

ИЗОТОПНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ ДЕЙТЕРИЯ НА ПРОТИЙ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ИЗМЕНЯЕТ ЕГО РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ГИПОКСИИ

© 2019 г. С.В. Козин* **, А.А. Кравцов* **, А.А. Елкина* **, Э.И. Злищева*,
Е.В. Барышева***, Л.В. Шурьгина*, А.В. Моисеев****, М.Г. Барышев* **

*Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

**Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, просп. Чехова, 41

***Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4

****Кубанский государственный аграрный университет, 350004, Краснодар, ул. Калинина, 13

E-mail: kozinsv85@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.18 г.

После доработки 12.12.18 г.

Принята к публикации 20.12.18 г.

Представлены результаты изучения влияния обедненной дейтерием воды на окислительные процессы в головном мозге крыс в физиологических условиях и при гипоксии, а также данные, полученные методом культуры тканей, характеризующие функциональные показатели нейронов в условиях стрессового воздействия. Изучение свободнорадикальных процессов в тканях головного мозга крыс продемонстрировало, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия в течение двух недель оказывает стрессирующий эффект. При более длительном потреблении обедненной дейтерием воды происходит активация неспецифических защитных систем организма. Исследовано влияние на культуру тканей мозжечка инкубационного солевого раствора, приготовленного на воде с пониженным содержанием дейтерия. Установлено, что глюкозная депривация и температурный стресс (39°C) приводят к повышенной гибели культуры нейронов при инкубации в инкубационном солевом растворе, приготовленном на обедненной дейтерием воде. Уровень гибели нейронов в инкубационном солевом растворе как при 150 ppm, так и при 50 ppm по дейтерию в физиологических условиях существенно не отличается. При этом в обедненной дейтерием среде происходит уменьшение мембранного потенциала митохондрий нейронов мозжечка. Таким образом, установлено, что двухчасовая инкубация нейронов мозжечка в инкубационном солевом растворе с пониженным содержанием дейтерия не оказывала цитопротективного эффекта.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопный обмен, гипоксия, головной мозг, культура тканей мозжечка, митохондриальный потенциал, глюкозная депривация, температурный стресс.

DOI: 10.1134/S0006302919020169

К настоящему времени установлено, что относительно небольшие колебания в содержании дейтерия в организме вызывают изменения физико-химических свойств интрацеллюлярной воды [1], а также оказывают выраженное влияние на динамику биохимических, клеточных, тканевых и системных регуляторных процессов [2–6]. Показаны антиоксидантное [7] и антиоксическое действие обедненной дейтерием воды [8], а также положительные эффекты данного

алиментарного фактора на состояние различных защитных систем организма [9–11]. Таким образом, благодаря разработке эффективных методов производства обедненной дейтерием воды (ректификация воды в колоннах [12,13], метод электролитического разделения воды [14], диффузия водорода через металлические мембраны [15,16]), эти исследования получили широкое распространение.

В то же время исследований воздействия колебаний изотопного D/H-состава внутренних жидкостей организма на центральную нервную систему недостаточно для понимания механизмов, ответственных за реализацию наблюдаемых эффектов [17]. Так, данные последних ис-

Сокращения: ОДВ – обедненная дейтерием вода, ИСР – инкубационный солевой раствор, АФК – активные формы кислорода, МПМ – мембранный потенциал митохондрий, ГД – глюкозная депривация, ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

следований указывают на способность обедненной дейтерием воды изменять изотопный D/H-состав крови и тканей и повышать, таким образом, потенциал защитных систем организма [18]. Вода с пониженным содержанием дейтерия обладает иммуномодулирующими свойствами [19,20], что может быть весьма полезно в коррекции гипоксических состояний. Изменение баланса между дейтерием и протием во внутренней среде может иметь важные последствия для механизмов, опосредующих долговременную память. Было изучено влияние обедненной дейтерием воды на сохранение навыков обучения в Y-образном и радиальном восьмилучевом лабиринте [21]. В этой же работе показано, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия незначительно снижало количество ошибок рабочей памяти в обоих лабиринтах и достоверно уменьшало количество ошибок референтной памяти в радиальном лабиринте. В другой работе авторами было показано, что потребление обедненной дейтерием воды (ОДВ), так же как и использование антидепрессанта циталопрама, уменьшало ангедонию у мышей, вызванную в течение десяти суток периодически меняющимися стресс-факторами [22]. Кроме того, в этой работе было установлено, что в группе стрессированных животных в рационе которых была ОДВ, наблюдали большее количество brdu-положительных клеток, что свидетельствовало о более интенсивном процессе пролиферации в гиппокампе, в отличие от стрессированных мышей, которые пили обычную воду. В работе [23] было показано положительное влияние длительного приема ОДВ на уровень тревожности и стрессоустойчивости лабораторных животных. Проведенные в последнее время исследования показали, что предварительное употребление обедненной дейтерием воды способно активировать адаптационные системы организма с проявлением протекторного эффекта к стрессовым воздействиям [18]. В перечисленных работах не рассматривается влияние ОДВ на функциональные показатели отдельных нейронов или их популяций, такие как митохондриальный потенциал, уровень активных форм кислорода в митохондриях, уровень кальция или электрофизиологические параметры. При этом повышение устойчивости организма к острой гипоксии является актуальной проблемой и требует разработки новых подходов к ее решению [24–28].

Все вышеперечисленное обусловило дизайн эксперимента и цель работы – изучение влияния обедненной дейтерием воды на окислительные процессы головного мозга крыс в норме и при гипоксии, а также исследование функциональ-

ных показателей нейронов в норме и в условиях стресса методом культуры тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ОДВ получали на установке, созданной в Кубанском государственном университете [29, 30]. Минерализацию воды с концентрацией дейтерия 50 ppm осуществляли путем добавления в нее минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (в мг/л: минерализация – 314–382, гидрокарбонаты – 144–180, сульфаты < 1, хлориды – 60–76, кальций – 6, магний – 3, натрий – 50–58, калий – 50–58), такого же, как для воды с содержанием дейтерия 150 ppm. В качестве исходной для получения питьевой воды с природной концентрацией дейтерия (150 ppm) использовали дистиллированную воду, полученную на бидистилляторе УПВА5 («ООО ПФ Ливам», Россия). Суточное потребление воды животными всех групп в течение эксперимента составляло в среднем 18–27 мл на 1 крысу и не зависело от физиологического состояния животных.

Исследование процессов свободнорадикального окисления было выполнено на 56 крысах линии Wistar в возрасте 2,5 месяца (массой от 253 до 286 г), полученных из филиала «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА РФ (пос. Андреевка Солнечногорского района Московской области) и прошедших карантин на протяжении десяти суток.

Животных произвольно разделяли на восемь групп по семь особей в каждой группе:

группа 1А – интактные крысы, которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение двух недель, при этом гипоксия у них не моделировалась;

группа 1В – интактные крысы, которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение шести недель, при этом гипоксия у них не моделировалась;

группа 2 – крысы, которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение двух недель;

группа 3 – крысы, которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение двух недель, при этом на 15-е сутки эксперимента им моделировали острую гипоксию;

группа 4 – крысы, которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение двух недель, при этом на 15-е сутки эксперимента им моделировали острую гипоксию;

группа 5 – крысы, которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель;

группа 6 – крысы, которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение шести недель, при этом на 43-и сутки эксперимента им моделировали острую гипоксию;

группа 7 – крысы, которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, при этом на 43-и сутки эксперимента им моделировали острую гипоксию.

В период проведения эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в пластмассовых клетках TECNIPLAST тип IV S, в которые помещали по три-четыре крысы (в соответствии с нормами размещения животных) [28]. Условия содержания животных были стандартизированы: температура $20 \pm 3^\circ\text{C}$, влажность $48 \pm 2\%$, освещение – режим день/ночь (с 6.00 до 18.00 и с 18.00 до 6.00). В качестве подстилки использовали березовую стружку. На протяжении всего эксперимента животные потребляли стандартный концентрированный комбикорм по ГОСТ Р 50258. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ № 267 от 19 июня 2003 года «Об утверждении правил лабораторной практики», Правил лабораторной практики (GLP), Хельсинской декларации (2000) и Директив Европейского сообщества 86/609ЕЕС [31].

Острую гипоксию с гиперкапнией моделировали, помещая крыс в герметично закрытый сосуд объемом 1 л, в котором крысы находились под непрерывным мониторингом до появления первого агонального вдоха, после чего крыс извлекали и помещали обратно в клетку [32]. Через сутки после моделирования гипоксии под общей анестезией, выполняемой препаратом Золетил 100 (Virbac, Франция) в дозировке 15 мг на 1 кг массы тела крысы внутримышечно, у крыс проводили декапитацию (группы 1А, 2, 3 и 4 – на 15-е сутки; группы 1В, 5, 6 и 7 – на 43-и сутки эксперимента), после чего головной мозг животных извлекали и помещали в жидкий азот.

Методика исследования свободнорадикальных процессов в мозге в условиях нормы и при гипоксии. Супернатант получали из навески ткани головного мозга, растертой в ступке, охлажденной жидким азотом и помещенной в холодный фосфатный буфер с рН 7,4 в расчете 100 мг ткани на 1 мл. Гомогенизировали встряхиванием в течение 15 мин, затем центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин.

Изучение свободнорадикального окисления в тканях головного мозга проводили методом хемилюминесцентного анализа с помощью аппаратно-программного комплекса «Хемилюминетр Lum-5773» (ООО «ДИСофт», Россия) и специализированного программного обеспечения PowerGraph 3.x Professional (ООО «ДИСофт», Россия) с определением интегрального показателя – светосуммы [33].

Определение уровня перекисного окисления биомолекул проводили путем оценки содержания малонового диальдегида в тканях головного мозга по методу Гаврилова [34].

Культуральные исследования нейронов мозжечка. Для исследования культуры ткани использовали семи-девятидневные нейроны мозжечка восьмидневных крысят линии Wistar методом ферментно-механической диссоциации [35]. Культуры выращивали в 96-луночных планшетах, покрытых поли-L-лизинем, в культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 10 мМ буфера HEPES, 25 мМ KCl. В культуры, использованные для определения уровня радикалов, митохондриального мембранного потенциала через 24 ч от начала культивирования был добавлен арабинозидмоноцитозид для предотвращения пролиферации не нейрональных клеток. Полученные культуры отмывали и инкубировали в течение двух часов при температуре 36°C в инкубационном солевом растворе (ИСР), содержавшем (в мМ): NaCl – 154, KCl – 25, CaCl_2 – 2,3, MgCl_2 – 1, NaHCO_3 – 3,6, Na_2HPO_4 – 0,35, HEPES – 10, глюкоза – 5,6. Измерение мембранного потенциала митохондрий, уровня свободных радикалов и выживаемость нейронов мозжечка производили на многофункциональном ридере для микропланшетов Filter Max F5 (Molecular Devices, США).

Внутриклеточное определение уровня активных форм кислорода и измерение мембранного потенциала митохондрий. Для определения уровня активных форм кислорода (АФК) и мембранного потенциала митохондрий (МПМ) культуры были разделены на группы по содержанию дейтерия в инкубационном солевом растворе (150 и 50 ppm) и по содержанию сукцината, добавленного в раствор для активации дыхательной цепи митохондрий (0, 25 и 100 мкМ). Для обнаружения АФК в культуры добавляли дегидрорадамин 123 (длина волны возбуждения 485 нм, эмиссии – 535 нм) на 30 мин при 36°C с сохранением концентраций сукцината в группах, с последующей трехкратной промывкой [36]. Результаты измерения представляли в процентах, за 100% принимали интенсивность

Показатели окислительного стресса в тканях головного мозга крыс

Группа животных	Интегральный показатель свободнорадикального окисления под кривой графика хемилюминесценции, усл. ед.	Концентрация малонового диальдегида, нмоль/мг
Группа 1А (интактная)	54,8 ± 2,0	2,1 ± 0,1
Группа 1В (интактная)	55,6 ± 2,3	1,9 ± 0,1
Группа 2	81,0 ± 2,6	2,8 ± 0,2
Группа 3	75,4 ± 3,0	2,9 ± 0,1
Группа 4	92,9 ± 2,1	3,1 ± 0,3
Группа 5	48,3 ± 2,9	1,9 ± 0,2
Группа 6	72,2 ± 4,0	2,7 ± 0,3
Группа 7	61,4 ± 2,8	1,8 ± 0,1

Примечание. Данные представлены как $M \pm m$.

флуоресценции контрольных культур – при 150 ppm дейтерия, без сукцината.

Для измерения МПМ был добавлен тетраметилпродамин на 30 мин при 36°C (длина волны возбуждения 535 нм, эмиссии – 595 нм) с сохранением концентраций сукцината в группах [37]. Далее культуры трижды отмывали от красителя соевым раствором.

Результаты измерения представляли в процентах, за 100% принимали интенсивность флуоресценции контрольных культур – при 150 ppm дейтерия, без сукцината.

Оценка выживаемости нейронов мозжечка при глюкозной депривации (ГД). Культуры были разделены на группы: 150 и 50 ppm дейтерия без депривации, 150 и 50 ppm дейтерия + ГД. Депривацию глюкозы проводили в течение 1 ч в инкубационной среде того же состава, но без глюкозы. Затем культуры возвращали в исходный солевой раствор с глюкозой и помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч в культуры добавляли йодид пропидия в концентрации 5 мкг/мл на 15 мин (длина волны возбуждения 535 нм, эмиссии – 625 нм) [38]. Результаты измерения представляли в процентах, за 100% принимали интенсивность флуоресценции контрольных культур при 150 ppm дейтерия.

Оценка выживаемости нейронов мозжечка при температурном стрессе. Культуры были разделены на группы по содержанию дейтерия в инкубационном солевом растворе (150 и 50 ppm) и по содержанию сукцината, добавленного в раствор для активации дыхательной цепи митохондрий (0, 25 и 100 мкМ). Температурный стресс моделировали, помещая культуры в термостат на 24 ч при различных температурах (22, 26, 36 и 39°C). Выживаемость оценивали

по той же методике, что и при глюкозной депривации, – с добавлением йодида пропидия.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики на лицензионной программе MS Excel 2010 с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из результатов исследований видно (см. таблицу), что у гипоксированных животных в группах 6 и 7 на 43-и сутки и в группах 3 и 4 на 15-е сутки развивался интенсивный окислительный процесс в тканях головного мозга крыс. Это выразилось повышением концентрации малонового диальдегида и увеличением интегрального показателя хемилюминесценции по сравнению с интактными группами (1А и 1В). Данный результат хорошо согласуется с литературными данными о том, что при гипоксии происходит гиперпродукция АФК и истощение низкомолекулярной и ферментативной антиоксидантной систем организма, ведущее к необратимым патологическим повреждениям нейронов головного мозга [39–43].

Крысы, которые получали ОДВ в течение двух недель, имели самые высокие показатели уровня свободнорадикального окисления и малонового диальдегида. Так, в группе 4 интенсивность свечения и уровень малонового диальдегида были достоверно ($p < 0,05$) выше на 23 и 6% соответственно по сравнению с группой 3. В этой же группе светосумма хемилюминесценции и концентрация малонового диальдегида была больше на 29 и 15% по сравнению с группой 6 и на 51 и 72% в сравнении с группой 7. Животные группы 2 не подвергались гипоксическому воздействию, тем не менее,

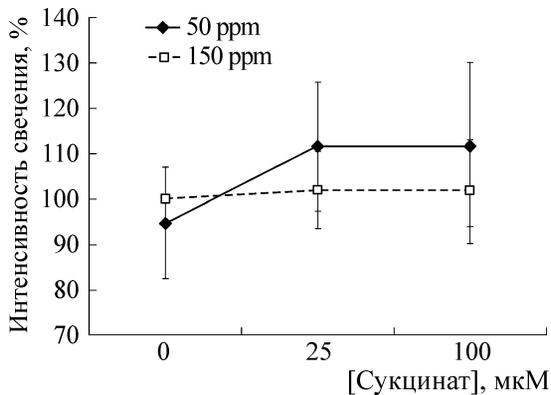


Рис. 1. Влияние среды с различным содержанием дейтерия на уровень генерации радикалов в культурируемых нейронах мозжечка крыс. Данные представлены в виде $M \pm m$ в % от значения при 150 ppm дейтерия при концентрации сукцината 0 мкМ.

их показатели уровня свободнорадикального окисления и малонового диальдегида были относительно высокими. Между группами 3 и 6 не было достоверного отличия. Отсюда можно сделать вывод о том, что ОДВ на начальном этапе поения вызывает стрессовую реакцию, приводящую к подавлению стресс-лимитирующих функций организма. Таким образом, животные группы 4 подверглись не только гипоксическому воздействию, но еще и дополнительному стрессу за счет изотопного D/H-обмена (как между потребляемой водой и плазмой, так и между плазмой крови и тканями органов), что и привело к повышенному образованию свободных радикалов.

Напротив, у животных, в шестинедельном рационе которых была ОДВ (группа 7), уровень свободнорадикального окисления был достоверно ($p < 0,05$) на 15% меньше, а уровень малонового диальдегида — так же достоверно ($p < 0,05$) на 33% меньше по сравнению с группой 6. При этом необходимо отметить, что, согласно проведенным нами ранее исследованиям, при длительном потреблении животными ОДВ наблюдается заметное снижение содержания дейтерия в плазме крови (примерно на 42 ppm) и в лиофилизированной ткани головного мозга (примерно на 33 ppm) [17]. Это указывает на антиоксидантные свойства ОДВ при более продолжительных сроках поения, на что указывалось авторами работы [7]. Так же нет достоверных отличий между группой 5 и интактной группой 1В. Это свидетельствует о том, что вода с пониженным содержанием дейтерия при длительном употреблении перестает действовать как стресс-фактор. В результате в организме завершается период адаптации с ак-

тивацией защитных систем. Возможно, увеличение резистентности головного мозга крыс к гипоксическому воздействию на фоне продолжительного изотопного замещения дейтерия на протий является следствием включения организмом комплекса адапционных реакций [44]. Похожая картина наблюдается при ишемическом прекодиционировании [45]. В результате такого адаптивного эффекта происходят мобилизация энергетических и структурных ресурсов, активация факторов транскрипции и, как следствие, увеличение синтеза ряда защитных белков и ферментов, изменение активности рецепторов и ионных каналов, увеличение синтеза вторичных мессенджеров [46–48]. Таким образом, дострессовое продолжительное применение воды с пониженным содержанием дейтерия проявляет протекторные свойства в условиях гипоксии, и полученные данные дают основание для дальнейших исследований ее нейропротекторных свойств.

Для изучения механизмов влияния ОДВ на нейроны головного мозга были проведены эксперименты на культуре тканей мозжечка.

Анализ полученных результатов показал, что интенсивность образования свободных радикалов при помещении культуры нейронов в ИСР с пониженным содержанием дейтерия существенных изменений не претерпела (рис. 1). Во всех исследованных точках достоверные отличия не выявлены, хотя и имелись некоторые отличия в интенсивности флуоресценции как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

Иную картину наблюдали при исследовании влияния среды с пониженным содержанием дейтерия на МПМ. Так, в культурах, выращенных на средах с концентрацией дейтерия 150 ppm, интенсивность флуоресценции составила 114 и 98% соответственно для точек «25 мкМ» и «100 мкМ сукцината» (точка «0 мкМ сукцината» принята за 100%). В культурах, помещенных в среду с концентрацией дейтерия 50 ppm, интенсивность флуоресценции составила 80, 84 и 83% соответственно для точек «0 мкМ», «25 мкМ» и «100 мкМ сукцината» (рис. 2). Таким образом, среда с пониженным содержанием дейтерия вызвала снижение МПМ нейронов.

Основными факторами, влияющими на МПМ, являются проницаемость внутренней митохондриальной мембраны и активность дыхательной цепи. На основании этого можно предположить, что изотопный обмен дейтерия на протий может влиять на проводимость внутренней мембраны митохондрий, а также на работу комплексов электрон-транспортной це-

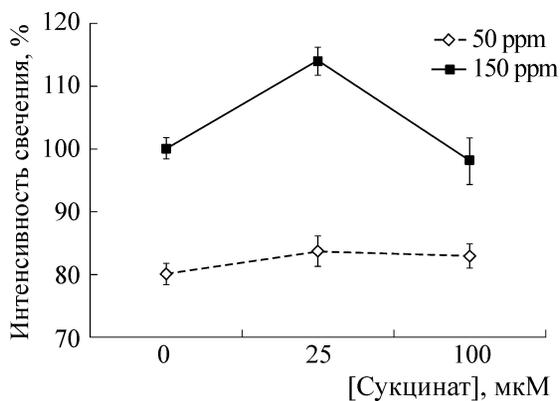


Рис. 2. Влияние среды с различным содержанием дейтерия на мембранный потенциал митохондрий культивируемых нейронов мозжечка крыс. Данные представлены в виде $M \pm m$ в % от значения при 150 ppm дейтерия при концентрации сукцината 0 мкМ; * – $p < 0,05$ к группе 150 ppm.

пи (ЭТЦ). Так, деполяризация МПМ, которая наблюдается при двухчасовой инкубации нейронов в ИСР, приготовленном на ОДВ, может происходить из-за повышения проводимости протонных каналов митохондриальной мембраны. Например, фермент комплекса IV ЭТЦ цитохромоксидаза имеет в своем строении протонные каналы, состоящие из кластеров воды и протонируемых кислотных остатков [49,50]. Эти каналы осуществляют перенос протона по водородным связям по механизму Гротгуса. Наличие дейтрона в протонном канале может привести к упрочнению водородных связей и уменьшению скорости переноса протона. Замена такого дейтрона на протий, наоборот, может вызывать уменьшение энергии водородных связей и снижение скорости передачи протона в канале.

Уменьшение концентрации дейтерия в водной среде приводит к избирательной D/H-замене в атомных группировках со свободной неподеленной парой электронов, способных создавать водородные связи. Такими атомными группировками в биологических системах являются гидроксильные, сульфгидрильные и аминокислотные группы макромолекул в белках и нуклеиновых кислотах, а также в низкомолекулярных биологически активных соединениях. Замещение дейтерия на протий может происходить в гидратной оболочке белковых молекул – ферментов, транспортеров, белков, участвующих в образовании пор и каналов и т.д. Все это может приводить к изменению термодинамических и кинетических параметров макромолекул.

Предположительно, что изотопный D/H-обмен может затрагивать некоторые участки ЭТЦ митохондрий, приводя их к конформационным

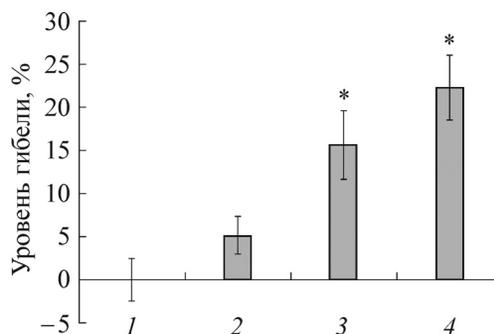


Рис. 3. Влияние среды с различным содержанием дейтерия на уровень гибели культивируемых нейронов мозжечка крыс при глюкозной депривации: 1 – ИСР (150 ppm дейтерия); 2 – ИСР (50 ppm дейтерия); 3 – ИСР (150 ppm дейтерия) + ГД; 4 – ИСР (50 ppm дейтерия) + ГД. Данные представлены в виде $M \pm m$ в % от значения при 150 ppm дейтерия; * – $p < 0,05$ к среде, содержащей 150 ppm дейтерия.

изменениям. Возможно, объектами противогого замещения могут быть комплексы III и IV ЭТЦ. Комплекс III (или Q-комплекс) катализирует окисление убинола цитохромом c с помощью Fe-S-кластера (белок Риске) и цитохромной цепочки $b(b_1 \text{ и } b_h)c_1$. Белок Риске находится на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, как и гем c_1 . А цитохром c комплекса IV ЭТЦ способен спокойно диффундировать в межмембранное пространство. Это дает основание предположить, что оба комплекса могут быть доступными для D/H-обмена. К тому же оба комплекса осуществляют протон-движущие циклы, в результате которых формируется трансмембранный потенциал митохондрий. Известно, что белок Риске является конформационно подвижным белком [51], осуществляя перенос электрона от убинола на цитохром c_1 . Последний же, в свою очередь, транспортирует электроны на комплекс IV ЭТЦ – цитохром c -оксидазу. Вероятно, любое структурное изменение этих белков, вызванное изотопным обменом водорода, может привести к блокировке передачи электрона по ЭТЦ. Возможно, что замедление работы ЭТЦ в Q-комплексе также может стать причиной дополнительной деполяризации мембраны митохондрий.

Известно, что гипогликемия и глутаматная токсичность нейронов приводят к уменьшению МПМ и повышению продукции АФК [36]. На основании этих данных можно предположить, что наблюдаемое снижение МПМ в нейронах мозжечка могло быть следствием перенесенного

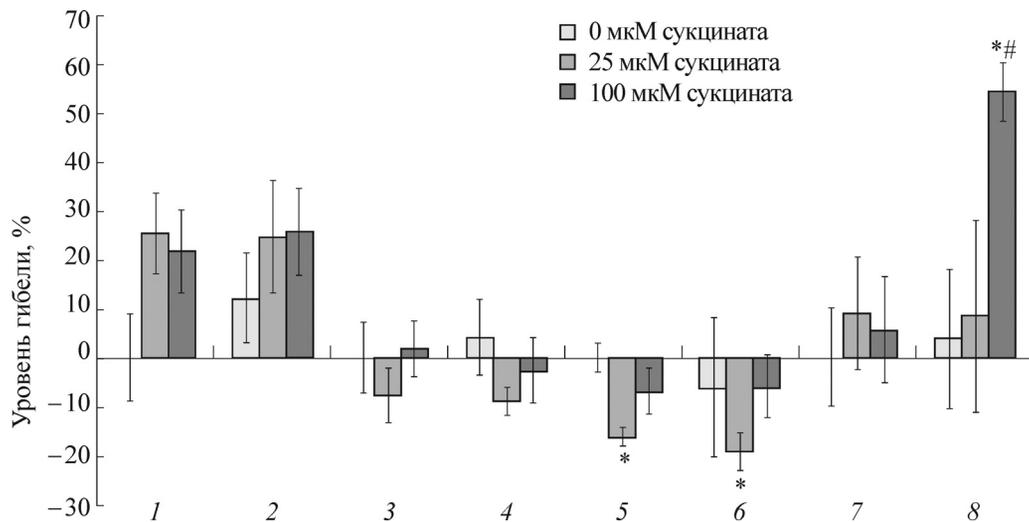


Рис. 4. Влияние среды с различным содержанием дейтерия на уровень гибели культивируемых нейронов мозжечка крыс при температурном стрессе: 1 – 22°C, 150 ppm дейтерия; 2 – 22°C, 50 ppm дейтерия; 3 – 26°C, 150 ppm дейтерия; 4 – 26°C, 50 ppm дейтерия; 5 – 36°C, 150 ppm дейтерия; 6 – 36°C, 50 ppm дейтерия; 7 – 39°C, 150 ppm дейтерия; 8 – 39°C, 50 ppm дейтерия. Данные представлены в виде $M \pm m$ в % от значения при 150 ppm дейтерия; * – $p < 0,05$ к среде, содержащей 150 ppm дейтерия; # – $p < 0,05$ к среде, содержащей 150 ppm дейтерия и 100 мкМ сукцината.

нейроном стресса, вызванного изотопным D/H-обменом.

Глюкозная депривация привела к повышению гибели нейронов на 16% в культурах группы «150 ppm, ГД» и на 22% в культурах группы «50 ppm, ГД» по отношению к контрольной группе «150 ppm» ($p < 0,05$; рис. 3), что хорошо согласуется с литературными данными [52]. При помещении культур в среду 50 ppm в отсутствие глюкозной депривации, уровень гибели нейронов недостоверно повысился на 5% ($p > 0,05$). Таким образом, различия между группами с содержанием дейтерия 150 и 50 ppm при глюкозной депривации, а также в среде с нормальным уровнем глюкозы были хотя и статистически недостоверны, но одинаково направлены и практически одинаковы.

Исследование влияния среды с содержанием дейтерия 150 и 50 ppm при различных концентрациях сукцината на выживаемость нейронов при температурах 22, 26, 36 и 39°C показало следующее: при 39°C отличия от контрольной точки «150 ppm дейтерия, 0 мкМ сукцината» были статистически недостоверны для всех групп (рис. 4), кроме точки «50 ppm 100 мкМ сукцината», когда уровень гибели нейронов повысился на 54% ($p < 0,05$). При добавлении в среду 25 и 100 мкМ сукцината при 36°C происходит снижение уровня гибели нейронов как при 150, так и при 50 ppm дейтерия. Достоверное отличие от точки «150 ppm без сукцината» наблюдается при добавлении сукцината

в концентрации 25 мкМ. Понижение температуры среды до 26°C существенного влияния на гибель нейронов не оказало. При 22°C уровень гибели нейронов повышается как при 150, так и при 50 ppm дейтерия, отличия от контрольной точки «150 ppm без сукцината» носят достоверный характер. Таким образом, уровень гибели нейронов как при 150, так и при 50 ppm дейтерия в среде существенно не отличается за исключением варианта «39°C при 100 мкМ сукцината». Вероятно, повышенной причиной гибели нейронов мозжечка послужило нарушение их энергетического метаболизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Исследования показали, что двухчасовая инкубация в ИСР с пониженным содержанием дейтерия не оказала цитопротективного эффекта на культуру нейронов мозжечка. Глюкозная депривация и температурный стресс приводят к повышенной гибели культуры нейронов при инкубации в среде, приготовленной на ОДВ. Возможно, данный эффект является следствием того, что замещение дейтерия на протий в тканях культуры мозжечка вызывает дополнительный стресс, накладываемый на внешнее воздействие. В результате клетка испытывает двойное стрессовое влияние.

Результаты опытов на культуре тканей мозжечка, а также результаты, полученные при

изучении свободнорадикальных процессов в тканях головного мозга крыс, показывают, что среда с пониженным содержанием дейтерия оказывает стрессорирующий эффект при небольшом времени экспозиции.

Кроме того, предстрессовое продолжительное применение воды с пониженным содержанием дейтерия обуславливает возникновение протекторного эффекта у лабораторных животных при гипоксии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 6.5882.2017/БЧ), а также в рамках реализации Государственного задания Южного научного центра РАН № 00-19-21.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. W. Kreuzer-Martin, M. J. Lott, J. R. Ehleringer, et al., *Biochemistry* **45**, 13622 (2006).
2. А. А. Киркина, В. И. Лобышев, О. Д. Лопина и др., *Биофизика* **59** (2), 399 (2014).
3. А. В. Косенков, М. В. Гуляев, В. И. Лобышев и др., *Биофизика* **63** (5), 1021 (2018).
4. V. M. Fernandes de Lima and W. Hanke, *J. Bioph. Chem.* **2** (3), 353 (2011).
5. W. C. Bila, R. M. S. Mariano, V. R. Silva, et al., *Isotopes in Env. and Health Studies* **53** (4), 327 (2017).
6. A. V. Syroeshkin, N. V. Antipova, A. V. Zlatska, et al., *J. of Trace Elements in Med. and Biol.* **50**, 629 (2018).
7. L. Olariu, M. Petcu, C. Tulcan, et al., *Lucrari stiintifice medicina veterinara* **40**, 265 (2007).
8. D. S. Avila, G. Somlyai, I. Somlyai, et al., *Toxic. Lett.* **211**, 319 (2012).
9. A.-L. Luo, Y.-L. Zheng, and F.-S. Cong, *J. Shanghai Jiaotong University (Med. Sci.)* **38** (4), 467 (2018).
10. I. M. Chernukha, L. V. Fedulova, E. A. Kotenkova, et al., *Voprosy Pitaniia* **85** (5), 36 (2016).
11. S. S. Dzhimak, A. I. Shikhliarova, G. V. Zhukova, et al., *Jundishapur J. Natural Pharm.* **13** (3), e83494 (2018).
12. Т. М. Аунг и И. Л. Селиваненко, *Хим. промышленность сегодня* **2**, 3 (2017).
13. Р. А. Александров, Н. И. Лагунцов, И. М. Курчатова и др., *Атомная энергия* **124** (6), 336 (2018).
14. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин, Н. С. Васильев и др., *Наука Кубани* **3**, 18 (2010).
15. I. S. Petriev, V. Y. Frolov, S. N. Bolotin, et al., *Russian Physics J.* **60** (9), 1611 (2018).
16. I. S. Petriev, S. N. Bolotin, V. Y. Frolov, et al., *Bull. Rus. Acad. Sci.: Physics* **82** (7), 807 (2018).
17. А. А. Kravtsov, S. V. Kozin, E. R. Vasilevskaya, et al., *J. Pharm. Nutr. Sci.* **8** (2), 42 (2018).
18. S. S. Dzhimak, A. A. Basov, A. A. Elkina, et al., *Jundishapur J. of Natural Pharm. Prod.* **13** (2), e69557 (2018).
19. Ю. Е. Синяк и Д. В. Раков, *Авиакосмическая и экологическая медицина* **41** (6-1), 57 (2007).
20. S. Chira, L. Raduly, C. Braicu, et al., *Experimental and Therapeutic Medicine* **16** (2), 1241 (2018).
21. C. Mladin, A. Ciobica, R. Lefter, et al., *Neurosci. Lett.* **583**, 154 (2014).
22. T. Strekalova, M. Evans, A. Chernopiatko, et al., *Behav. Brain Res.* **277**, 237 (2015).
23. C. Mladin, A. Ciobica, R. Lefter, et al., *Arch. Biol. Sci.* **66** (2), 947 (2014).
24. M. V. Vasin, I. B. Ushakov, and I. V. Bukhtiyarov, *Biol. Bull.* **45** (1), 73 (2018).
25. S. Mehri, Q. Dadesh, J. Tabeshpour, et al., *Jundishapur J. of Natural Pharm. Prod.* **11** (4), 637 (2016).
26. M. V. Vasin and I. B. Ushakov, *Biophysics* **63** (2), 237 (2018).
27. M. Mazdeh, M. E. Rahiminejad, A. Nili-Ahmadabadi, et al., *Jundishapur J. of Natural Pharm. Prod.* **11** (1), 627 (2016).
28. A. V. Voronkov and D. I. Pozdnyakov, *Research Results in Pharmacology* **4** (2), 1 (2018).
29. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин и С. С. Джимаков, *Наука Кубани* **3**, 18 (2010).
30. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин, С. С. Джимаков и др., *Экол. вестн. науч. центров ЧЭС* **1**, 13 (2013).
31. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition* (Washington, DC: The National Academies Press, 2011), p. 248.
32. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злишева, Т. В. Андросова, и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **61** (5), 585 (2016).
33. М. М. Sozarukova, A. M. Polimova, E. V. Proskurnina, et al., *Biophysics* **61** (2), 284 (2016).
34. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова и Л. М. Мажуль, *Вопр. мед. химии* **1**, 1181 (1987).
35. И. В. Викторова и В. Е. Шунгская, *Методы культивирования. Руководство по культивированию нервной ткани* (Наука, М., 1988).
36. Н. К. Исаев, Е. В. Стельмашук, У. Дирнагл и др., *Биохимия* **73** (2), 185 (2008).
37. Е. В. Стельмашук, С. В. Новикова и Н. К. Исаев, *Биохимия* **75** (8), 1150 (2010).
38. Н. М. Shapiro, *Practical flow cytometry* (Alan R. Liss, Inc., N.-Y., 1988), p. 353.
39. М. А. Флеров и И. А. Герасимова, *Нейрохимия* **23**, 307 (2006).
40. R. M. Adibhatla and J. F. Hatcher, *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 125 (2010).
41. R. M. Adibhatla and J. F. Hatcher, *BMB Rep.* **41**, 560 (2008).
42. P. H. Chan, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 2 (2001).
43. J. C. De la Torre and G. B. Stefano, *Brain Res. Rev.* **34**, 119 (2000).
44. А. И. Shikhliarova, G. V. Zhukova, O. I. Kit, et al., *Med. News of North Caucasus* **13** (1), 85 (2018).

45. М. О. Самойлов и Е. А. Рыбникова, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **98** (1), 108 (2012).
46. М. О. Самойлов, Е. В. Лазаревич, Д. Г. Семенов и др., Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **87**, 714 (2001).
47. Е. А. Рыбникова, Л. И. Хожай, Е. И. Тюлькова и др., Морфология **125** (2), 10 (2004).
48. М. О. Самойлов, Н. А. Ситник, Е. А. Рыбникова и др., Докл. РАН **402** (4), 1 (2005).
49. A. A. Konstantinov, S. Siletsky, D. Mitchell, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 9085 (1997).
50. T. V. Vygodina, N. Capitanio, S. Papa, et al., FEBS Lett. **412** (3), 405 (1997).
51. В. Г. Гривеникова и А. Д. Виноградов, Успехи биол. химии **53**, 245 (2013).
52. Е. Е. Генрихс, Е. В. Стельмашук, В. Б. Туровецкий и др., Нейрохимия **34** (2), 146 (2017).

Isopotic Substitution of Deuterium for Protium in Rat Brain Tissues Changes Brain Tolerance to Hypoxia

S.V. Kozin* **, A.A. Kravtsov* **, A.A. Elkina* **, E.I. Zlishcheva*,
E.V. Barysheva***, L.V. Shurygina*, A.V. Moiseev***, and M.G. Baryshev* **

*Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

**Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chehova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

***Kuban State Medical University, ul. Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia

****Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia

The paper presents the results of a study of the effect of deuterium-depleted water on oxidative processes in the rat brain under physiological conditions and during hypoxia, as well as data obtained by the method of tissue culture, characterizing the functional parameters of neurons under stressful conditions. The study of free radical processes in the rat brain tissues has shown that deuterium-depleted water consumption for two weeks has a stress effect. Longer consumption of deuterium-depleted water causes activation of non-specific protective systems of the body. We have investigated the effect of saline solution, prepared with deuterium-depleted water, on the cerebellar tissue culture. It has been found that glucose deprivation and temperature stress (39°C) lead to increased neuronal culture death during incubation in deuterium-depleted water. Neuronal death rates based on the incorporation of deuterium at 150 and 50 ppm do not differ significantly under physiological conditions. At the same time, in the deuterium-depleted medium, the mitochondrial membrane potential of cerebellar neurons decreases. Thus, a two-hour incubation of cerebellar neurons with a deuterium-depleted saline solution exerted no cytoprotective effect.

Keywords: deuterium, protium, isotope metabolism, hypoxia, brain, cerebellar tissue culture, mitochondrial potential, glucose deprivation, temperature stress