

14

Применение ЭПР спектроскопии для исследования содержания NO и меди в лобных долях, гиппокампе и печени крыс после ишемии мозга

© Х.Л. Гайнутдинов,^{1,2} В.А. Кульчицкий,³ В.В. Андрианов,^{1,2} Г.Г. Яфарова,^{1,2} Ю.П. Токальчик,³
А.С. Замаро,³ Л.В. Базан,¹ Т.Х. Богодвид,^{2,4} В.С. Июдин,¹ С.Г. Пашкевич,³ М.О. Досина³

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

420029 Казань, Россия

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

420008 Казань, Россия

³ Институт физиологии НАН Беларуси, Центр мозга,

220072 Минск, Беларусь

⁴ Поволжский университет физической культуры, спорта и туризма,

420010 Казань, Россия

e-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступило в Редакцию 29 декабря 2021 г.

В окончательной редакции 29 декабря 2021 г.

Принято к публикации 1 марта 2022 г.

Для регистрации содержания оксида азота (NO) и меди в тканях мозга (лобные доли и гиппокамп) и печени здоровых крыс и крыс после моделирования ишемии использован метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Моделирование ишемии осуществлялось перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 ml крови. Методом ЭПР спектроскопии регистрировались сигналы от тройных комплексов (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO и комплекса Cu(ДЭТК)₂. На основе прямых измерений методом ЭПР спектроскопии показано, что через сутки после моделирования ишемии происходит ослабление продукции NO в гиппокампе в среднем на 30%, и наблюдается тенденция к снижению NO в лобных долях и печени. Содержание меди через сутки после моделирования ишемии снижалось в лобных долях в среднем в 3 раза, в гиппокампе в среднем на 20%, а в печени отмечена тенденция к уменьшению. Таким образом, гипоксия головного мозга сопровождается не только снижением продукции NO, но и признаками ослабления антиоксидантной системы в гиппокампе и лобных долях, что дополнительно ухудшает функциональное состояние системы гомеостаза.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, спиновая ловушка, оксид азота, ишемия мозга, лобные доли, гиппокамп.

DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52652.333-21

Введение

Оксид азота (NO) является одной из ключевых сигнальных молекул, которые регулируют физиологические функции организма, включая нервную систему [1,2]. NO продуцируется из аминокислоты L-аргинина ферментами семейства NO-синтазы (NOS) и участвует в контроле целого ряда клеточных функций, включая регуляцию тонуса кровеносных сосудов, нейротрансмиссию, обучение, иммунный ответ и другие функции [3]. В жизнедеятельности животных и человека особо значима роль NO в функционировании сердечно-сосудистой [4,5] и нервной систем [1,6]. Большой интерес привлекает участие NO в механизмах развития различных патологических состояний организма [4,7,8]. Накопились факты, свидетельствующие о том, что биосинтез NO является одним из ключевых факторов в патофизиологическом ответе мозга на гипоксию-ишемию [6,9,10]. 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 [11].

Одной из причин вовлечения NO в патологический процесс служит длительная нехватка кислорода, которая ведет к гипоксии мозга. Гипоксия сопровождается развитием ишемии тканей, которая возникает всегда при несоответствии снабжения тканей организма кислородом той реальной потребности, в которой нуждаются ткани [6,9]. 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, сопровождаемым повреждением тканей мозга и его функций [12,13]. В связи с этим изучение патогенеза, способов профилактики, коррекции и механизмов инсульта представляется важным как с теоретической, так и с практической точек зрения.

В настоящее время развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с нарушениями мозгового кровотока, а также с нарушениями его регуляции системой NO [14,15]. К сожалению, до сих пор нет единого мнения о роли эндогенного NO в процессах, протекающих при повреждениях нервной системы [16]. И этому есть объяснение. Существует большое количество методов измерения продукции NO в биологических системах. В последнее время одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях стал метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [11,17,18]. Это произошло благодаря методике, разработанной Ваньным с сотрудниками, в которой они использовали метод спинового захвата, основанный на реакции радикала (в данном случае NO) со спиновой ловушкой [19]. В результате реакции образуется аддукт с характерным спектром ЭПР. Было найдено, что комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) при захвате NO формирует устойчивый тройной комплекс $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Эти комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора $g = 2.035\text{--}2.040$ и триплетной сверхтонкой структурой [11,18]. Метод обладает чувствительностью $0.04\text{--}0.4\text{ nM}$, позволяет проводить прямые измерения, является высокочувствительным за счет применения спиновых ловушек.

Таким образом, динамика содержания NO в тканях мозга в ходе возникновения и течения ишемии мозга до сих пор остается недостаточно изученной, несмотря на признание факта, что основной вклад вносит NO, продуцируемый nNOS и iNOS [1,14,20].

Целью настоящей работы было исследование методом ЭПР спектроскопии с применением методики спиновых ловушек последствий экспериментального ишемического повреждения мозга на интенсивность продукции NO в лобных долях, гиппокампе и печени крыс.

1. Методика эксперимента

1.1. Моделирование ишемического инсульта у крыс

Моделирование ишемического повреждения мозга осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (НАН Беларуси), г. Минск. Опыты проводили в светлое время суток на четырехнедельных самцах белых крыс (исходная масса $139\text{--}145\text{ g}$).

Животных содержали в стандартных условиях вивария (с поддержанием 12/12-часового ритма освещения и темноты, температуры воздуха на уровне $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и стабильной приточно-вытяжной вентиляцией) при свободном доступе к воде и пище (*ad libitum*) и стандартном рационе питания в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Животные были разделены на две группы: 1-я группа ($n = 10$) — интактные (контрольные) крысы, контрольная группа животных не подвергалась хирургическим вмешательствам и тестировалась в тех же условиях, что и иные группы крыс; 2-я группа ($n = 10$) — крысы, подвергавшиеся гипоксическому воздействию (10 min нарушение кровотока путем перевязки обеих сонных артерий на уровне голосовых связок и взятие из общей сонной артерии в объеме 3 ml крови).

1.2. Соблюдение этических стандартов

В исследованиях были использованы животные (крысы), в работе соблюдались стандарты работы с животными. Моделирование инсульта осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике (протокол № 1 от 31.01.2019 г.) Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (НАН Беларуси), г. Минск.

Все операционные процедуры, а также извлечение тканей, проводили на наркотизированных животных (55.6 mg/kg кетамина, 5.5 mg/kg ксилазина, 1.1 mg/kg ацепромазина, внутривенно) [10,21].

1.3. Формирование тройного комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в тканях крыс

При подготовке образцов для измерения ЭПР спектров ориентировались на методику спиновых ловушек [17]. Как и ранее [22,23] компоненты спиновой ловушки для оксида азота (ДЭТК-Na , FeSO_4 , sodium citrate) вводили за 30 min до извлечения исследуемых тканей. В качестве спиновой ловушки применяли комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом — $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$) характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора $g = 2.038$ и триплетной сверхтонкой структурой [11,17,24]. ДЭТК-Na вводили внутривенно в дозе 500 mg/kg в 2.5 ml воды. Смесь растворов: сульфата железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma, USA) в дозе 37.5 mg/kg и цитрата натрия в дозе 187.5 mg/kg (в объеме 1 ml воды на 300 g веса животного), приготовленную непосредственно перед введением, вводили подкожно в три точки — правое и левое бедро и в ростральную часть межлопаточной области. Подробности эксперимента и методики изложены ранее [23,24]. Образцы тканей сразу замораживали в жидком азоте и в замороженном состоянии перевозились из Минска в Казань в пластиковых контейнерах с сухим льдом. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$) в таком состоянии хорошо сохраняется, и сигнал от комплекса не изменяется в течение не менее месяца [18]. Кроме того, спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя комплекс $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$, который также может быть зарегистрирован методом ЭПР спектроскопии [25].

1.4. Проведение измерений методом ЭПР спектроскопии

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 GHz) EMX/plus с температурной приставкой ER 4112HV и ER 200 SRC при модуляции магнитного поля 100 kHz, амплитуды модуляции $2 \cdot 10^{-4}$ Т, 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 эти параметры сохранялись одинаковыми на протяжении всех измерений. Непосредственно перед измерением готовый образец, усеченный по форме кюветы для измерений, взвешивали. Масса образцов составляла около 100 mg. Амплитуду спектров ЭПР всегда нормировали на вес образца и на амплитуду сигнала ЭПР эталонного образца (подробности методики измерений сигналов ЭПР описаны нами ранее [26]).

1.5. 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 $p < 0.05$.

2. Результаты исследований и их обсуждение

Методом ЭПР спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя 1-й и 3-й субъединиц супероксиддисмутазы) в лобных долях, гиппокампе и печени при моделировании гипоксии головного мозга, вызванной перевязкой на 10 min сонных артерий с двух сторон и взятием из общей сонной артерии в объеме 3 ml крови.

На рис. 1 показан спектр ЭПР лобных долей контрольной крысы (рис. 1, *a*) и крысы после гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 ml крови (рис. 1, *b*) через сутки после ишемии головного мозга. На этом спектре виден характерный триплетный сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ со значением g -фактора, равным 2.038 [17]. Кроме того, в этой же области присутствует сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$. На рис. 2 представлены спектры ЭПР тканей гиппокампа здоровых крыс (рис. 2, *a*), а также крыс через 1 день после моделирования (вызванной перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 ml крови) ишемического инсульта (рис. 2, *b*). Сплошной линией представлен спектр образца, прерывистая линия — сигнал от оксида азота, связанного со спиновой ловушкой, в составе спектра комплекса $((\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO})$. Относительное изменение количества NO-содержащего

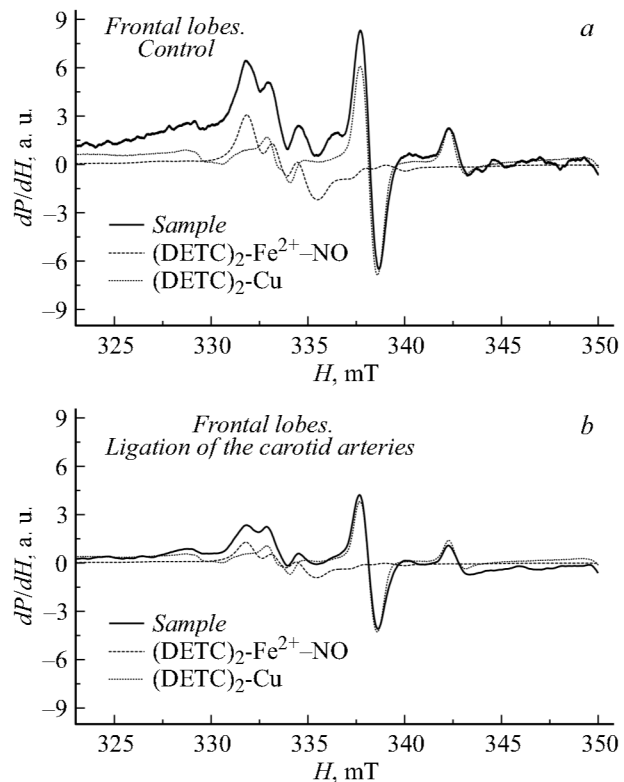


Рис. 1. Примеры спектров ЭПР лобных долей контрольной крысы (*a*) и крысы после гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 ml крови (*b*) через сутки после ишемии головного мозга. Животным производилась инъекция компонентами спиновой ловушки $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$ — citrate. $g_{\text{cp}} = 2.038$.

комплекса и комплекса $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$ оценивали по интегральной интенсивности сигнала от этих комплексов.

На рис. 3 приведены статистические данные по интегральной интенсивности сигнала $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в спектрах исследованных образцов биологических тканей, выявляющих особенности спектров при ишемическом инсульте, вызванном перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 ml крови для оценки продукции NO в тканях мозга (лобные доли и гиппокамп) и печени через сутки после моделирования ишемии. Результаты анализа демонстрируют снижение продукции NO после моделирования ишемического инсульта в гиппокампе в среднем на 30% ($p < 0.05$) и тенденцию к снижению продукции NO в лобных долях и печени. На рис. 4 приведены статистические данные по интегральной интенсивности сигнала $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$. Результаты показывают, что содержание меди через сутки после моделирования ишемии достоверно снижается в лобных долях в среднем в 3 раза ($p < 0.05$) и гиппокампе в среднем на 20% ($p < 0.05$), а в печени отмечена лишь тенденция к снижению. Таким образом, гипоксия сопровождается не

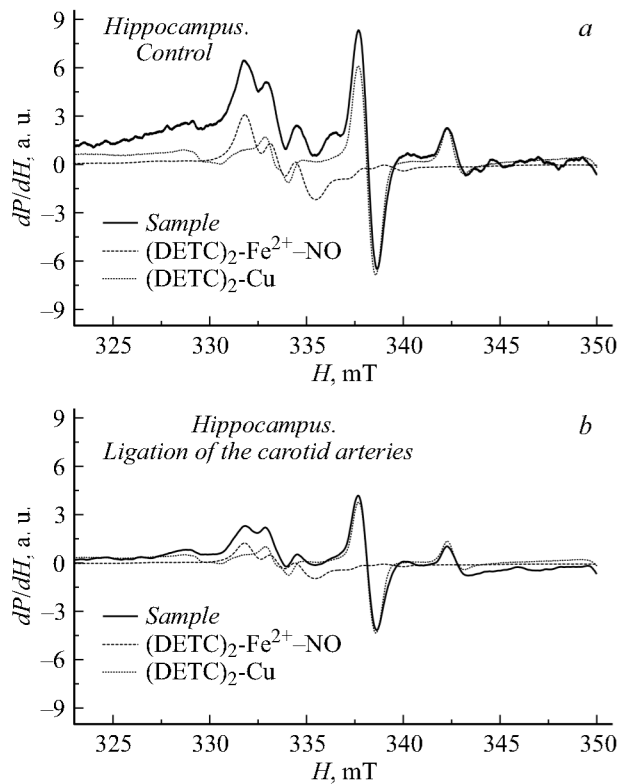


Рис. 2. Примеры спектров ЭПР гиппокампа контрольной крысы (a) и крысы после гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 ml крови (b) через сутки после ишемии головного мозга. Животным производилась инъекция компонентами спинной ловушки (ДЭТК)₂-Fe²⁺ — citrate. $g_{cp} = 2.038$.

только снижением продукции NO, но и ослаблением антиоксидантной системы гиппокампа и в лобных долях, что дополнительно ухудшает функциональное состояние нервной системы.

Инсульт мозга является ведущей причиной смерти и наиболее частой причиной инвалидности во всем мире [12]. Известно, что гипоксия сопровождается нарушениями снабжения кислородом отделов мозга, поэтому возникает ишемия мозга, которая часто завершается ишемическим инсультом [27]. Ранее мы проводили эксперименты, в которых моделировали ишемический инсульт разными способами: 5 min гипобарической гипоксией, которая достигалась условным подъемом животных на высоту 4500 m над уровнем моря [24], перевязкой общих сонных артерий [8,28]. В настоящей работе был применен более сложный вариант — перевязку общих сонных артерий сочетали со взятием из общей сонной артерии 3 ml крови. В данном исследовании отчетливо продемонстрировано, что развитие ишемии мозга сопровождается снижением интенсивности продукции NO.

С одной стороны, развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с ослабле-

нием церебрального кровотока, а также с нарушениями регуляции кровоснабжения тканей мозга системой NO [6,9,14,26,29]. С другой стороны, сама гипоксия, возникшая в результате ишемического инсульта, сопровождается ранней гибелью клеток в различных отделах мозга, за которой следует запрограммированная поздняя

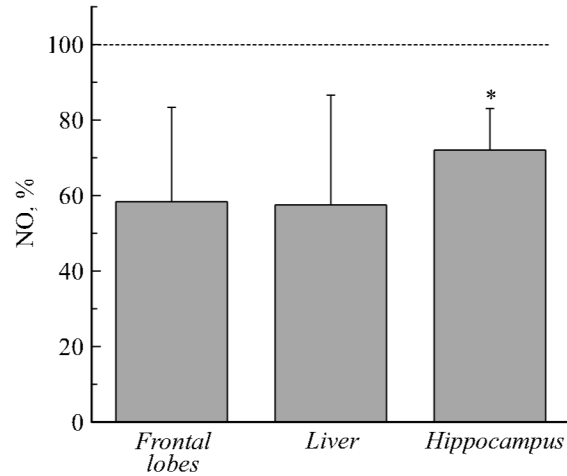


Рис. 3. Содержание NO в лобных долях мозга, печени и гиппокампе при моделировании гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий через сутки после ишемии. Ось ординат — удельная интенсивность сигнала комплексов (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO в образцах тканей животных после моделирования ишемии, в процентах от интенсивности сигналов комплексов (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO в контрольной группе. * — отличие от контроля (t-test, $p < 0.05$).

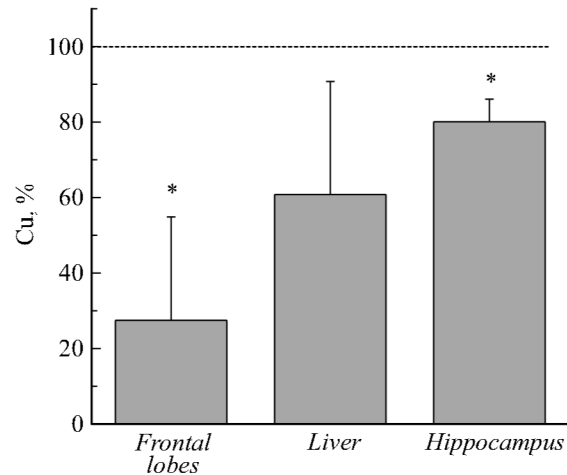


Рис. 4. Содержание меди в лобных долях мозга, печени и гиппокампе при моделировании гипоксии, вызванной перевязкой сонных артерий через сутки после ишемии. Ось ординат — удельная интенсивность сигнала комплексов Cu(ДЭТК)₂ в образцах тканей животных после моделирования ишемии, в процентах от интенсивности сигналов комплексов Cu(ДЭТК)₂ в контрольной группе. * — отличие от контроля (t-test, $p < 0.05$).

гибель других клеток мозга путем апоптоза [30]. В этих процессах гипоксии–ишемии роль NO представляется противоречивой: NO способен выполнять как нейротоксические, так и нейропротекторные функции [9,16]. Причинами противоречивых функций NO является его синтез разными NO-синтазами как основного источника NO [6,14], наличие нитроредуктазной компоненты цикла NO [4,9], а также значительное число депо для NO, которые взаимодействуют с комплексами, содержащими железо (например, гемовые структуры), с тиолами и другими соединениями [10,31,32].

Заключение

Методом ЭПР спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в лобных долях, гиппокампе и печени крыс после моделирования ишемического повреждения головного мозга. Эти молекулярные компоненты постоянно привлекают внимание исследователей при изучении механизмов функционирования мозга в норме и при патологических условиях. Показано, что через 1 день после моделирования ишемии происходит снижение продукции NO в гиппокампе и наблюдается тенденция к снижению NO в лобных долях и печени, а содержание меди достоверно снижается в лобных долях и гиппокампе и незначительно ($p < 0.05$) в печени. Таким образом, можно считать, что гипоксия сопровождается не только снижением продукции NO, но и ослаблением антиоксидантной системы в гиппокампе и лобных долях, что дополнительно ухудшает функциональное состояние нервной системы.

Благодарности

Моделирование ишемии проводили в Центре мозга, Институт физиологии НАН Беларуси (Минск, Беларусь).

Финансирование работы

Работа поддержана грантом Государственного комитета по науке и Технологиям Республики Беларусь (грант № В18Р-227). Измерения спектров ЭПР образцов проводили в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН. Хранение образцов и обработку результатов проводили за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe. *Neuroscientist*, **16** (4), 435–452 (2010). DOI: 10.1177/1073858410366481
- [2] А.А. Тимошин, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге, А.Ф. Ванин. *ДАН*, **462** (2), 241–243 (2015). DOI: 10.7868/S0869565215140285 |A.A. Timoshin, V.L. Lakomkin, A.A. Abramov, E.K. Ruuge, A.F. Vanin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **462** (1), 166–168 (2015). DOI: 10.1134/s1607672915030072
- [3] J. Garthwaite. *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 2783–2802 (2008). DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x
- [4] В.П. Реутов, В.Е. Охотин, А.В. Шуклин, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын, В.Н. Гурин. *УФН*, **38** (4), 39–58 (2007).
- [5] В.В. Андрианов, Ф.Г. Ситдиков, Х.Л. Гайнутдинов, С.В. Юртаева, А.А. Обычный, Г.Г. Яфарова, Л.Н. Муранова, Ф.К. Каримов, В.М. Чиглинцев, В.С. Июдин. *Онтогенез*, **39** (6), 437–442 (2008). [V.V. Andrianov, F.G. Sitdikov, Kh.L. Gainutdinov, S.V. Yurtaeva, L.N. Muranova, A.A. Obynochnyi, F.K. Karimov, V.M. Chiglintsev, V.S. Iyudin. *Russ. J. Develop. Biol.*, **38** (6), 352–356 (2008).]
- [6] N.A. Terpolilli, M.A. Moskowitz, N. Plesnila. *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **32**, 1332–1346 (2012). DOI: 10.1038/jcbfm.2012.12
- [7] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. *Physiol. Rev.*, **87**, 315–427 (2007). DOI: 10.1152/physrev.00029.2006
- [8] Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, Г.Г. Яфарова, Л.В. Базан, Т.Х. Богодвид, С.Г. Пашкевич, М.О. Досина, А.С. Замаро, А.А. Денисов, В.А. Кульчицкий. *ЖТФ*, **90** (9), 1481–1486 (2020). DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49679.432-19 |Kh.L. Gainutdinov, V.V. Andrianov, G.G. Yafarova, L.V. Bazan, T.Kh. Bogodvid, S.G. Pashkevich, M.O. Dosina, A.S. Zamara, A.A. Denisov, V.A. Kulchitsky. *Tech. Phys.*, **65** (9), 1421–1426 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090182
- [9] P.S. Garry, M. Ezra, M.J. Rowland, J. Westbrook, K.T. Pattinson. *Exp. Neurol.*, **263**, 235–243 (2015). DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.10.017
- [10] O.G. Deryagin, S.A. Gavrilo, Kh.L. Gainutdinov, A.V. Golubeva, V.V. Andrianov, G.G. Yafarova, S.V. Buravkov, V.B. Koshelev. *Frontiers Neurosci*, **11**, 427 (2017). DOI: 10.3389/fnins.2017.00427
- [11] A.F. Vanin, A. Huisman, E.E. Van Faassen. *Methods in Enzymology. Pitfalls and Successes*, **359**, 27–42 (2003). DOI: 10.1016/S0076-6879(02)59169-2
- [12] G.A. Donnan, M. Fisher, M. Macleod, S.M. Davis. *Lancet*, **37**, 1612–1623 (2008).
- [13] T.A. Voronina. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, **14** (1), 63–70 (2016). <https://doi.org/10.17816/RCF14163-70>
- [14] J.P. Bolanos, A. Almeida. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1411**, 415–436 (1999).
- [15] В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Н. Швалев, О.В. Космачевская, А.Л. Крушинский, В.С. Кузенков, М.М. Свинов, Н.С. Косицын. *УФН*, **43** (4), 73–93 (2012).
- [16] A. Godecke, J. Schrader. *Circ. Res.*, **94**, e55–e57 (2004).
- [17] V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, V.A. Serezhenkov, R.A. Stukan, A.F. Vanin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 225–234 (1997). DOI: 10.1016/S0304-4165(97)00032-9
- [18] N. Hogg. *Free Radical Biology Medicine*, **49**, 122–129 (2010).

- [19] A.F. Vanin, P.I. Mordvintcev, A.L. Kleschyov. *Studia Biophys.*, **102**, 135–143 (1984).
- [20] V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A.M.G. Stella. *Nature Rev. Neuroscience*, **8**, 767–775 (2007). DOI: 10.1038/nrn2214
- [21] Y. Shanko, V. Navitskaya, A. Zamaro, S. Krivenko, M. Zafranskaya, S. Pashkevich, S. Koulchitsky, Y. Takalchik (Stukach), A. Denisov, V. Kulchitsky. *Biomed J. Sci. Tech. Res.*, **10** (1), 1–3 (2018). DOI: 10.26717/BJSTR.2018.10.001884
- [22] A.I. Ismailova, O.I. Gnezdilov, L.N. Muranova, A.A. Obynochny, V.V. Andrianov, Kh.L. Gainutdinov, A.G. Nasyrova, R.R. Nigmatullina, F.F. Rahmatullina, A.L. Zefirov. *Appl. Magn. Reson.*, **28**, 421–430 (2005).
- [23] Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, В.С. Июдин, С.В. Юртаева, Г.Г. Яфарова, Р.И. Файзуллина, Ф.Г. Ситдииков. *Биофизика*, **58** (2), 276–280 (2013). [Kh.L. Gainutdinov, V.V. Andrianov, V.S. Iyudin, S.V. Yurtaeva, G.G. Jafarova, R.I. Faisullina, F.G. Sitdikov. *Biophysics*, **58** (2), 203–205 (2013).]
- [24] V.V. Andrianov, S.G. Pashkevich, G.G. Yafarova, A.A. Denisov, V.S. Iyudin, T.Kh. Bogodvid, M.O. Dosina, V.A. Kulchitsky, Kh.L. Gainutdinov. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (9), 965–976 (2016).
- [25] E.E. van Faassen, M.P. Koeners, J.A. Joles, A.F. Vanin. *Nitric Oxide*, **18**, 279–286 (2008).
- [26] Kh.L. Gainutdinov, S.A. Gavrilova, V.S. Iyudin, A.V. Golubeva, M.P. Davydova, G.G. Jafarova, V.V. Andrianov, V.B. Koshelev. *Appl. Magn. Reson.*, **40**, 267–278 (2011).
- [27] R.L. Zhang, Z.G. Zhang, M. Chopp. *Expert Opin Investig Drugs*, **22** (7), 843–851 (2013). DOI: 10.1517/13543784.2013.793672
- [28] V.V. Andrianov, G.G. Yafarova, S.G. Pashkevich, Y.P. Tokalchik, M.O. Dosina, A.S. Zamaro, T.Kh. Bogodvid, V.S. Iyudin, L.V. Bazan, A.A. Denisov, V.A. Kulchitsky, Kh.L. Gainutdinov. *Appl. Magn. Res.*, **51** (4), 375–387 (2020). DOI: 10.1007/s00723-020-01195-0
- [29] E.B. Manukhina, I.Y. Malyshev, B.V. Smirin, S.Y. Mashina, V.A. Saltykova, A.F. Vanin. *Nitric Oxide*, **3**, 393–401 (1999). DOI:10.1006/niox.1999.0244
- [30] M.H.K. Ansari, P. Karimi, N. Shakib, S.M. Beyrami. *Crescent J. Medic. Biol. Sci.*, **5** (1), 50–56 (2018).
- [31] S.V. Yurtaeva, V.N. Efimov, G.G. Yafarova, A.A. Ereemeev, V.S. Iyudin, A.A. Rodionov, Kh.L. Gainutdinov, I.V. Yatsyk. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (6), 555–565 (2016).
- [32] V.E. Prusakov, Y.V. Maksimov, D.Sh. Burbaev, V.A. Serezhenkov, R.R. Borodulin, N.A. Tkachev, V.D. Mikoyan, A.F. Vanin. *Appl. Magn. Reson.*, **50** (7), 861–881 (2019). DOI: 10.1007/s00723-020-01195-0