

Ишемия мозга в острой фазе ведет к снижению содержания оксида азота в гиппокампе и лобных долях крыс: ЭПР исследование

В. В. Андрианов, Г. Г. Яфарова, В. С. Июдин, Л. В. Мингалиева, Х. Л. Гайнутдинов

Отдел химической физики, лаборатория спиновой физики и спиновой химии

Методом электронного парамагнитного резонанса анализировали продукцию оксида азота (NO) в гиппокампе и лобных долях крыс при развитии ишемии мозга в острой фазе. Найдено, что ишемия мозга приводит к достоверному снижению содержания NO в гиппокампе через 1 день после ишемии, в лобных долях мозга через 1 день после ишемии также наблюдается снижение содержания NO, но не достоверное.

Введение

Известно, что функционирование тканей организма зависит от ряда ключевых факторов. Один из таких факторов – необходимость достаточного количества кислорода, который поставляется с током крови, для поддержания окислительных процессов. Длительная нехватка кислорода ведет к гипоксии мозга, которая при определенных условиях сопровождается развитием ишемии тканей; это важный компонент патогенеза многих заболеваний [1, 2]. Нарушения церебрального кровотока ведут к недостатку снабжения кислородом отделов мозга и далее к ишемии мозга, которая может завершиться ишемическим инсультом, сопровождаемым повреждением тканей мозга и нарушением его функций [3]. Показано, что при возникновении и развитии ишемического и геморрагического инсульта, как протекторную роль, так и деструктивную роль может играть оксид азота (NO) [4–6]. NO, являющийся свободным радикалом, рассматривается в настоящее время как новая сигнальная молекула, играющая роль универсального регулятора многих физиологических процессов в организме [7, 8]. NO является важной сигнальной молекулой для сердечно-сосудистой и нервной систем [9–12]. Большой интерес привлекает участие NO в механизмах развития различных патологических состояний организма [5, 8]. В настоящее время с нарушениями мозгового кровотока, а также с нарушениями его регуляции системой NO связывают развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта [4, 13–15]. Также не вызывает сомнения определяющая роль системы NO в патогенезе целого ряда заболеваний, связанных с сосудистыми нарушениями [8, 13, 16].

Исходя из этого, целью данного исследования явилось изучение роли NO в развитии ишемии мозга в острой фазе путем анализа продукции NO в гиппокампе и лобных долях мозга крыс. Эти исследования проводились коллективом, в котором участвовали также сотрудники Института физиологии НАН Беларуси проф. В.А. Кульчицкий, С.Г. Пашкевич, А.А. Денисов, М.О. Досина, А.С. Замаро, Ю.П. Такальчук.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах. Модель ишемического инсульта воспроизводилась сотрудниками института физиологии НАН Беларуси, г. Минск. Опыты проводили в светлое время суток на самцах белых крыс (исходная масса 139–145 г). Для ишемии крысы подвергались гипоксическому воздействию, которым служило 10-минутное нарушение кровотока путем перевязки обеих сонных артерий на уровне голосовых связок. Через 1 сутки после гипоксического воздействия осуществляли забор тканей: левый и правый гиппокамп из-за небольшого объема объединяли в один образец (100 мг), брали также 100 мг печени.

Изучали содержание NO в гиппокампе и лобных долях мозга крыс. Трудность определения содержания свободного NO в тканях организма заключается в коротком времени его жизни, что проявляется в его низкой концентрации в тканях. В последнее время одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях стал метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [17, 18] с использованием методики спиновых ловушек, которая позволяет детектировать NO в малых концентрациях [19]. Нами в качестве спиновой ловушки был применен комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом – $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}$. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$) в таком состоянии сохраняется, и сигнал от комплекса не изменяется в течение не менее месяца [18, 19]. Подробности эксперимента и методики описаны ранее [10, 20]. Основные измерения проводились на спектрометре ЭПР фирмы “Bruker” EMX/plus с температурной приставкой ER 4112HV в X-диапазоне (9.50 ГГц). Амплитуда модуляции, усиление и мощность СВЧ были подобраны таким образом, чтобы избежать перемодуляции и насыщения сигнала ЭПР, и сохранялись одинаковыми на протяжении всех измерений.

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего $M \pm SEM$. С применением t-критерия Стьюдента

и U-критерия Манна-Уитни [21] проверяли достоверность отличия средних значений уровней NO в разных тканях контрольных крыс и крыс после моделирования инсульта. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования и обсуждение

Регистрировали спектры ЭПР у крыс после ишемии, в качестве контроля тестировались интактные животные (рис. 1). Во всех измеренных спектрах ЭПР регистрировали характерный триплетный сигнал от комплекса на основе спиновой ловушки $(\text{DET})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ [5, 19], интегральная интенсивность которого прямо пропорциональна содержанию NO в образце.

На рис. 1 показаны спектры ЭПР гиппокампа крыс после ишемии, вызванной гипоксическим воздействием, которым служило 10-мин нарушение кровотока путем перевязки обеих сонных артерий на уровне голосовых связок, в сравнении со спектром контрольных животных. Найдено, что ишемия мозга приводит к достоверному снижению содержания NO в гиппокампе через 1 день после ишемии (рис. 2), в лобных долях мозга через 1 день после ишемии также наблюдается снижение содержания NO, но не достоверное (рис. 3).

Таким образом, было обнаружено, что моделирование ишемии методом перевязки обеих сонных артерий приводит к снижению уровня продукции оксида азота в тканях гиппокампа мозга, лобных долях и печени. Роль NO в развитии ишемии давно привлекает внимание исследователей. Так, с использованием метода измерения активности NO-синтазы (NOS) было показано увеличение активности нейрональной NOS уже через 10 мин от начала ишемии мозга с максимумом через 3 ч [23],

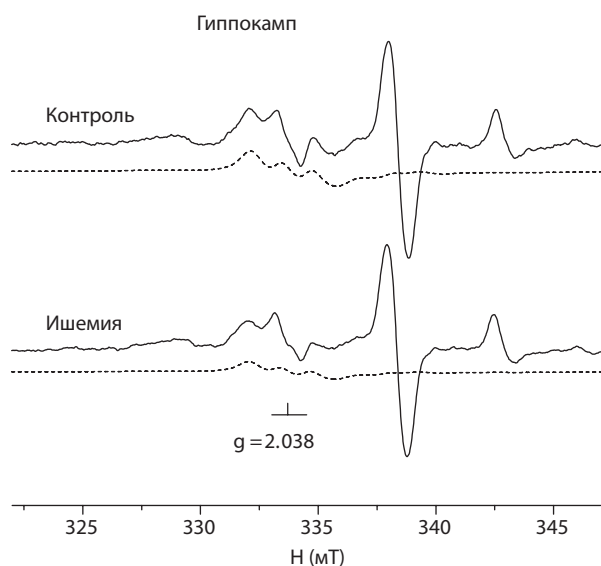


Рис. 1. Спектры ЭПР гиппокампа контрольной крысы и крыс через 1 день после ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий. Пунктиром показан вклад NO в наблюдаемом сигнале. $T = 140 \text{ K}$, $\nu = 9.53 \text{ ГГц}$.

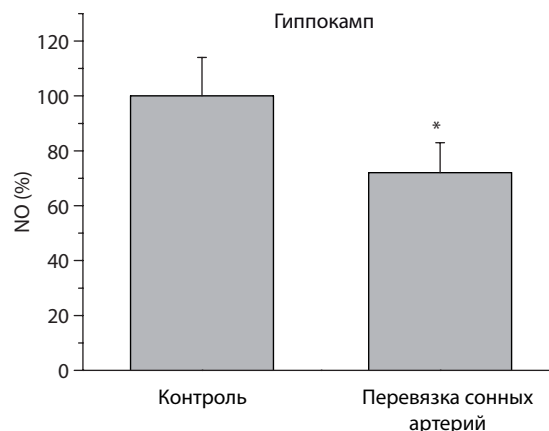


Рис. 2. Содержание NO в гиппокампе при моделировании гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий. Ось ординат – средняя интегральная интенсивность сигнала $(\text{DET})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. * – достоверное отличие ($p < 0.05$) от контроля.

а между 24 и 48 ч после ишемии начинается экспрессия iNOS [23]. Также отмечается сверхпродукция NO при острой гипоксии [24]. В некоторых моделях ишемии мозга в ряде исследований были получены результаты, не совпадающие с точкой зрения о нейротоксической роли ишемически генерируемого NO [5, 16]. NO выполняет свои физиологические функции, связываясь с ионами железа (Fe^{2+}) в составе гема, либо через S-нитрозилирование белков [18, 25]. Отсюда можно предположить, что эффект зависит от количества образующегося NO, однако, не ясно, какие количества NO считать небольшими, а какие увеличенными при развитии различных патологических ситуаций [26–28]. Наше исследование также приводит к гипотезе о сложной динамике содержания NO в мозге после ишемии. Поэтому, исходя из времени течения изменений уровней NO и регуляции NOS в головном мозге и сосудов мозга, индуцированных ишемией, должны применяться несколько стратегий, чтобы манипулировать системой NO для лечения инсульта [13].

Авторы благодарят сотрудников института физиологии НАН Беларуси, г. Минск проф. Кульчицкого В.А., Пашкевич С.Н., Денисова А.А., Досину М.О., Замаро А.С., Такальчук Ю.П. за проведенные эксперименты по моделированию ишемии.

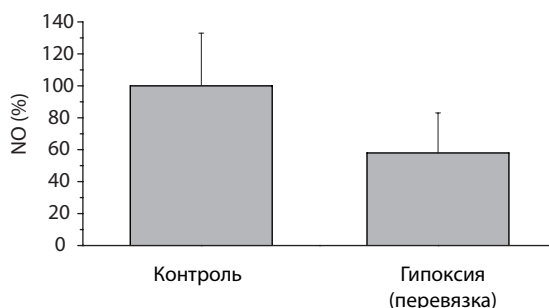


Рис. 3. Содержание NO в лобных долях мозга при моделировании гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий. Ось ординат – средняя интегральная интенсивность сигнала $(\text{DET})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-515-00003) и БРФФИ (грант Б18Р-227).

Литература

1. Bolanos J.P., Almeida A.: *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**, 415–436 (1999)
2. Hoff M.L., Fabrizio A., Czech-Damal N.U., Folkow L.P., Burmester T.: *PLoS One* **12**, no. 1, 2017. e0169366.
3. Doyle K.P., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P.: *Neuropharmacology* **55**, 310–318 (2008)
4. Remizova M.I., Kochetygov N.I., Gerbout K.A., Lakomkin V.L., Timoshin A.A., Burgova E.N., Vanin A.F.: *Eur. J. Pharmacol.* **662**, 40–46 (2011)
5. Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S., Golubeva A.V., Davydova M.P., Jafarova G.G., Andrianov V.V., Koshelev V.B.: *Appl. Magn. Reson.* **40**, 267–278 (2011)
6. Andrianov V.V., Pashkevich S.G., Yafarova G.G., Denisov A.A., Iyudin V.S., Bogodvid T.Kh., Dosina M.O., Kulchitsky V.A., Gainutdinov Kh.L.: *Appl. Magn. Reson.* **47**, 965–976 (2016)
7. Ванин А.Ф.: Соросовский образовательный журн. №11, 7–12 (2001)
8. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.: *Physiol. Rev.* **87**, 315–427 (2007)
9. Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Гурин В.Н.: *Успехи физиол. наук.* **38**, 39–58 (2007)
10. Андрианов В.В., Ситдииков Ф.Г., Гайнутдинов Х.Л., Юртаева С.В., Обынчый А.А., Яфарова Г.Г., Муранова Л.Н., Каримов Ф.К., Чиглинцев В.М., Июдин В.С.: *Онтогенез.* **39**, 437–442 (2008)
11. Timoshin A.A., Pisarenko O.I., Tskitishvili O.V., Serebriakova L.I., Studneva I.M., Drobotova D.Iu., Ruuge E.K., Vanin A.F.: *Biofizika* **55**, 1099–107 (2010)
12. Steinert J.R., Chernova T., Forsythe I.D.: *Neuroscientist* **16**, 435–452 (2010)
13. Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. J. *Cerebral Blood Flow & Metabolism* **32**, 1332–1346 (2012)
14. Андрианов В.В., Яфарова Г.Г., Июдин В.С., Гайнутдинов Х.Л.: *Казанский физико-технический институт им. Е.К.Завойского – Ежегодник* 2014, 2015. С. 45–48.
15. Андрианов В.В., Яфарова Г.Г., Июдин В.С., Гайнутдинов Х.Л.: *Казанский физико-технический институт им. Е.К.Завойского – Ежегодник* 2016, 2017. С. 44–46.
16. Godinez-Rubi M., Rojas-Mayorquin A.E., Ortuno-Sahagun D.: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, 1–16 (2013)
17. Khramtsov V.V., Volodarsky L.B.: *Biol. Magnet. Reson.* **14**, 109–180 (1998)
18. Vanin A.F., Huisman A., Van Faassen E.E.: *Methods in Enzymology* **359**, 27–42 (2003)
19. Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф.: *Биофизика* **39**, 915–918 (1994)
20. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Июдин В.С., Юртаева С.В., Яфарова Г.Г., Файзуллина Р.И., Ситдииков Ф.Г.: *Биофизика* **58**, 276–280 (2013)
21. Лакин Г.Ф.: *Биометрия. М.: Высшая школа* 1990. 113 с.
22. Samdani A.F., Dawson T.M., Dawson V.L.: *Stroke.* **28**, 1283–1288 (1997)
23. Iadecola C., Zhang F., Casey R., Nagayama M., Ross M.E.: *J. Neurosci.* **17**, 9157–9164 (1997)
24. Manukhina E.B., Malyshev I.Y., Smirin B.V., Mashina S.Y., Saltykova V.A., Vanin A.F.: *Nitric Oxide* **3**, 393–401 (1999)
25. Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R., Darley-Usmar V.M.: *J. Biol. Chem.* **285**, 19699–19704 (2010)
26. Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J.B., Dinkova-Kostova A.T., Butterfield D.A.: *Antioxidants and Redox Signaling* **11**, 2717–2739 (2009)
27. Ismailova A.I., Gnezdilov O.I., Muranova L.N., Obynochny A.A., Andrianov V.V., Gainutdinov Kh.L., Nasyrova A.G., Nigmatullina R.R., Rakhmatullina F.F., Zefirov A.L.: *Appl. Magn. Reson.* **28**, 421–430 (2005)
28. Гайнутдинов Х.Л., Файзуллина Р.И., Андрианов В.В., Гильмутдинова Р.И., Июдин, В.С., Яфарова Г.Г., Ситдииков Ф.Г.: *Бюлл. exper. биол. мед.* **154**, 590–592 (2012)