

Применение метода ЭПР спектроскопии для исследования динамики содержания NO и меди в гиппокампе, обонятельной луковице и печени крыс после моделирования сочетанной травмы головного и спинного мозга

Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}, Кульчицкий В.А.⁴, Андрианов В.В.^{1,2} и др.



ЭПР исследование содержания оксида азота и меди в различных отделах спинного мозга крыс после моделирования сочетанной травмы головного и спинного мозга

Базан Л.В.¹, Яфарова Г.Г.², Андрианов В.В.^{1,2} и др.

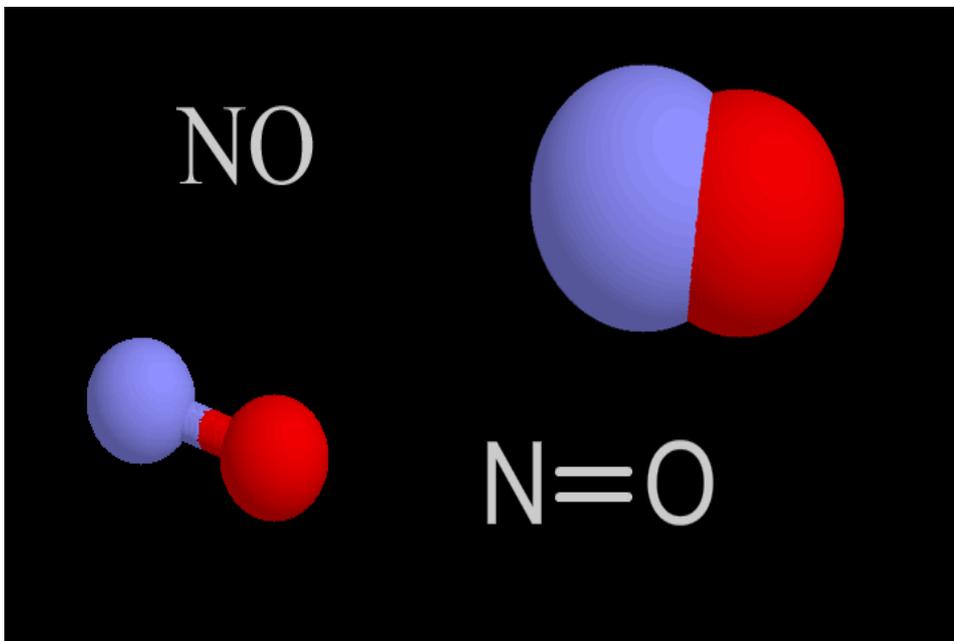
¹КФТИ им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН;

²Казанский (Приволжский) федеральный университет;

³Поволжский университет физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия;

⁴Центр мозга, Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.

Введение



Оксид азота (NO) – одна из сигнальных молекул, регулирующих метаболизм клеток и физиологические функции организма. Открытие способности клеток млекопитающих к синтезу NO стимулировало огромные усилия исследователей к изучению роли NO во всех областях биологии и медицины. Существует множество доказательств того, что нарушение биосинтеза NO является ведущим фактором патофизиологической реакции мозга на гипоксию-ишемию. Функциональная роль эндогенного NO в процессах, протекающих при повреждениях нервной системы, противоречива и недостаточно исследована. Это обусловлено тем, что NO является примером классического двуликого Януса.

Stroke

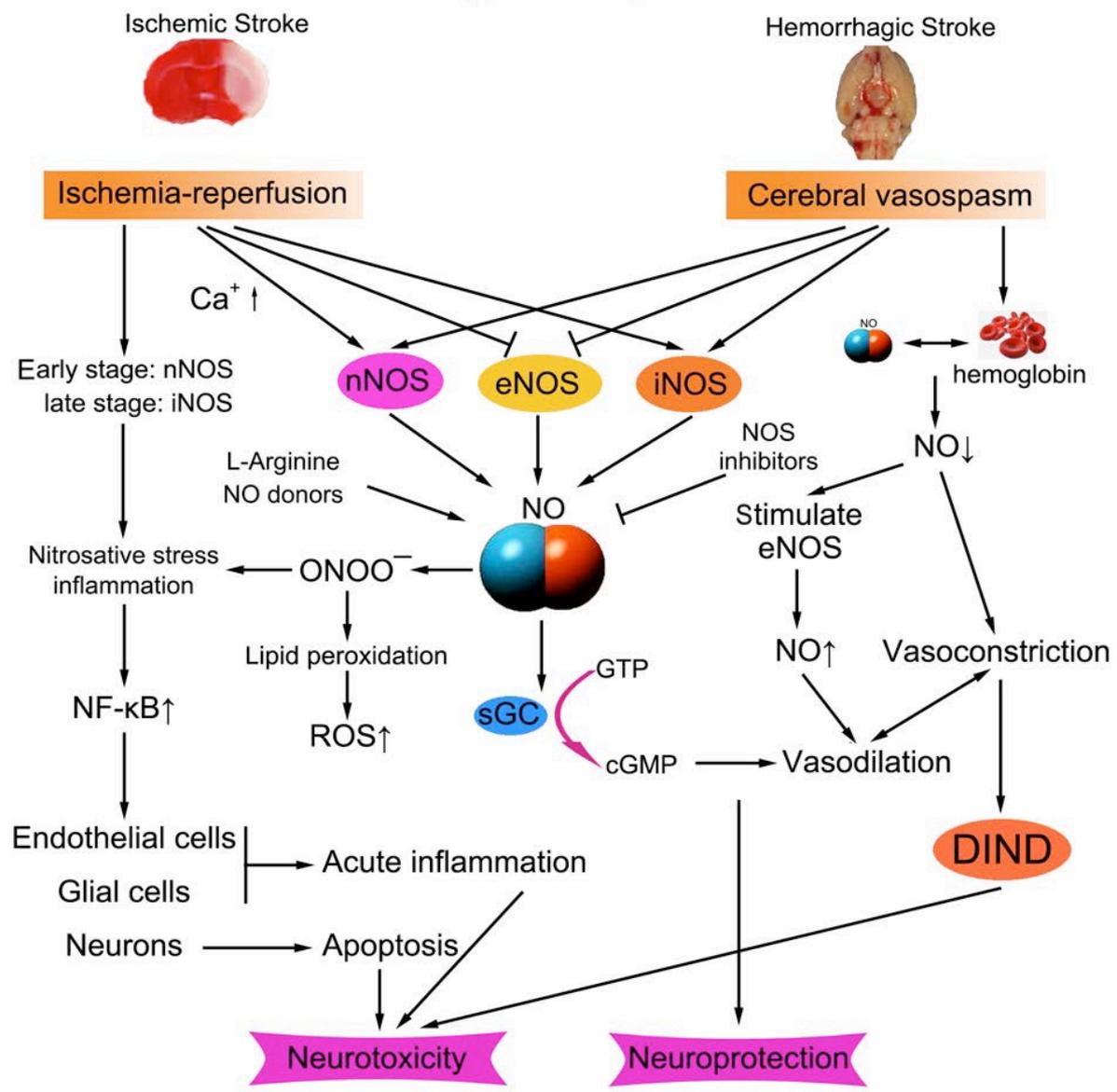
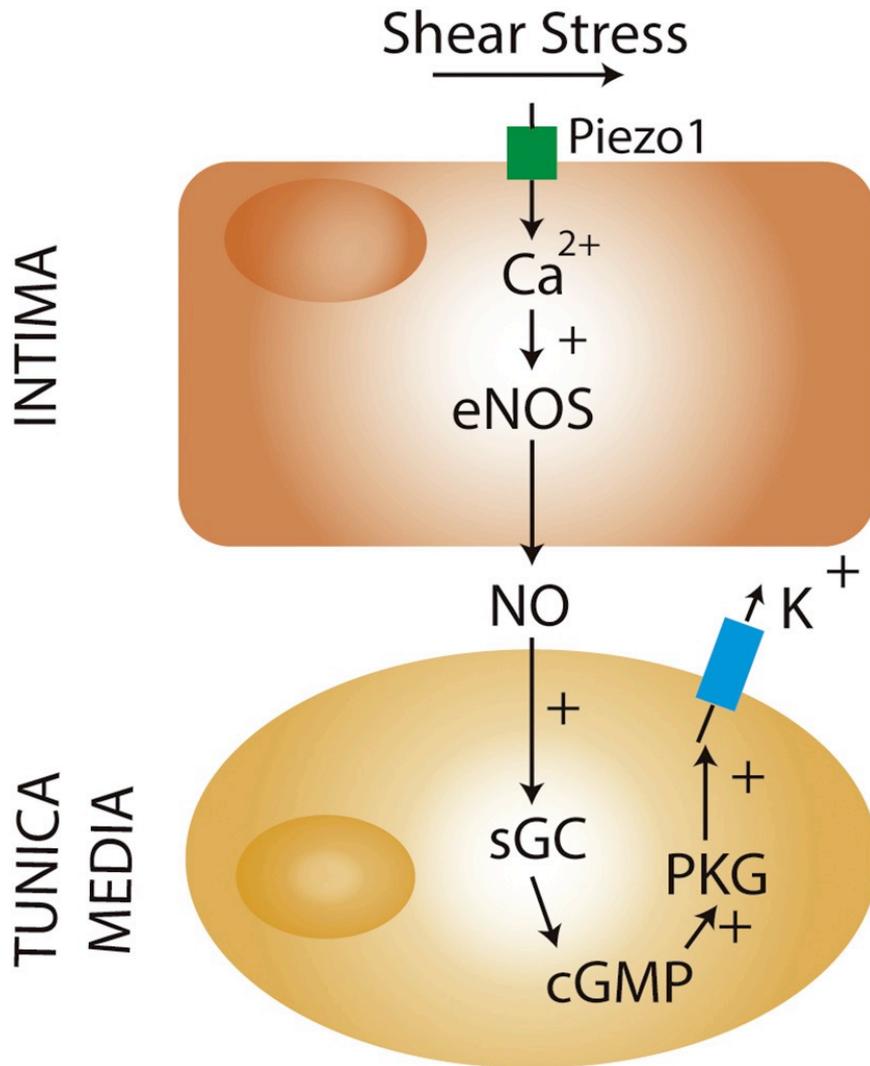


Схема синтеза NO и действия ишемического и геморрагического повреждений.

Note: NO: Nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; nNOS: neuronal NOS; eNOS: endothelial NOS; iNOS: inducible NOS; sGC: soluble guanylate cyclase; ROS: reactive oxygen species; DIND: delayed ischemic neurological deficits;

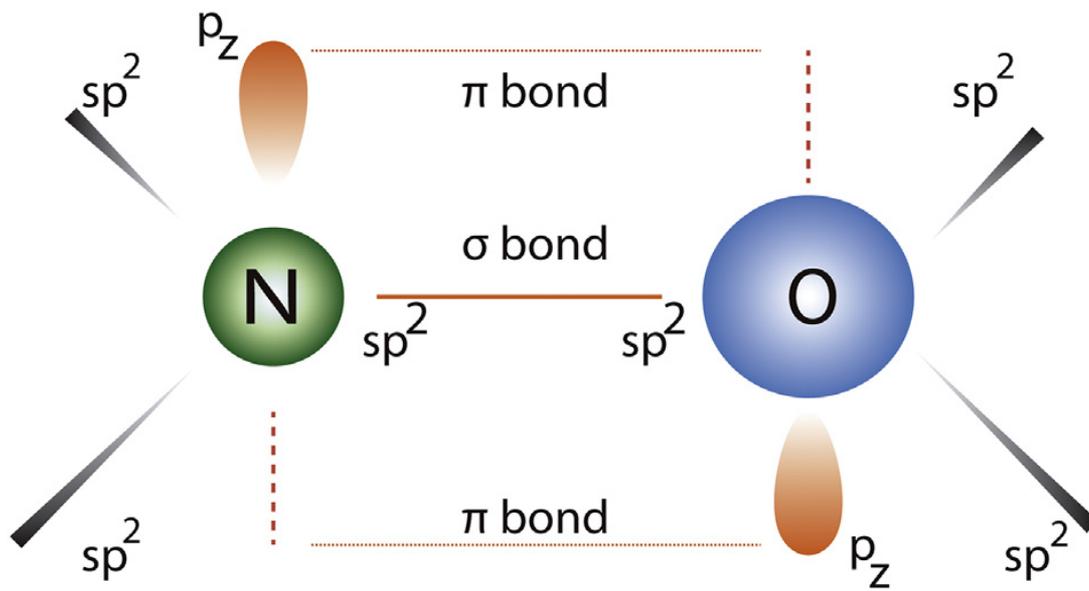
OONO⁻: peroxynitrite anion; NF- κ B: nuclear factor- κ B; GTP: guanosine triphosphate; cGMP: cyclic guanosine monophosphate.

Chen ZQ et al., Med Gas Res. 7(3): 194.



NO is a vasorelaxant agent.

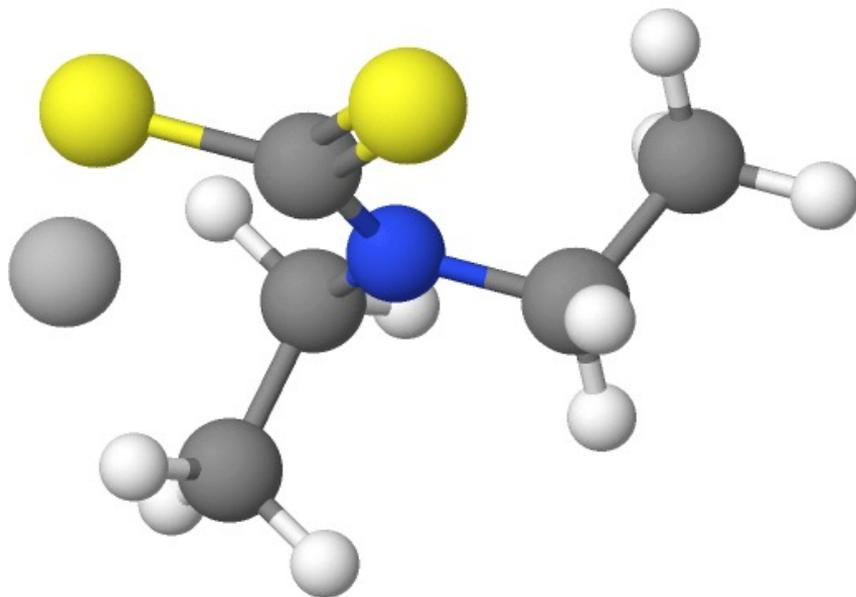
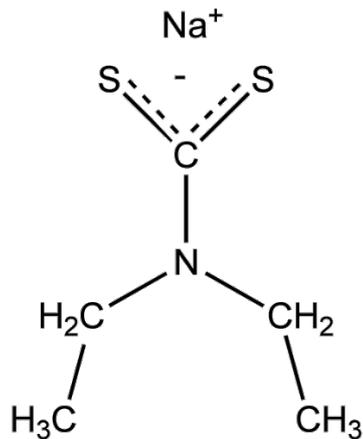
При развитии патологических процессов в мозге (гипоксия и ишемия) регуляторные системы мозга (включая NO систему) увеличивают активность, что естественным образом сопровождается возрастанием потребления кислорода (что усугубляет гипоксию). Показано, что церебральная ишемия вызывает множественные и разнонаправленные изменения содержания NO в мозге и в передаче сигналов. Таким образом, изучение закономерностей изменений содержания NO в мозге при ишемических процессах в головном мозге является актуальным. Важным свойством NO является его действие как вазорелаксанта.



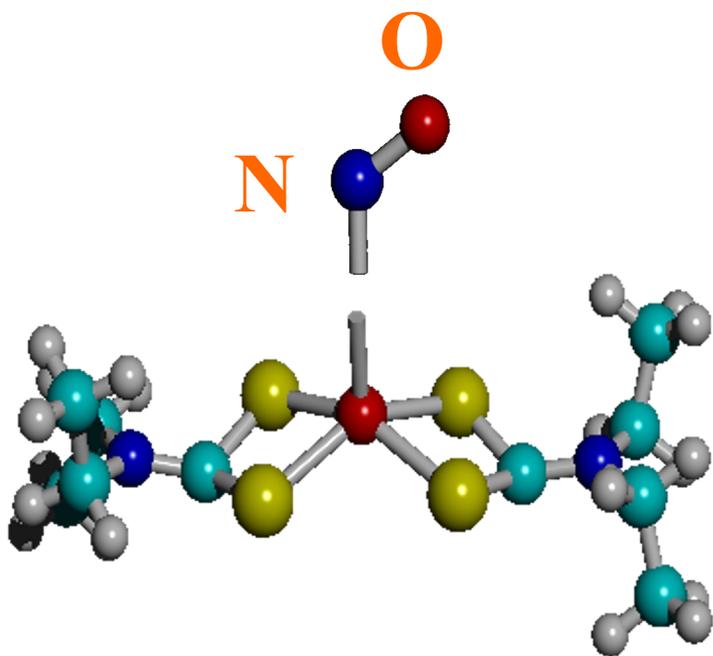
NO molecule. Oxygen and nitrogen has a double covalent bond.

The nitrogen atom lacks of one electron in its sp^2 orbital, which makes NO a high reactive molecule.

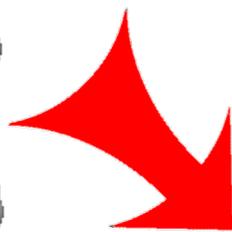
Хотя роль NO-системы в этих условиях систематически изучается фактически во всех странах мира, но в этой проблеме фундаментального и прикладного характера есть много неясностей. Имеющиеся противоречивые сведения позволяют утверждать, что в настоящее время нет единого мнения о роли эндогенного NO в процессах, протекающих при повреждении нервной системы. Одной из причин такой пессимистической ситуации является техническая сложность контроля уровня NO, поскольку NO образуется в процессе быстрых химических реакций с вовлечением широкого спектра молекул и посредников, среди которых металлы, тиолы, свободные радикалы, аминокислоты, кальций, кислород. Встает вопрос об использовании современного метода обнаружения и количественного определения содержания NO в тканях живых организмов в норме и при экспериментальном моделировании патологий.



Одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Это произошло благодаря методике, разработанной Ваниным и др., в которой они использовали метод спинового захвата. Ими был применен комплекс Fe²⁺ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO в тканях животных. Эти комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора $g=2.035 - 2.040$.

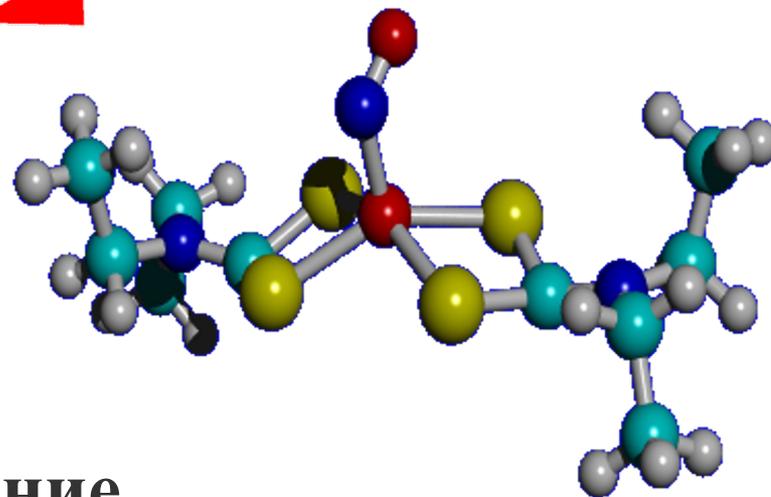


NO-Fe(II)ДЭТК₂

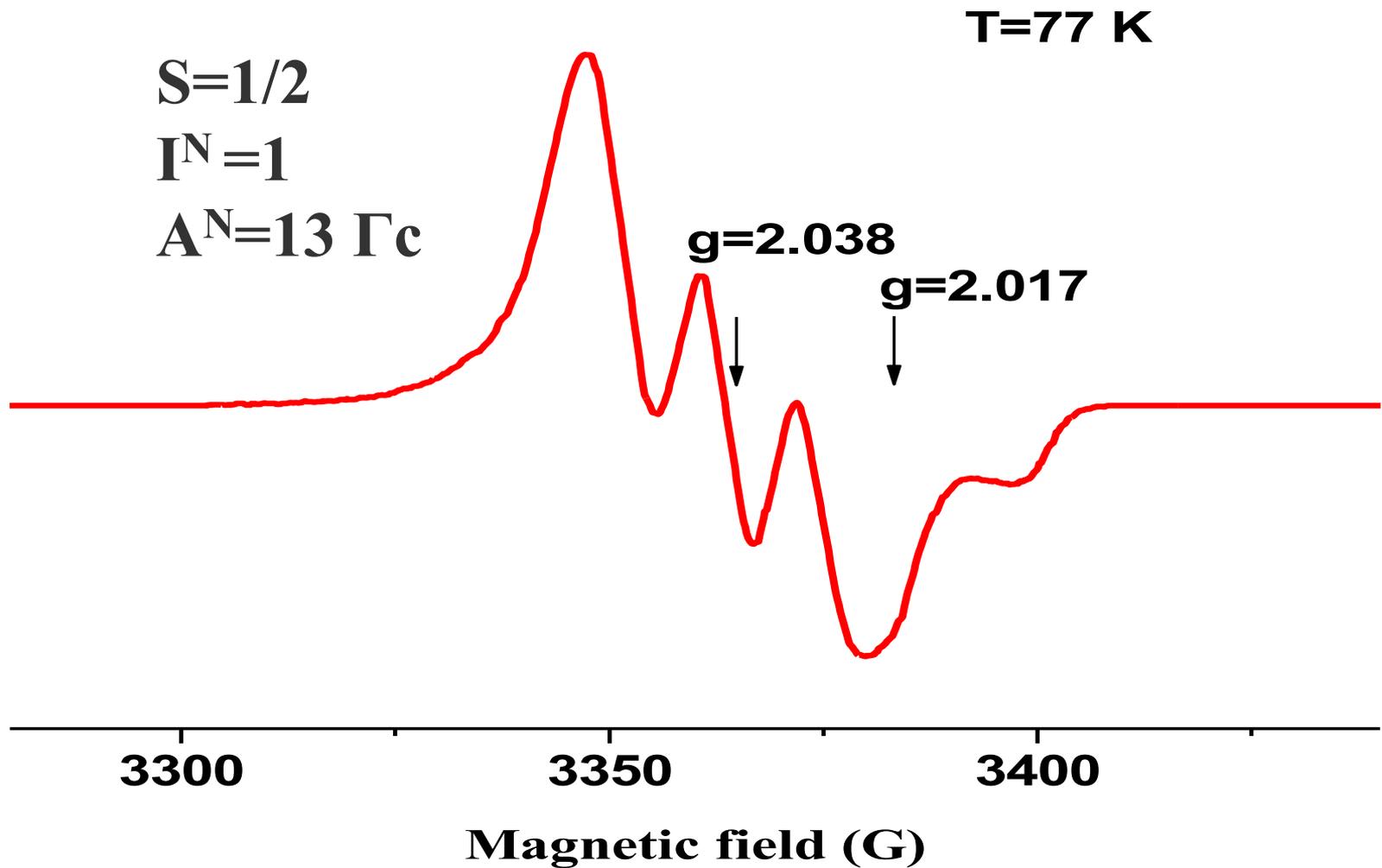


T=37°C

t = 40 мин



**Структура и образование
спиновой ловушки**



EPR spectra from spin trap (DETC)₂-Fe²⁺-NO.

Vanin, A., Poltorakov, A. NO spin trapping in biological systems. *Front. Biosci.* 2009, 14, 4427-4435.

Эксперименты проведены на крысах самцах ($n=20$), массой 200-300 грамм. Моделирование сочетанной травмы головного и спинного мозга проводили в Институте физиологии НАН Беларуси, г. Минск.

Производили локальное разрушение участка мозга стилетом в прецентральной области мозга слева (лобная доля). На следующем этапе продолжали проводить операцию но уже на уровне первого поясничного отдела спинного мозга. До операции, через сутки после операции и через неделю (семь дней) после операции у всех животных определяли болевые пороги (hot plate, tail-flick reflex).

Через неделю (семь дней) после операции извлекали ткани из травмированной и не травмированной (контралатеральной) областей мозга (лобная доля), гиппокампа, обонятельной луковицы и печени.

Также извлекали ткани спинного мозга в участке травмы, выше и ниже.

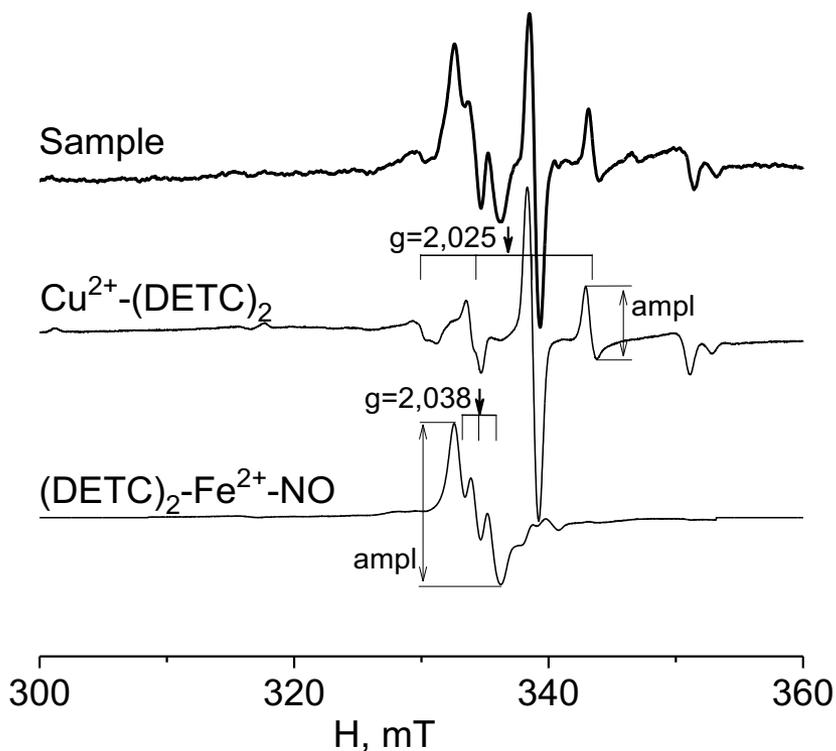
Часть животных после операции ($n=5$) оставляли для оценки эффективности восстановления центрального контроля двигательных функций после операции. Контрольная группа животных не подвергалась хирургическим вмешательствам. У них также брали образцы тканей – контрольная группа и 5 животных оставляли для оценки двигательных функций.

Срок 7 дней были выбраны исходя из предыдущих гистохимических и поведенческих исследований.

Измерения спектров комплекса биологических образцов проводили на спектрометре фирмы Брукер X диапазона (9.5320 GHz) EMX/plus. Образец в пальчиковом Дьюаре фирмы Брукер помещали в 2-cavity of double resonator (model ER 4105DR) при частоте модуляции магнитного поля 100 kHz, амплитуды модуляции 2Гс, мощности СВЧ излучения 2 mW, временной константе 327 ms и температуре 77° К. 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 100-200 мг. Амплитуду спектров ЭПР всегда нормировали на вес образца.

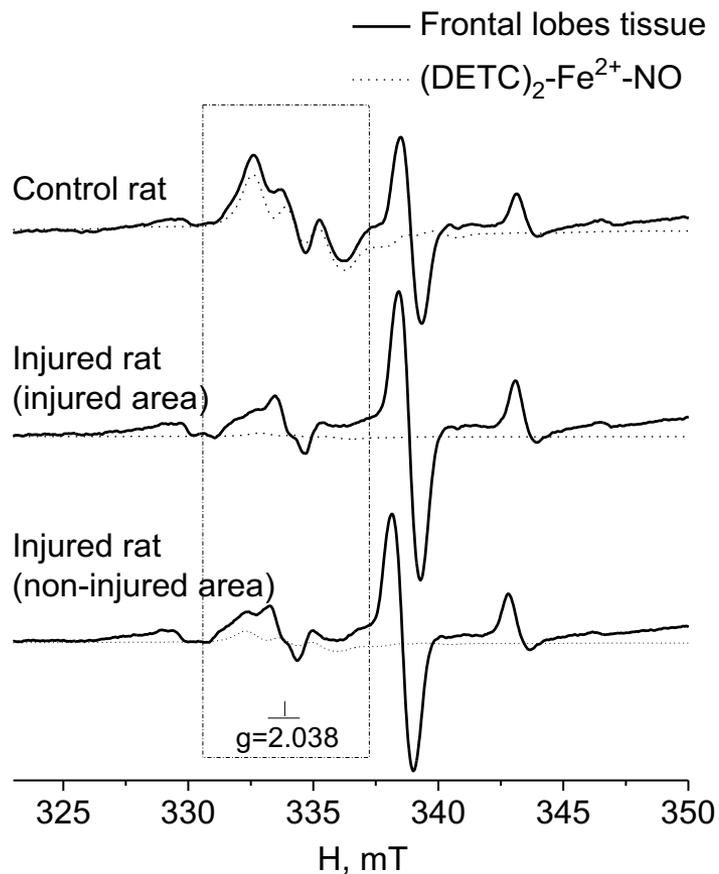
Образец в пальчиковом Дьюаре помещался в 2-cavity of double resonator, а эталонный образец помещался в другую полость того же резонатора. Так как каждый исследуемый образец находился в одинаковых условиях с эталонным образцом, это позволило определять количественно интенсивность исследуемых образцов и сравнивать их по интенсивности друг с другом.

На следующем рисунке показан ЭПР спектр образца, взятого из лобной доли мозга крысы. В этом спектре присутствуют сигналы от разных парамагнитных частиц (комплексов). В области магнитного поля от 330 до 345 mT.



На рисунке выше показан ЭПР спектр образца, взятого из лобной доли мозга крысы. В этом спектре присутствуют сигналы от разных парамагнитных частиц (комплексов). В области магнитного поля от 330 до 337 мТ происходит наложение сигналов от комплекса спиновой ловушки с NO (DETC)₂-Fe²⁺-NO, который характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора g=2.038.

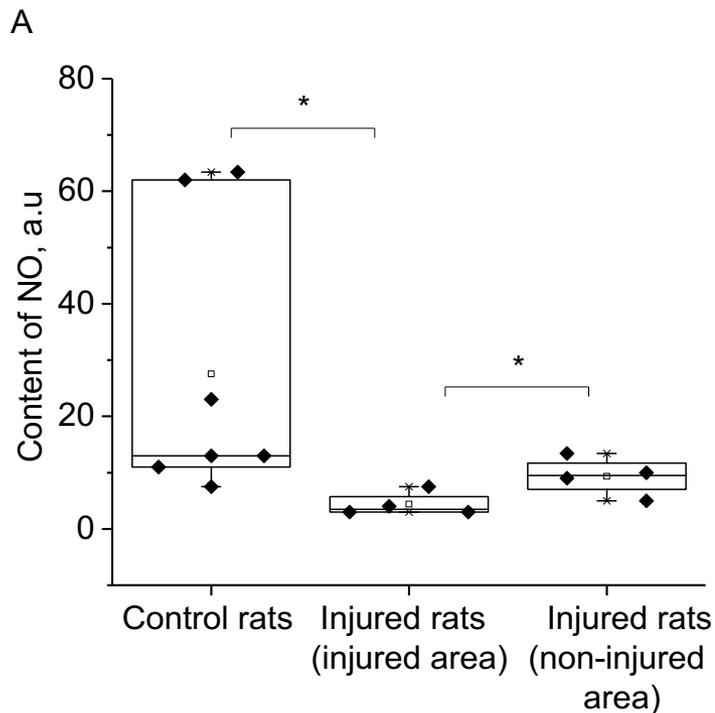
Относительную интенсивность сигналов от комплексов (DETC)₂-Fe²⁺-NO и Cu²⁺-(DETC)₂ в наблюдаемом спектре образца определяли последовательно. Сначала определяли относительную интенсивность спектра ЭПР комплекса Cu²⁺-(DETC)₂ по амплитуде его крайней высокополевой компоненты сверхтонкой структуры (СТС) (по разнице между минимумом и максимумом первой производной линии поглощения). Затем из спектра ЭПР образца вычитали спектр ЭПР комплекса Cu²⁺-(DETC)₂ с определённой ранее амплитудой.



Спектры ЭПР тканей лобных долей контрольной (Control rat) и травмированной крысы (Injured rat): травмированной (injured area) и не травмированной (non-injured area) областей мозга через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга.

На рисунке выше показан ЭПР спектр образца, взятого из лобной доли мозга крысы. В этом спектре присутствуют сигналы от разных парамагнитных частиц (комплексов). В области магнитного поля от 330 до 337 мТ происходит наложение сигналов от комплекса спиновой ловушки с NO (DETC)₂-Fe²⁺-NO, который характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора g=2.038.

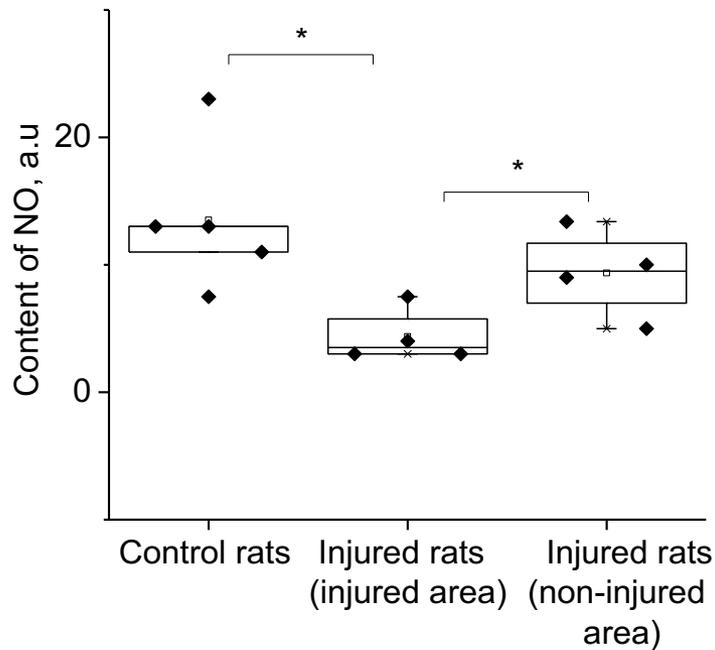
Относительную интенсивность сигналов от комплексов (DETC)₂-Fe²⁺-NO и Cu²⁺-(DETC)₂ в наблюдаемом спектре образца определяли последовательно. Сначала определяли относительную интенсивность спектра ЭПР комплекса Cu²⁺-(DETC)₂ по амплитуде его крайней высокополевой компоненты сверхтонкой структуры (СТС) (по разнице между минимумом и максимумом первой производной линии поглощения). Затем из спектра ЭПР образца вычитали спектр ЭПР комплекса Cu²⁺-(DETC)₂ с определённой ранее амплитудой. Таким способом мы избавились от вклада сигнала от комплекса Cu²⁺-(DETC)₂ в области, где наблюдается сигнал от комплекса (DETC)₂-Fe²⁺-NO. После этого относительную интенсивность спектра ЭПР комплекса (DETC)₂-Fe²⁺-NO определяли по его центральной компоненте СТС (по разности между максимумом и минимумом первой производной линии поглощения).



Содержание NO в тканях лобных долей контрольных (Control rats) и травмированных крыс (Injured rats): травмированной (injured area) и не травмированной (non-injured area) областей мозга через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга. А – при обработке всех данных.

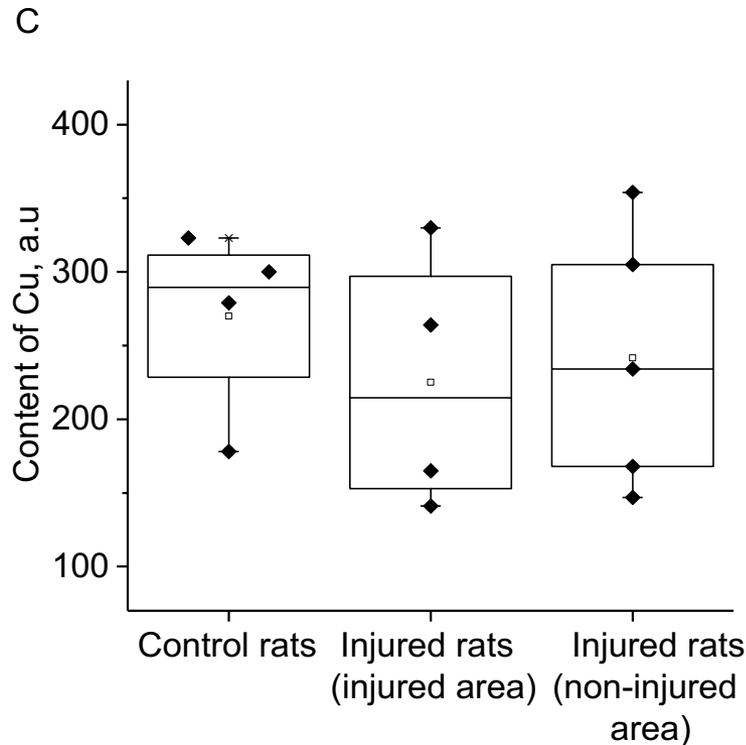
На следующем рисунке приведены статистические данные по изменению интегральной интенсивности сигналов $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в спектрах исследованных образцов биологических тканей. Результаты демонстрируют значительное снижение продукции NO через 7 суток после травмы в травмированной области мозга в среднем на 84% ($P = 0.029$, Mann-Whitney) и также значительное но недостоверное снижение продукции NO в не травмированной (контралатеральной) области мозга в среднем на 66% ($P = 0.38$, Mann-Whitney).

В

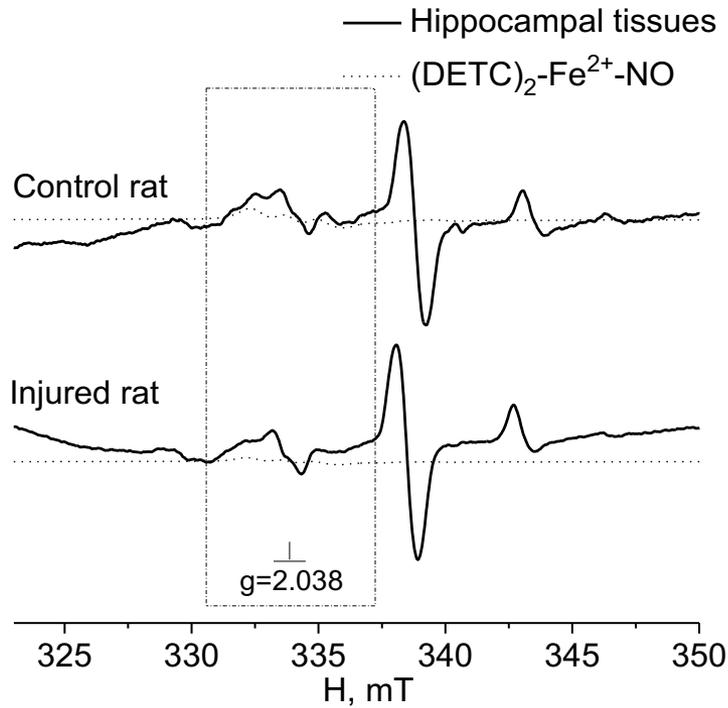


Содержание NO в тканях лобных долей контрольных (Control rats) и травмированных крыс (Injured rats): травмированной (injured area) и не травмированной (non-injured area) областей мозга через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга. В - при исключении из статистического анализа двух выпадающих точек.

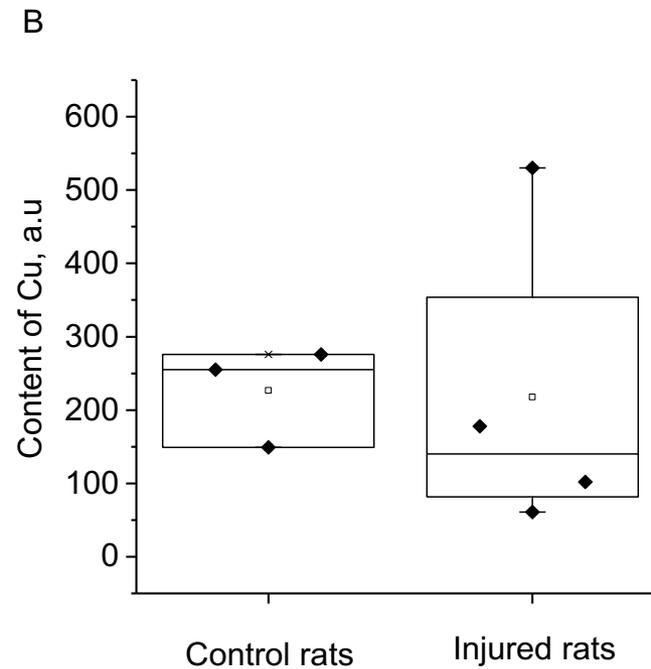
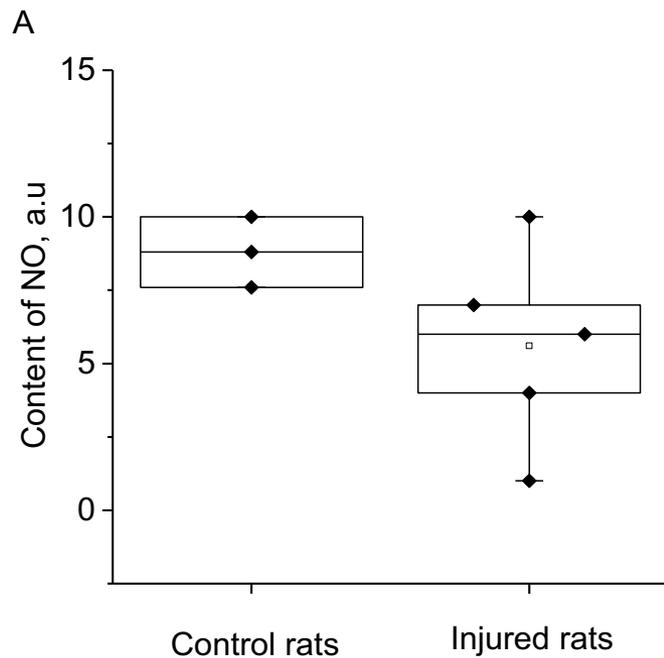
В этих результатах видна отчетливая разница в продукции NO между поврежденной и контралатеральной областями мозга ($P = 0,05$, Манн-Уитни). В экспериментальных данных по контрольным образцам присутствуют две точки данных, близких к 60; они сильно отличаются от других. Мы провели вариант обработки при исключении из статистического анализа этих двух точек. Тогда достоверное отличие получается, как при отдельном сравнении двух групп («Control rats», «Injured rats-injured area») t-test'ом ($P = 0,021$), так и при сравнении всех трех групп тестом ANOVA.



Содержание меди (С) в тканях лобных долей контрольных (Control rats) и травмированных крыс (Injured rats): травмированной (injured area) и не травмированной (non-injured area) областей мозга через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга.



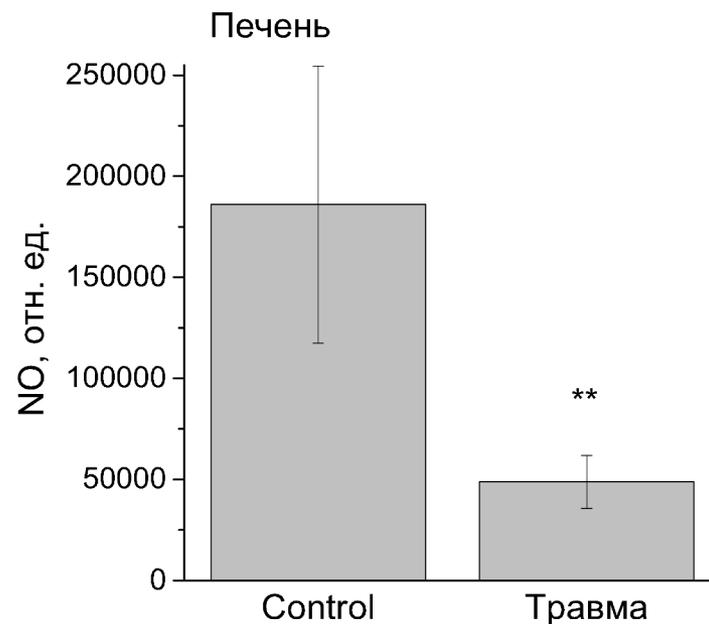
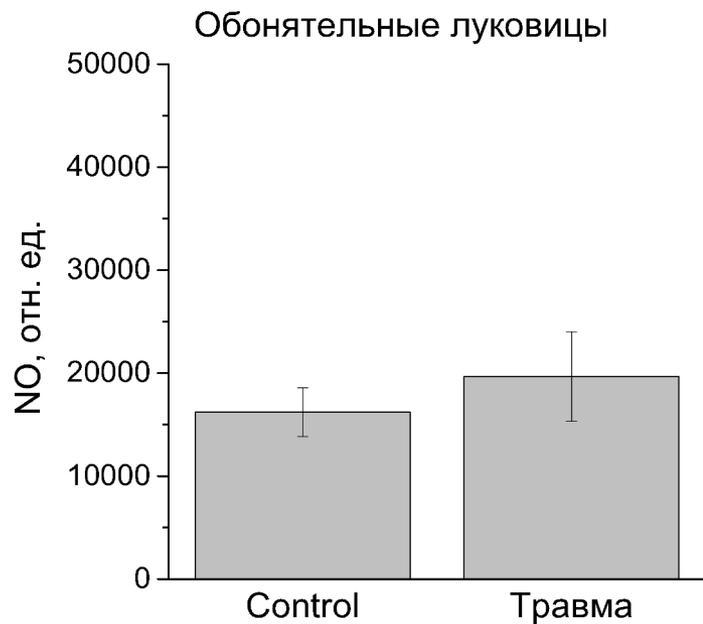
Спектры ЭПР гиппокампа контрольной (Control rat) и травмированной (Injured rat) крысы через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга.



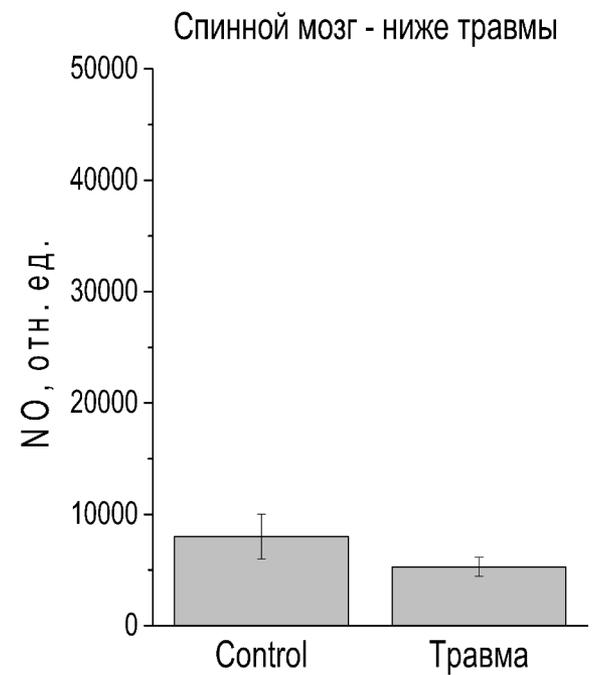
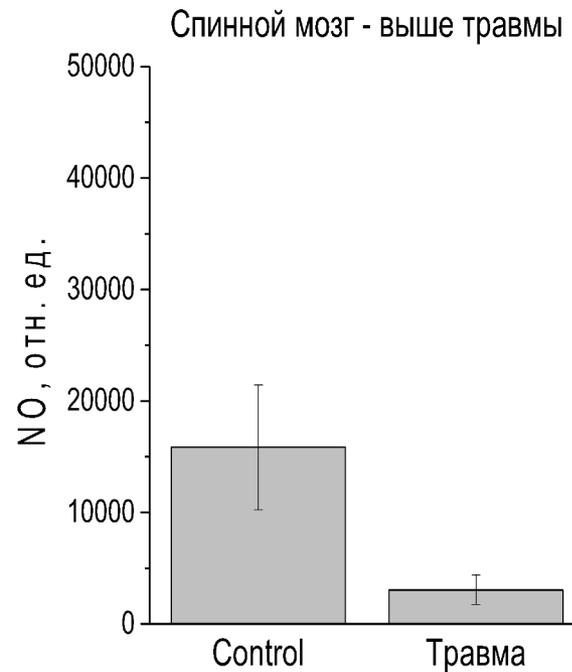
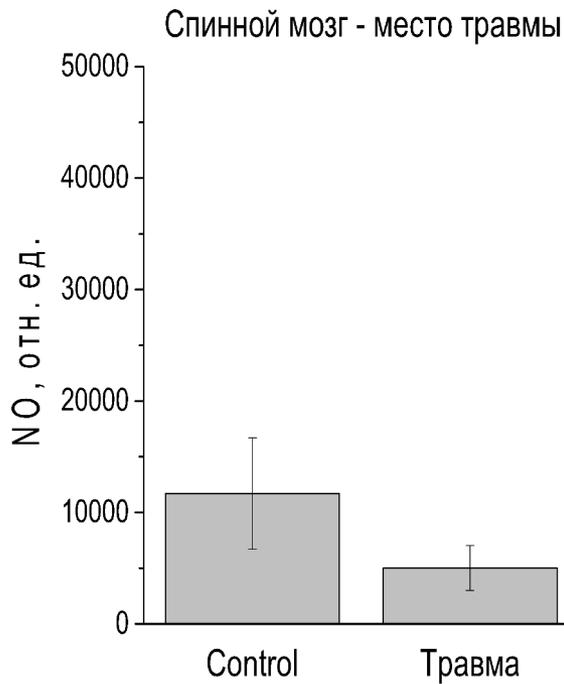
Содержание NO (A) и меди (B) в гиппокампе контрольных (Control rats) и травмированных крыс (Injured rats) через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга.

На рисунке выше показаны спектры ЭПР гиппокампа интактной-контрольной (control) и травмированной (injured) крыс через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга. Спектроскопические характеристики комплексов в проведенных экспериментах близки к тем, которые получены ранее в наших работах и в литературе. Форма ЭПР сигнала для этого комплекса представляет собой три линии благодаря триплетной сверхтонкой структуре. Результаты анализа спектров, приведенные на рисунке 5, демонстрируют отсутствие изменений продукции NO в гиппокампе после моделирования сочетанной травмы головного и спинного мозга. Также нет изменений содержания меди, что показывает отсутствие изменения активности антиоксидантной системы. Далее было показано отсутствие изменений содержания NO в обонятельных луковицах. В печени же наблюдается значительное снижение содержания NO.

В спинном мозге после сочетанной травмы головного и спинного мозга в зоне травмы и участке ниже нет изменений содержания NO. В то же время в участке выше травмы регистрируется достоверное снижение содержания NO.



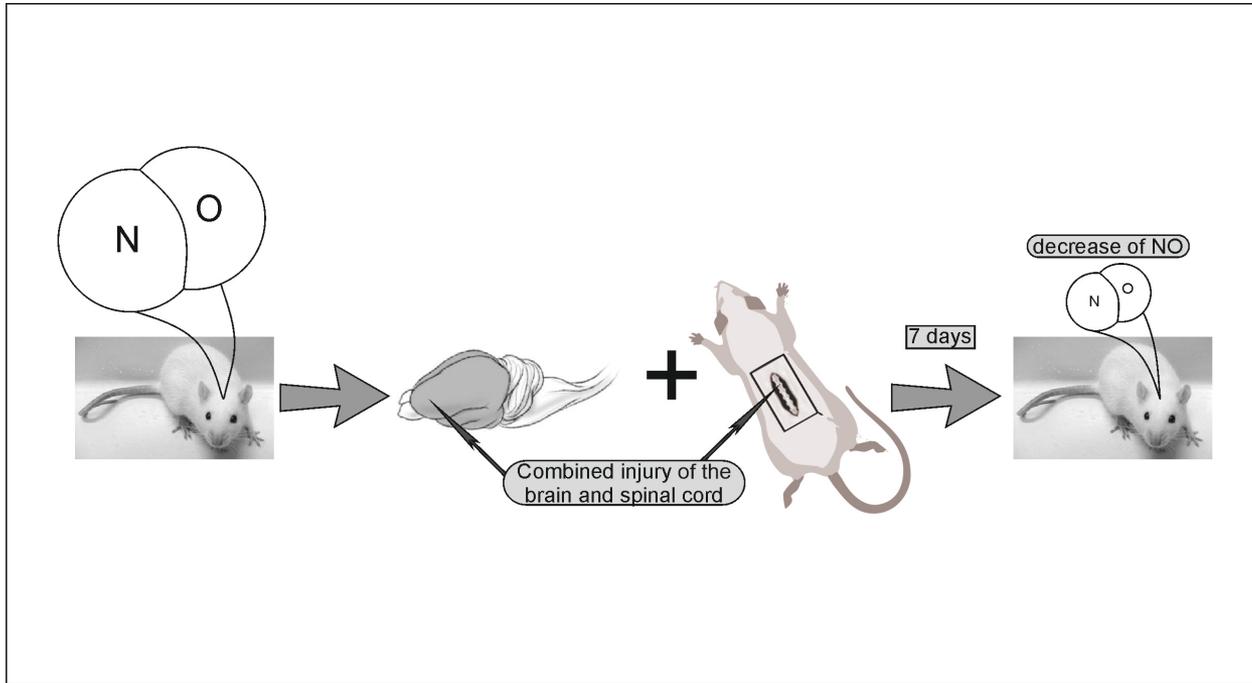
Содержание NO в обонятельных луковицах и печени контрольных (Control) и травмированных крыс (травма) через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга.



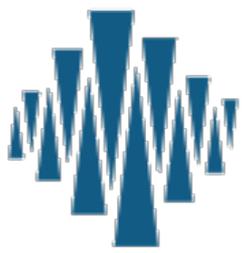
Содержание NO в спинном мозге в месте травмы, участках выше травмы и ниже травмы контрольных (Control) и травмированных крыс (травма) через 7 суток после сочетанной травмы головного и спинного мозга.

Результаты анализа демонстрируют значительное снижение продукции NO через 7 суток после моделирования травмы в травмированной области мозга в среднем на 84% ($P = 0.029$, Mann-Whitney) и также значительное, но недостоверное снижение продукции NO в не травмированной (контралатеральной) области мозга в среднем на 66% ($P = 0.38$, Mann-Whitney). Также хотелось бы подчеркнуть отличие в интенсивности продукции оксида азота в спинном мозге в участках выше и ниже места травмы.

Учитывая низкую эффективность существующих тактик терапии при травмах мозга и инсультах, несмотря на многочисленные дебаты о реперфузионном периоде, целесообразно более углубленно изучать механизмы и терапевтические возможности существующих методов терапии, а также учитывать данные проведенных авторами статьи экспериментов. Эти данные свидетельствуют о существенных различиях в динамике нитрозильного стресса и состояния антиоксидантной защиты при травме и геморрагическом инсульте головного мозга, что является экспериментальной основой для разработки новых тактических приемов комплексной терапии в этой области медицины.



An experimental scheme demonstrating the NO content in the injured and non-injured areas of the rat brain 7 days after a combined brain and spinal cord injury.



Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}, Кульчицкий В.А.⁴, Андрианов В.В.^{1,2}
и др.

Базан Л.В.¹, Яфарова Г.Г.², Андрианов В.В.^{1,2} и др.

Богодвид Т.Х.^{2,3}, Дерябина И.Б.², Муранова Л.Н.²,
Силантьева Д.И.², Иванова Е.С.³, Тарасова Е.В.³,
Арсланов А.И.^{1,2}, Бикчентаева Л.М.², Егорова В.К.²,
Филипович Т.А.⁴, Федорова Е.В.⁴, Нагибов А.В.⁴



¹КФТИ им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН;

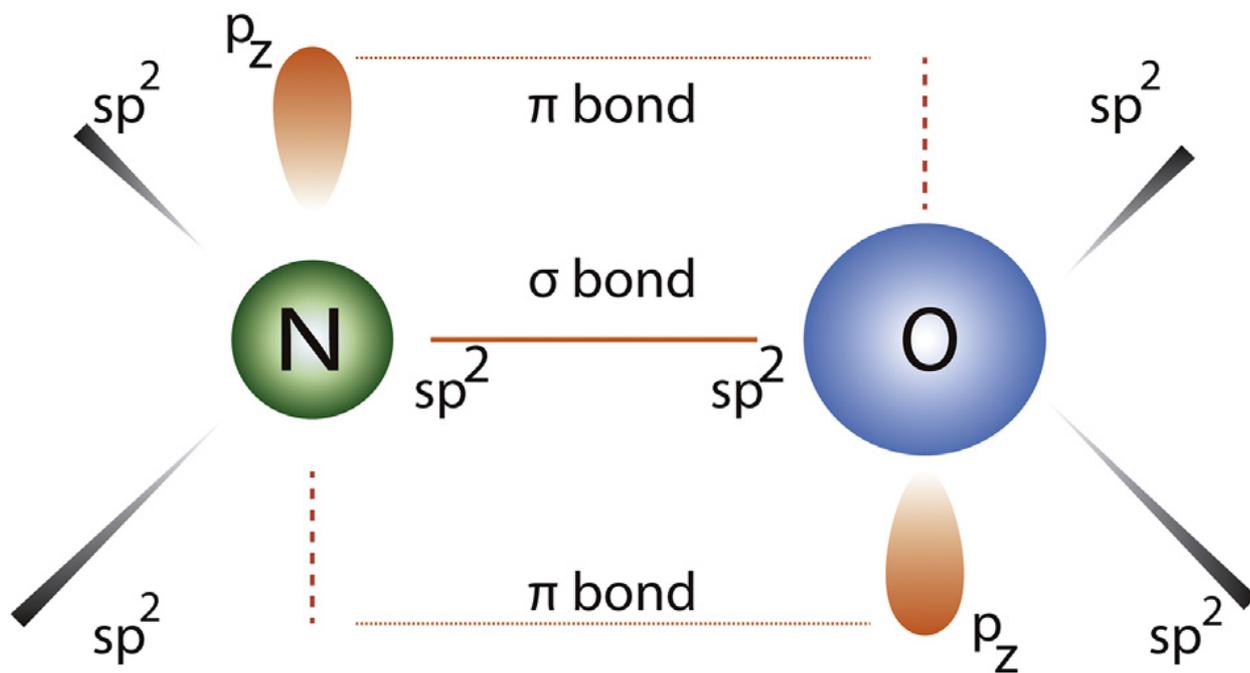
²Казанский (Приволжский) федеральный университет;

³Поволжский университет физической культуры, спорта
и туризма, Казань, Россия;

⁴Центр мозга, Институт физиологии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь.

Спасибо за внимание





NO molecule. Oxygen and nitrogen has a double covalent bond. The nitrogen atom lacks of one electron in its sp^2 orbital, which makes NO a high reactive molecule.