскопии.

Формирование комплекса NO со спиновой ловушкой и измерения ЭПР-спектров. Измерения интенсивности продукции NO методом ЭПР-спектроскопии проводили в Казанском физико-техническом институте КазНЦ РАН с использованием методики спиновых ловушек [40, 41]. Компоненты спиновой ловушки: ДЭТК-Na вводили внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг в 2,5 мл воды, смесь растворов: сульфата железа (FeSO₄ · 7 H₂O, *Sigma*, USA) в дозе 37,5 мг/кг и цитрата натрия в дозе 187,5 мг/кг (в объеме 1 мл воды на 300 г веса животного), приготовленную непосредственно перед введением, вводили подкожно в три точки – правое и левое бедро и в роstralную часть межлопаточной области [42]. В результате формируется соединение ДЭТК-Fe²⁺, которое образует с NO стабильный радикал (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO. Этот комплекс (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора g=2,038 и триплетной сверхтонкой структурой [40, 43]. Кроме того, спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя комплекс Cu(ДЭТК)₂, который также может быть зарегистрирован методом ЭПР-спектроскопии [44]. Измерения спектров комплекса (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO и Cu(ДЭТК)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 Гс, мощности СВЧ-излучения 30 mW, временной константе 200 ms и температуре 77 °К в пальчиковом дюаре 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. Масса образцов составляла около 100 мг. Амплитуду спектров ЭПР всегда нормировали на вес образца и на амплитуду сигнала ЭПР эталонного образца (подробности методики измерений сигналов ЭПР описаны нами ранее [45]).

Статистическая обработка результатов. Результаты были статистически обработаны, они представлены как среднее ± SEM. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна – Уитни. Была использована программа «SigmaStat32». Статистическая значимость оценивалась по p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 показан спектр ЭПР тканей обонятельной луковицы здоровой (интактной) крысы. Отдельно показан сигнал от комплекса NO со спиновой ло-

вушкой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$. Прямоугольником выделен характерный триплетный сигнал от всего комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ со значением g-фактора, равным 2,038 [41, 43]. На этом рисунке демонстративно показан сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$. На рис. 2 приведены спектры ЭПР тканей обонятельной луковицы интактной крысы, а также через 1 сутки после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий, и через 1 сутки после моделирования ишемии с одновременным интраназальным введением МСК. Сплошной линией показан спектр образца, тонкая линия показывает сигнал от NO, связанного со спиновой ловушкой, в составе спектра комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, пунктирная линия – сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$. Относительное изменение количества NO-содержащих комплексов оценивали по интегральной интенсивности сигнала от спиновой ловушки, $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Относительное изменение содержания меди также оценивали по интегральной интенсивности сигнала комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$.

На рис. 3, а приведены данные по средним значениям интенсивностей продукции NO. Результаты показывают достоверное ($p < 0,05$) снижение содержания NO в обонятельной луковице на 47 % через 1 сутки после моделирования ишемии ($n=10$). В обонятельной луковице крыс, у которых было проведено моделирование ишемии с одновременным интраназальным введением МСК ($n=10$), не было обнаружено отличия содержания NO относительно ишемизированных крыс. Через 2 дня содержание NO в обонятельной луковице ишемизированных крыс имело тенденцию к еще большему снижению (на 57 %). В обонятельной луковице крыс, у которых было проведено моделирование ишемии с одновременным интраназальным введением МСК, через 2 дня не было обнаружено достоверного отличия содержания NO относительно ишемизированных крыс (рис. 3, а). У контрольных животных, которые не подвергались хирургическим операциям, изменений содержания NO и меди не наблюдалось. Таким образом, анализ полученных результатов показывает существенное снижение продукции NO после моделирования ишемии, однако интраназальное введение МСК не изменяет продукцию NO относительно ишемизированных крыс, которым не вводили МСК, несмотря на существенное восстановление двигательной активности животных [32]. Содержание меди, которое соответствует уровню супероксиддисмутаз 1 и 3, в обонятельной луковице крысы увеличивалось, хотя и недостоверно, через 1 день после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий, и сохранялось через 2 дня (увеличение на 50 % в обоих случаях) (рис. 3, б). Интраназальное введение МСК сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) увеличением содержания Cu на 89 % через 1 день после моделирования ишемии, а через 2 дня – уменьшением его содержания на 36 %.

Травматические и ишемические повреждения мозга продолжают оставаться одной из сложнейших проблем современной медицины [5, 46]. Изучение механизмов репаративных процессов в нервной тка-

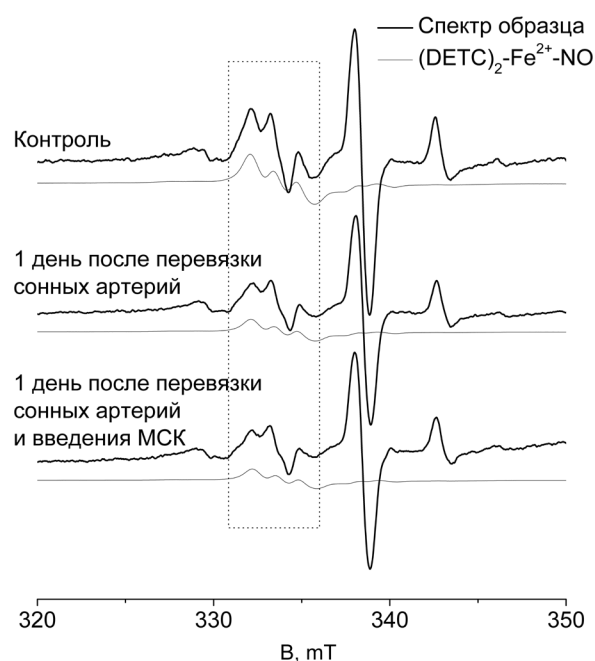


Рис. 2. Спектр ЭПР тканей обонятельной луковицы интактной крысы, а также через 1 сутки после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий, и через 1 сутки после моделирования ишемии с одновременным интраназальным введением МСК. Отдельно показан сигнал от комплекса NO со спиновой ловушкой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$. Прямоугольником выделен характерный триплетный сигнал от всего комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ со значением g-фактора, равным 2,038.

Ось абсцисс – магнитное поле H, мТ. Температура – 77 °К. Крысы были инъецированы $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$ -цитрат

Fig. 2. EPR spectra of the olfactory bulb of a healthy rat, as well as 1 day after ischemia modeling caused by carotid artery ligation, and 1 day after ischemia modeling with simultaneous intranasal administration of MSCs. The signal from the NO complex with a spin trap $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$ is shown separately. The rectangle shows a characteristic triplet signal from the entire complex $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ with a g-factor value of 2.038. The abscissa axis is the magnetic field H, mT. Temperature 77 °K. The rats were injected with $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$ -citrate

ни и разработка новых методов восстановления нейронных структур составляют одно из актуальных направлений в физиологии и медицине и имеют большое значение для разработок новых терапевтических и реабилитационных стратегий [7, 37, 47–49]. Ишемия мозга, которая фатально завершается ишемическим инсультом, часто возникает при нарушениях церебрального кровотока, что сопровождается недостаточным снабжением кислородом отделов мозга и развитием гипоксии разной степени выраженности [4, 47]. Для экспериментального моделирования ишемии головного мозга используют различные подходы, среди которых мы остановились на модели ишемии, которая достигается после быстрого лигирования общих сонных артерий на уровне их бифуркации. Этот прием занимает несколько минут, что важно для минимизации побочных эффектов [27, 49]. На сегодняшний день сформировалось представление, что первичные травмы головного мозга и вторичные травмы, вызванные инсультом, представляют собой сложные патофизиологические процессы, включающие в себя воспалительную реакцию, апоптоз нейронов, ишемически-реперфузионное повреждение, генерацию свободных радикалов и т. д. [14, 50, 51].

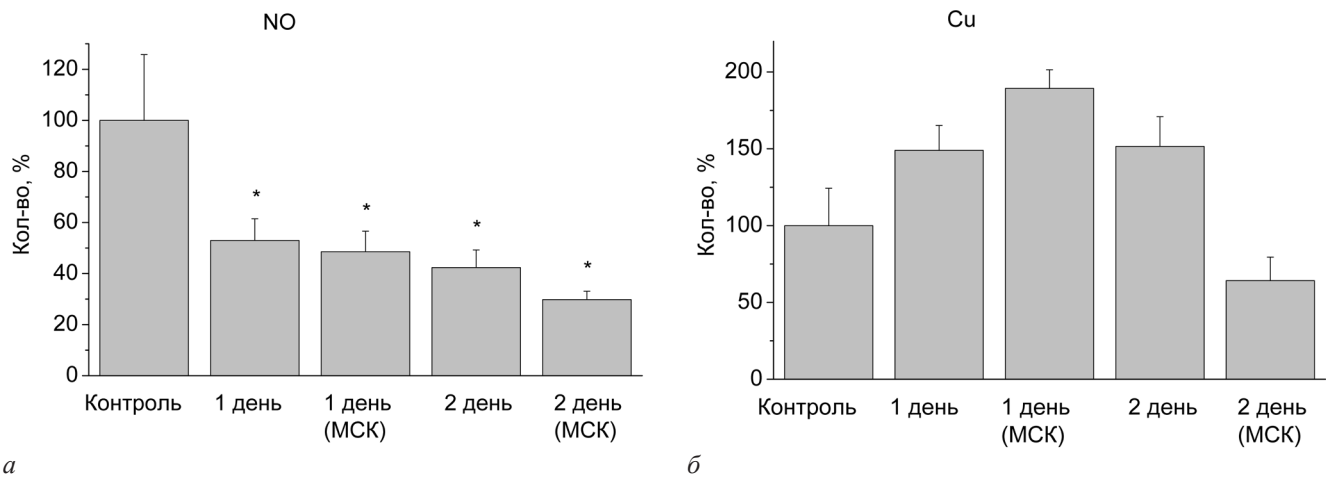


Рис. 3. Содержание NO (а) и меди (б) в обонятельной луковице крысы через 1 и 2 дня после моделирования ишемии (1 день, 2 дня), а также моделирования ишемии с одновременным интраназальным введением MCK (1 день+MCK, 2 дня+MCK). Показаны средние значения и стандартные ошибки среднего: * – отличие от контроля (t-test, $p < 0,05$).

Ось ординат – средняя интегральная интенсивность сигнала комплексов $(\text{DETС})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ и $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$

Fig. 3. The content of NO (a) and cooper (б) in the olfactory bulb of the rat after the ischemia modeling (1 and 2 days) and after the ischemia modeling with simultaneously intranasal administration of MSCs (1 day+MSC and 2 day+MSC). Shown: average values and standard errors of the mean: * - difference from the control (t-test, $p < 0,05$). The ordinate axis is the average integral signal intensity of the complexes $(\text{DETС})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ and $\text{Cu}(\text{DETС})_2$.

С одной стороны, развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с нарушениями церебрального кровотока, а также с нарушениями регуляции кровоснабжения тканей мозга системой NO [3, 43, 52]. С другой стороны, сама гипоксия, возникшая в результате ишемического инсульта, сопровождается ранней гибелью клеток в различных отделах мозга, за которой следует запрограммированная поздняя гибель других клеток путем апоптоза [14, 50].

В этих процессах гипоксии-ишемии роль NO по результатам исследований представляется противоречивой: NO способен выполнять как нейротоксические, так и нейропротекторные функции [53]. Существует множество причин такого разнообразия функций NO. Во-первых, кроме синтеза NO-синтазами как основного источника NO [9, 54] существует также нитроредуктазная компонента цикла NO, когда NO образуется из нитритов и нитратов [9, 55]. Во-вторых, существует значительное число депо для NO, которые взаимодействуют с комплексами, содержащими железо (например, гемовые структуры), с тиолами и другими соединениями [13, 49, 56]. В-третьих, существует зависимость содержания от возраста [12]. Также следует отметить, что экспериментаторы в зависимости от задач исследования используют разные модели ишемии, которые развиваются по разным механизмам.

По-видимому, в этих процессах большую роль играет динамика экспрессии различных типов NOS [16, 57]. Большинство авторов согласны с тем, что основные функции NO, как сигнального механизма, регулирующего практически все критические клеточные функции, обеспечиваются эндотелиальной NOS (eNOS) [17, 58]. Активация eNOS облегчает восстановление после ишемического поражения [58]. Данные по роли нейрональной NOS (nNOS) в развитии ишемии мозга являются противоречивыми [18]. Так, считается, что продуцирование NO нейронами ус-

губляет острое ишемическое повреждение, тогда как сосудистая NOS (eNOS) защищает после окклюзии средней мозговой артерии. Другие авторы [17, 19, 59] указывают, что сверхэкспрессия NO начинается с активации большой популяции nNOS. NO, генерируемый индуцибельной NOS (iNOS), обладает потенциалом в качестве патологического источника, также ведущим к сверхэкспрессии трансммиттера и нарушению нормальных физиологических процессов [9, 53]. В силу этого целесообразно блокировать активность nNOS и iNOS при развитии гипоксии для предотвращения ишемии мозга. Но и эти рекомендации в определенной степени являются условными и архаичными, поскольку авторы забывают о присутствии в мозге множества нейромедиаторных систем и трофических факторов, которые вовлекаются в процессы стабилизации функций мозга при гипоксии и ишемии.

Проведенные нами эксперименты показали достоверное снижение интенсивности продукции NO примерно в 2 раза в течение первых 2 суток после моделирования ишемии. Это демонстрирует, что в выбранном авторами варианте моделирования ишемии мозга не сформировались условия для активации, к примеру, iNOS. Имеющиеся в литературе данные [9, 17] показывают, что цитотоксические эффекты NO в значительной степени связаны с пероксинитритом, образующимся в результате реакции между NO и другим свободным радикалом, супероксидным анионом. Дисмутирование супероксида с помощью цитозольного фермента Cu, Zn-COD (супероксиддисмутаза – COD) является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления, однако образующийся при избыточной продукции NO пероксинитрит способен инактивировать фермент COD и ускорять процессы свободнорадикального окисления [17]. Нами в данном исследовании показано, что содержание меди (как показателя уровня 1-й и 3-й субъединиц COD) в обонятельной луковице увеличивается в 1-е сутки после моделирования ишемиче-

ского инсульта. Эти результаты демонстрируют явное усиление антиоксидантной защиты мозга в 1-е сутки после моделирования ишемии. На основании таких данных можно предлагать протокол терапии, акцентированный на усилении антиоксидантной системы.

В настоящее время актуальным направлением является применение в регенеративной медицине стволовых клеток в качестве ведущего средства клеточной терапии [37, 60]. Исследователей и клиницистов привлекают терапевтические свойства МСК [35, 36, 61], включая МСК мозга [36, 62, 63]. Так как было показано, что интраназальное введение МСК после моделирования ишемии сопровождается быстрым восстановлением двигательной активности у экспериментальных животных [38], мы решили верифицировать роль NO в этом процессе. Проведенные эксперименты показали, что введение МСК не отразилось на интенсивности продукции NO на 1-й и 2-й дни после моделирования ишемии, однако повышало антиоксидантную защиту мозга после ишемии.

Заключение

Таким образом, проведенные эксперименты выявили достоверное снижение интенсивности продукции NO в 2 раза в течение первых 2 суток после моделирования ишемии. Это демонстрирует, что в выбранном варианте эксперимента не сформировались условия для активации iNOS. Данные результаты перекликаются не только с рядом сведений [59], но и с нашими предыдущими результатами, где мы использовали другие способы моделирования ишемии [38, 43, 49, 64]. Нам представляется, что обнаружен тот временной отрезок развития процессов, связанных с ишемией мозга, когда целесообразно проводить эффективную терапию с привлечением доноров NO. Найдено также увеличение содержания меди (как показателя уровня 1-й и 3-й субъединиц COD, свидетельствующих о состоянии антиоксидантной защиты мозга) в 1-е сутки после моделирования ишемии и ее усиление (через сутки после моделирования ишемии) при применении МСК. Поэтому можно предполагать протокол терапии, основанный на активации антиоксидантной системы организма.

Финансирование работы / Financing of the work

Моделирование ишемии и взятие образцов проводились в Центре мозга, Институт физиологии НАН Беларуси (Минск, Беларусь), исследования поддержаны грантом Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь (Грант В18Р М19ЛITG-002). Обработка результатов частично проводилась в Казанском федеральном университете (г. Казань, Россия) в рамках выполнения государственного задания № 0671-2020-0059. Измерения спектров ЭПР образцов проводилось в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения государственного задания. / Ischemia modeling and sampling were performed at the Brain Center, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, the work was supported by State Committee on Science and Technology of the Republic of Belarus (Fund M19LITG-002). The processing of the results was par-

tially carried out at the Kazan Federal University (Kazan, Russia) within the framework of the state assignment No. 0671-2020-0059. The measurements of the EPR spectra of the samples were carried out at the Zavoisky Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences within the framework of a state assignment.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Кошелев В. Б. Механизмы регуляции артериального давления // *Избранные лекции по современной физиологии*. – Казань: ГОЭТАР, 2010. – С. 178–194. [Koshelev V.B. Mechanisms of blood pressure regulation. The digest Selected Lectures on Contemporary Physiology. Kazan, 2010:78–194. (In Russ.)].
2. Kumar H, Choi DK. Hypoxia inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway?. *Mediators of Inflammation*. 2015. Doi: 10.1155/2015/584758.
3. Manukhina EB, Malyshev IY, Smirin BV, Mashina SY, Saltykova VA, Vanin AF. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide*. 1999;3(5):393–401. Doi: 10.1006/niox.1999.0244.
4. Воронина Т. А. Роль гипоксии в развитии инсульта и судорожных состояний. *Антигипоксанты // Обзоры по клин. фармакологии и лекарств. терапии*. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 63–70. [Voronina TA. The role of hypoxia in the development of stroke and convulsive conditions. *Antihypoxants. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2016;14(1):63–70. (In Russ.)]. Doi: 10.17816/RCF14163-70.
5. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke*. *Lancet*. 2008;(371):1612–1623. Doi: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7.
6. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 924–938. [Vanin AF. Dinitrosyl complexes of iron and S-nitrosothiols - two possible forms of stabilization and transport of nitric oxide in biosystems. *Biochemistry*. 1998;63(7):924–938. (In Russ.)].
7. Vanin AF. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2016;(54):15–29. Doi: 10.1016/j.niox.2016.01.006.
8. Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci*. 2003;(26):105–131.
9. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*. 2010;16(4):435–452. Doi: 10.1177/1073858410366481.
10. Lakomkin VL, Vanin AF, Timoshin AA, Kapelko VI, Chazov EI. 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*. 2007;16(4):413–418. Doi: 10.1016/j.niox.2007.03.002.
11. Реутов В. П., Охотин В. Е., Шуклин А. В. и др. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // *Успехи физиол. наук*. – 2007. – Т. 38, № 4. – С. 39–58. [Reutov VP, Okhotin VE, Shuklin AV, Sorokina EG, Kositsyn NS, Gurin VN. Nitric oxide and the cycle in the myocardium: molecular, biochemical and physiological aspects. *Advances in physiological sciences*. 2007;38(4):39–58. (In Russ.)].
12. Андрианов В. В., Ситдииков Ф. Г., Гайнутдинов Х. Л. и др. Изменение содержания оксида азота в сердце

- интактных и десимпатизированных крыс в онтогенезе // *Онтогенез*. – 2008. – Т. 39, № 6. – С. 437–442. [Andrianov VV, Sitdikova FG, Gainutdinov KhL, Yurtaeva SV, Obychny AA, Yafarova GG, Muranova LN, Karimov FK, Chiglintsev VM, Lyudin VS. Changes in nitric oxide content in the heart of intact and sympatric rats during ontogenesis. *Ontogenesis*. 2008; 39(6):437–442. (In Russ.)].
13. Манухина Е. Б., Каленчук В. У., Гаврилова С. А. и др. Органоспецифичность депонирования оксида азота в стенках кровеносных сосудов при адаптации к гипоксии // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. – 2008. – Т. 94. – № 2. – С. 198–205. [Manukhina EB, Kalenchuk VU, Gavrilova SA, Goryacheva AV, Malyshev IYu, Koshelev VB. Organ specificity of nitric oxide deposition in the walls of blood vessels during adaptation to hypoxia. *Russian Physiological Journal*. 2008;94(2):198–205. (In Russ.)].
14. Chen ZQ, Mou RT, Feng DX, Wang Z, Chen G. The role of nitric oxide in stroke. *Med Gas Res*. 2017;7(3):194–203.
15. Ситдикова Г. Ф., Зефирова А. Л. Газообразные посредники в нервной системе // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. – 2006. – Т. 92. – С. 872–882. [Sitdikova GF, Zefirov AL. Gaseous mediators in the nervous system. *Russian Physiological Journal*. 2006;(92):872–882. (In Russ.)].
16. Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *British Journal of Pharmacology*. 2013;(169):1417–1429. Doi:10.1111/bph.12217.
17. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev*. 2007;(87):315–427.
18. Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, Owen JB, Dinkova-Kostova AT, Butterfield DA. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2009;(11):2717–2739.
19. Салыкина М. А., Сорокина Е. Г., Красильникова И. А. и др. Влияние селективных ингибиторов нейрональной и индуцибельной NO-синтаз на содержание АТФ и выживаемость культивируемых нейронов мозжечка крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов // *Бюлл. эксперимент. биологии и мед.* – 2013. – Т. 155, № 1. – С. 47–50. [Salykina MA, Sorokina EG, Krasilnikova IA, Reutov VP, Pinelis VG. The effect of selective inhibitors of neuronal and inducible NO synthases on the ATP content and the survival of cultured neurons in the rat cerebellum during hyperstimulation of glutamate receptors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;155(1):47–50. (In Russ.)].
20. Samdani AF, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*. 1997;(28):1283–1288.
21. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci*. 1997;17(23):9157–9164.
22. Tominaga T, Sato S, Ohnishi T, Ohnishi ST. Electron paramagnetic resonance (EPR) detection of nitric oxide produced during forebrain ischemia of the rat. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1994;(14):715–722.
23. Dawson DA, Kusumoto K, Graham DI, McCulloch J, Macrae IM. Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroscience Letters*. 1992;142(2):151–154.
24. Yamamoto S, Golanov EV, Berger SB, Reis DJ. Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Increases Focal Ischemic Infarction in Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1992;(12):717–726.
25. Willmot M, Gray L, Gibson C, Murphy S, Bath PM. A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow. *Nitric Oxide*. 2005;(12):141–149.
26. Jung KH, Chu K, Ko SY, Lee ST, Sinn DI, Park DK, Kim JM, Song EC, Kim M, Roh JK. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke* 2006;(37):2744–50.
27. Самойленкова Н. С., Гаврилова С. А., Кошелев В. Б. Защитный эффект гипоксического и ишемического preconditionирования при локальной ишемии мозга крыс // *Доклады академии наук*. – 2007. – Т. 414, № 2. – С. 283–285. [Samoilenkova NS, Gavrilova SA, Koshelev VB. Protective effect of hypoxic and ischemic preconditioning in local cerebral ischemia in rats. *Academy of Sciences reports*. 2007; 414(2):283–285. (In Russ.)].
28. Shmonin AA, Baisa AE, Melnikova EV, Vavilov VN, Vlasov TD. Protective effects of early ischemic preconditioning in focal cerebral ischemia in rats: the role of collateral blood circulation. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2012;42(6):643–650. Doi: 10.1007/s11055-012-9615-x.
29. Маслов Л. Н., Халиулин И. Г., Подоксенов Ю. К. Нейропротекторный и кардиопротекторный эффекты гипотермического preconditionирования // *Патолог. физиология и эксперимент. терапия*. – 2012. – Т. 1. С. 67–72. [Maslov LN, Khaliulin IG, Podoksenov YuK. Neuroprotective and cardioprotective effects of hypothermic preconditioning. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2012;(1):67–72. (In Russ.)].
30. Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, Lu XJ, Lin YC, Geng YJ, Miao YF. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13(5):6089–6101. Doi: 10.3390/ijms13056089.
31. Щербак Н. С., Юкина Г. Ю., Сухорукова Е. Г., Томсон В. В. Влияние ишемического preconditionирования на реакцию микроглии неокортекса при глобальной ишемии головного мозга у крыс // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 59–66. [Shcherbak NS, Yukina GYu, Sukhorukova EG, Thomson VV. Influence of ischemic postconditioning on the reaction of microglia of the neocortex in global cerebral ischemia in rats. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2020; 19(2):59–66. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66.
32. Дерягин О. Г., Гаврилова С. А., Буравков С. В. и др. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов и оксида азота в защитном эффекте preconditionирования мозга // *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2016. – Т. 116, № 8. – С. 17–23. [Deryagin OG, Gavrilova SA, Buravkov SV, Andrianov VV, Yafarova GG, Gainutdinov HL, Koshelev VB. The role of ATP-sensitive potassium channels and nitric oxide in the protective effect of brain preconditioning. *Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016;116(8):17–23. (In Russ.)]. Doi: 10.17116/jnevro20161168217-23.
33. Kong Y, Xu R, Darabi MA, Zhong W, Luo G, Xing MM, Wu J. Fast and safe fabrication of a free-standing chitosan/alginate nanomembrane to promote stem cell delivery and wound healing. *Int. J. Nanomedicine*. 2016;(11):2543–2555. Doi: 10.2147/IJN.S102861.
34. Harris L, Zalucki O, Oishi S, Burne TH, Jhaveri DJ, Piper M. A morphology independent approach for identifying dividing adult neural stem cells in the mouse hippocampus. *Dev. Dyn*. 2018;247(1):194–200. Doi: 10.1002/dvdy.24545.
35. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogdijjn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front. Immunol*. 2014;(5):148. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00148.
36. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells*. 2019;8(5):467. Doi:10.3390/cells8050467.

37. Kulchitsky V, Zamaro A, Shanko Y, Koulchitsky S. Positive and negative aspects of cell technologies in cerebral diseases. *J. Neurological Stroke*. 2018;8(2):87–88. Doi: 10.15406/jnsk.2018.08.00286.
38. Bogodvid T, Pashkevich S, Dosina M, Zamaro A, Takalchik Y, Yafarova G, Andrianov V, Denisov A, Loiko D, Gainutdinov K, Kulchitsky V. Effect of intranasal administration of mesenchymal stem cells on the approximate motor activity of rats after simulation of ischemic stroke. *Eur. J. Clin. Investig.* 2019;(49):161. Doi: 10.1111/eci.13109.
39. Shanko Y, Zamaro A, Takalchik SY, Koulchitsky S, Pashkevich S, Panahova E, Navitskaya V, Dosina M, Denisov A, Bushuk S, Kulchitsky V. Mechanisms of Neural Network Structures Recovery in Brain Trauma. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2018;7(5). Doi: 10.26717/BJSTR.2018.07.001567.
40. Vanin AF, Huisman A, Van Faassen EE. Iron Dithiocarbamate as Spin Trap for Nitric Oxide Detection: Pitfalls and Successes. *Methods in Enzymology*. 2003;(359):27–42.
41. Микоян ВД, Кубрина ЛН, Ванин АФ. Оксид азота образуется через L-аргинин зависимый путь в мозге мышей *in vivo* // Биофизика. – 1994. – Т. 39. – С. 915–918. [Mikoyan VD, Kubrina LN, Vanin AF. Nitric oxide is formed via an L-arginine dependent pathway in the brain of mice *in vivo*. *Biophysics*. 1994;(39):915–918. (In Russ.)].
42. Ismailova AI, Gnezdilov OI, Muranova LN, Obynochny AA, Andrianov VV, Gainutdinov KhL, Nasyrova AG, Nigmatullina RR, Rahmatullina FF, Zefirov AL. 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.* 2005;(28):421–430.
43. Gainutdinov KhL, Gavrilova SA, Iyudin VS, Golubeva AV, Davydova MP, Yafarova GG, Andrianov VV, Koshelev VB. EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke. *Applied Magnetic Resonance*. 2011;40(3):267–278.
44. van Faassen EE, Koeners MP, Joles JA, Vanin AF. Detection of basal NO production in rat tissues using iron-dithiocarbamate complexes. *Nitric Oxide*. 2008;(8):279–286.
45. Гайнутдинов Х. Л., Андрианов В. В., Июдин В. С. и др. Исследование методом ЭПР спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в организме крыс при гипокинезии // Биофизика. – 2013. – Т. 58, № 2. – С. 276–280. [Gainutdinov HL, Andrianov VV, Iyudin VS, Yurtaeva SV, Yafarova GG, Faizullina RI, Sitdikov FG. Investigation by the method of EPR spectroscopy of the intensity of production of nitric oxide in the body of rats with hypokinesia. *Biophysics*. 2013;58(2):276–280. (In Russ.)].
46. Andrianov VV, Yafarova GG, Pashkevich SG, Tokalchik YP, Dosina MO, Zamaro AS, Bogodvid TKh, Iyudin VS, Bazan LV, Denisov AA, Kulchitsky VA, Gainutdinov KhL. Changes of the nitric oxide and copper content in the olfactory bulbs of rats brain after modeling of brain stroke and intranasal administration of mesenchymal stem cells. *Appl. Magn. Res.* 2020;51(4):375–387.
47. Godinez-Rubi M, Rojas-Mayorquin AE, Ortuno-Sahagun D. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;(297357):1–16. Doi: 10.1155/2013/297357.
48. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K, Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int*. 2019;9628536. Doi: 10.1155/2019/9628536.
49. Deryagin OG, Gavrilova SA, Gainutdinov KhL, Golubeva AV, Andrianov VV, Yafarova GG, Buravkov SV, Koshelev VB. Molecular bases of brain preconditioning. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11(427):1–12. Doi: 10.3389/fnins.2017.00427.
50. Ansari M.H.K., Karimi P., Shakib N., Beyrami S.M. The neuroprotective effect of sodium nitrite on ischemic stroke-induced mitochondrial dysfunction via down regulation of intrinsic apoptosis pathway. *Crescent J. Medic. Biol. Sci.* 2018;5(1):50–56.
51. Гайнутдинов Х. Л., Андрианов В. В., Яфарова Г. Г. и др. Изменение содержания оксида азота и меди в печени и гиппокампе крыс после моделирования ишемии головного мозга // Журн. техн. физики. – 2020. – Т. 90, № 9. – С. 1481–1486. [Gainutdinov KhL, Andrianov VV, Yafarova GG, Bazan LV, Bogodvid TKh, Pashkevich SG, Dosina MO, Zamaro AS, Denisov AA, Kulchitsky VA. The change in the content of nitric oxide and copper in the liver and hippocampus of rats after modeling of brain ischemia. *Technical Physics*, 2020;65(9):1421–1426. (In Russ.)].
52. Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1332–1346. Doi: 10.1038/jcbfm.2012.12.
53. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AMG. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;(8):767–775. Doi: 10.1038/nrn2214.
54. Bolanos JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1999;1411(2–3):415–436.
55. Reutov VP, Samosudova NV, Sorokina EG. A model of glutamate neurotoxicity and mechanisms of the development of the typical pathological process. *Biophysics*. 2019;64(2):233–250.
56. Yurtaeva SV, Efimov VN, Yafarova GG, Ereemeev AA, Iyudin VS, Rodionov AA, Gainutdinov KhL, Yatsyk IV. EPR Detection of Iron Storage in Rat Tissues After Simulated Microgravity Model. *Appl. Magn. Reson.* 2016;47(6):555–565.
57. Яфарова Г. Г., Андрианов В. В., Пашкевич С. Г. и др. Продукция оксида азота при моделировании ишемии головного мозга у крыс: роль NO-синтаз // Рос. нейрохирург. журн. им. проф. А. Л. Поленова. – 2019. – Т. 10. – С. 128. [Yafarova GG, Andrianov VV, Pashkevich SG, i dr. Produkciya oksida azota pri modelirovanii ishemii golovnogo mozga u krys: rol' NO-sintaz. *Ros. nejrohirurg. zhurn. im. prof. A. L. Polenova*. 2019;10:128. (In Russ.)].
58. Gertz K, Endres M. eNOS and stroke: prevention, treatment and recovery. *Future Neurol.* 2008;3(5):537–550.
59. Eliasson MJL, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci.* 1999;19(14):5910–5918.
60. Nimiritsky PP, Eremichev RYu, Alexandrushkina NA, Efimenko AYU, Tkachuk VA, Makarevich PI. Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(4):823. Doi: 10.3390/ijms20040823.
61. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* 2013;(28):387–402. Doi: 10.3904/kjim.2013.28.4.387.
62. Stukach Y, Gainutdinov Kh, Dosina M, Pashkevich S, Andrianov V, Denisov A, Bogodvid T, Yafarova G, Bushuk S, Kuznetsova T, Kulchitsky V. Migration of neural stem cells in hippocampal slices in hypoxia modeling. *J. Stem Cells and Regenerative Therapy*. 2016;1(1):1–8.
63. Zheng Z, Zhang L, Qu Y, Xiao G, Li S, Bao S, Lu QR, Mu D. Mesenchymal Stem Cells Protect Against Hypoxia-Ischemia Brain Damage by Enhancing Autophagy Through Brain Derived Neurotrophic Factor/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. *Stem Cells* 2018;36(7):1109–1121.

64. *Andrianov VV, Pashkevich SG, Yafarova GG, Denisov AA, Iyudin VS, Bogodvid TKh, Dosina MO, Kulchitsky VA, Gainutdinov KhL. Changes of nitric oxide content in the rat hippocampus, heart and liver in acute phase of ischemia. Appl. Magn. Reson. 2016;47(9):965–976.*

Информация об авторах

Андрянов Вячеслав Вадимович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИЛ «Двигательная нейрореабилитация», Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета; старший научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии, Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, г. Казань, Россия, e-mail: slava_snail@yahoo.com, ORCID: 0000-0002-2471-5444.

Кульчицкий Владимир Адамович – д-р мед. наук, профессор, академик НАН Беларуси, заместитель директора по научной работе, Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: kulchitski48@mail.ru, ORCID: 0000-0003-1223-646X.

Яфарова Гузель Гульусовна – канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных, Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета; старший научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии, Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, г. Казань, Россия, e-mail: gusadila@mail.ru, ORCID: 0000-0003-3068-3407.

Токальчик Юлия Павловна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии, Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь, e-mail: stukachyulya@gmail.com, ORCID: 0000-0001-9668-8011.

Замаро Александра Сергеевна – научный сотрудник Центра мозга, Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: zamaroal@gmail.com, ORCID: 0000-0002-9938-7203.

Базан Лия Вячеславовна – канд. физ.-мат. наук, научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии, Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, г. Казань, Россия, e-mail: l_v_bazan@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8321-9344.

Богодвид Татьяна Халиловна – д-р биол. наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин, Поволжский университет физической культуры, спорта и туризма, старший научный сотрудник НИЛ «Двигательная нейрореабилитация», Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань, Россия, e-mail: tat-gain@mail.ru, ORCID: 0000-0002-1416-7595.

Июдин Василий Сергеевич – научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии, Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, г. Казань, Россия, e-mail: vasilius@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-3980-4116.

Пашкевич Светлана Геннадьевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией нейрофизиологии, Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: skypasht@mail.ru, ORCID: 0000-0002-2235-8228.

Досина Маргарита Олеговна – канд. биол. наук, внештатный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии, Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: pochta_margo@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9080-2466.

Гайнутдинов Халил Латыпович – д-р биол. наук, профессор, внештатный научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии, Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН; профессор кафедры физиологии человека и животных, Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань, Россия, e-mail: kh_gainutdinov@mail.ru, ORCID: 0000-0003-2649-3264.

Authors information

Andrianov Vyatcheslav V. – PhD, Senior scientific researcher, Kazan Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences and Senior scientific researcher, Kazan Federal University, Kazan, Russia, e-mail: slava_snail@yahoo.com, ORCID: 0000-0002-2471-5444.

Kulchitsky Vladimir A. – MD, Dr. of Sci., Professor, Scientific Director, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: kulchitski48@mail.ru, ORCID: 0000-0003-1223-646X.

Yafarova Guzel G. – PhD, Senior scientific researcher, Kazan Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences and Assistant Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia, e-mail: gusadila@mail.ru, ORCID: 0000-0003-3068-3407.

Tokalchik Yulya P. – PhD, Senior Researcher, Neurophysiology Laboratory, Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus, e-mail: stukachyulya@gmail.com, ORCID: 0000-0001-9668-8011.

Zamaro Alexandra S. – Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belaeus, e-mail: zamaroal@gmail.com, ORCID: 0000-0002-9938-7203.

Bazan Liya B. – PhD, Scientific researcher, Kazan Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, e-mail: l_v_bazan@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8321-9344.

Bogodvid Tatiana Kh. – PhD, Dr. of Sci., Senior scientific researcher, Kazan Federal University and Associative Professor, Volga Region State University of Physical Culture, Sport and Tourism, Kazan, Russia, e-mail: tat-gain@mail.ru, ORCID: 0000-0002-1416-7595.

Iyudin Vasily S. – Scientific researcher, Kazan Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, e-mail: vasilius@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-3980-4116.

Pashkevich Svetlana G. – PhD, Head of the Laboratory of Neurophysiology, Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, e-mail: skypasht@mail.ru, ORCID: 0000-0002-2235-8228.

Dosina Margarita O. – PhD, Senior Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, e-mail: pochta_margo@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9080-2466.

Gainutdinov Khalil L. – PhD, Dr. of Sci., Professor, Kazan Federal University, leader scientist, Kazan Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, e-mail: kh_gainutdinov@mail.ru, ORCID: 0000-0003-2649-3264.