

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623313>

# ***In vivo* исследование роли пероксида водорода в развитии ишемического инсульта в модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета 1 типа у крыс с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7**

А.П. Трифонова<sup>1, 2\*</sup>, Д.А. Котова<sup>2</sup>, А.Д. Иванова<sup>2</sup>, М.С. Почечуев<sup>3</sup>, Ю.В. Храмова<sup>2, 3</sup>, М.А. Судоплатов<sup>2, 4</sup>, В.А. Катруха<sup>2, 3</sup>, А.Д. Сергеева<sup>2, 3</sup>, Р.И. Раевский<sup>2</sup>, М.А. Солотенков<sup>3</sup>, И.В. Федотов<sup>3, 5, 9</sup>, А.Б. Федотов<sup>3, 5, 6</sup>, В.В. Белоусов<sup>2, 4, 7, 8</sup>, А.М. Жёлтиков<sup>9</sup>, Д.С. Билан<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Российская Федерация;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация;

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация;

<sup>5</sup> Российский квантовый центр «Сколково», Москва, Российская Федерация;

<sup>6</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, Российская Федерация;

<sup>7</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Российская Федерация;

<sup>8</sup> Институт сердечно-сосудистой физиологии, Университетский медицинский центр Гёттингена, Университет Георга-Августа, Гёттинген, Германия;

<sup>9</sup> Техасский университет A&M, Техас, США

## АННОТАЦИЯ

Сахарный диабет является одним из значимых факторов риска развития осложнений после ишемического инсульта. При этом механизм, посредством которого повышенный гликемический статус влияет на метаболизм нейронов при развитии ишемии, остаётся изученным не до конца. Одной из вероятных причин усугубления последствий ишемического инсульта на фоне гипергликемии является окислительный стресс, маркёром которого может служить  $H_2O_2$ . В данной работе при помощи генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора HyPer7 нами была впервые продемонстрирована динамика пероксида водорода в матриксе митохондрий нейронов во время развития ишемического инсульта в условиях нормального и повышенного уровней глюкозы в крови.

Исследование проводили на крысах линии SHR с нормальным и повышенным гликемическими статусами. Моделирование сахарного диабета 1 типа проводили при помощи инъекций стрептозотоцина, токсичного для  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Для экспрессии флуоресцентного биосенсора HyPer7 в митохондриях нейронов области хвостатого ядра под контролем стереотаксиса инъецировали суспензию частиц аденоассоциированного вируса, несущего ген сенсора под нейрональным промотором. Непосредственно после инъекции в стриатум мозга крыс имплантировали оптические волокна с керамическим адаптером для последующей регистрации сигнала индикатора  $H_2O_2$  на высокочувствительной установке для возбуждения и детекции флуоресценции, собранной в лаборатории спектроскопии и нелинейной оптики МГУ. Запись сигнала биосенсора проводили непрерывно в режиме реального времени с момента введения животного в наркоз. Во время регистрации животному под анестезией проводили хирургическую операцию, моделируя инсульт путём окклюзии средней мозговой артерии, которая снабжает кровью полосатое тело головного мозга.

Используя HyPer7 в исследуемой модели ишемического инсульта, мы обнаружили, что динамика изменения концентрации  $H_2O_2$  в поражённом полушарии у крыс с нормальным и повышенным гликемическими статусами не отличается как в острой фазе инсульта, так и спустя сутки после окклюзии. В обеих группах животных наблюдалось окисление биосенсора как при ишемии, так и при реперфузии, однако наиболее выраженный ответ HyPer7 демонстрировал спустя сутки после окклюзии, что свидетельствует о значительном повышении концентрации пероксида водорода.

Рукопись получена: 14.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

Также мы оценивали метаболическую активность нейронов головного мозга путём окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом срезов, полученных спустя 24 часа после окклюзии средней мозговой артерии. У животных с повышенным уровнем глюкозы в крови объём повреждения мозга был в 2,6 раза больше, чем у животных с нормальным гликемическим статусом. На увеличение тяжести последствий ишемического инсульта на фоне гипергликемии указывает и более высокий уровень смертности по сравнению с контрольной группой (25%), в которой не наблюдали летального исхода до выведения животного из эксперимента.

В данном исследовании мы показали, что повышенный гликемический статус не изменяет динамику концентрации  $H_2O_2$  как в острой фазе, так и спустя сутки после окклюзии, но значительно усугубляет ишемическое повреждение тканей головного мозга и увеличивает смертность.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт; гипергликемия; пероксид водорода; генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор; оптоволоконная спектроскопия.

**Как цитировать:**

Трифонов А.П., Котова Д.А., Иванова А.Д., Почечуев М.С., Храмова Ю.В., Судоплатов М.А., Катруха В.А., Сергеева А.Д., Раевский Р.И., Солотенков М.А., Федотов И.В., Федотов А.Б., Белоусов В.В., Жёлтиков А.М., Билан Д.С. *In vivo* исследование роли пероксида водорода в развитии ишемического инсульта в модели стрептозототин-индуцированного сахарного диабета 1 типа у крыс с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7 // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 578–581. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623313>

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00299.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\* А.П. Трифонова: Российская Федерация, 141700, Долгопрудный, Институтский пер., д. 9; e-mail: [trifonova.ap@phystech.ru](mailto:trifonova.ap@phystech.ru)

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623313>

# ***In vivo* study of the role of hydrogen peroxide in the development of ischemic stroke in a model of streptozotocin-induced type I diabetes in rats using genetically encoded biosensor HyPer7**

A.P. Trifonova<sup>1, 2 \*</sup>, D.A. Kotova<sup>2</sup>, A.D. Ivanova<sup>2</sup>, M.S. Pochechuev<sup>3</sup>, Yu.V. Khramova<sup>2, 3</sup>, M.A. Sudoplatov<sup>2, 4</sup>, V.A. Katrukha<sup>2, 3</sup>, A.D. Sergeeva<sup>2, 3</sup>, R.I. Raevskii<sup>2</sup>, M.A. Solotenko<sup>3</sup>, I.V. Fedotov<sup>3, 5, 9</sup>, A.B. Fedotov<sup>3, 5, 6</sup>, V.V. Belousov<sup>2, 4, 7, 8</sup>, A.M. Zheltikov<sup>9</sup>, D.S. Bilan<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russian Federation;

<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup> Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

<sup>5</sup> Russian Quantum Center "Skolkovo", Moscow, Russian Federation;

<sup>6</sup> National University of Science and Technology "MISiS", Moscow, Russian Federation;

<sup>7</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

<sup>8</sup> Institute for Cardiovascular Physiology, University Medical Center Göttingen, Georg-August University, Göttingen, Germany;

<sup>9</sup> Texas A&M University, Texas, USA

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a significant risk factor for the development of complications following ischemic stroke. However, the precise mechanisms through which elevated glycemic status impacts neuronal metabolism during ischemia remain unclear. One probable reason for the exacerbation of post-ischemic consequences under hyperglycemia is oxidative stress, the indicator of which may be H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this research, we used the genetically encoded fluorescent biosensor HyPer7 to exhibit the hydrogen peroxide dynamics in the matrix of neuronal mitochondria during ischemic stroke under hyperglycemic and normal glucose conditions.

The research was conducted on SHR rats with normal and high blood glucose levels. Type I diabetes mellitus was induced by injecting streptozotocin, which is toxic to pancreatic  $\beta$ -cells. For the expression of the fluorescent biosensor HyPer7-mito in the neuronal mitochondria of the caudate nucleus region, a suspension of adeno-associated virus particles carrying the sensor gene under the neuronal promoter was administered under stereotactic control. After the rats were injected, optical fibers with a ceramic adapter were implanted directly into their brain striatum, enabling us to register the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicator signal using a highly sensitive fluorescence excitation and detection system developed by the Institute of Photonics and Nonlinear Spectroscopy at Moscow State University. The biosensor signal recording was continuously performed in real-time from the moment the animal was anesthetized. While recording, anesthetized rats underwent middle cerebral artery occlusion, which supplies corpus striatum.

Using HyPer7 in the ischemic stroke model described, we observed that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration dynamics in the affected hemisphere of rats with normal and elevated blood glucose levels were similar during the acute phase of stroke and one day after occlusion. Oxidation of the biosensor was observed in both animal groups during both ischemia and reperfusion. However, HyPer7 exhibited the most marked response one day after the occlusion of the middle cerebral artery, indicating a significant rise in hydrogen peroxide concentration.

Furthermore, the metabolic activity of brain tissue was evaluated through staining slices obtained 24 hours after occlusion with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Rats with diabetes exhibited 2.6 times larger brain damage, indicating that hyperglycemia exacerbates the consequences of ischemic stroke. Furthermore, there was a higher mortality rate in the hyperglycemic group following ischemic stroke. This indicates that the consequences of ischemic stroke were more severe under hyperglycemia, with 25% of the animals in the hyperglycemic group dying before the experiment ended, whereas none of the control group animals died.

Our study found that an elevated glycemic status does not impact the creation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the acute phase of stroke or one day after occlusion. However, it significantly intensifies damage to brain tissue and raises mortality rates.

Received: 14.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

**Keywords:** ischemic stroke; hyperglycemia; hydrogen peroxide; genetically encoded fluorescent biosensor; fiber-optic spectroscopy.

**To cite this article:**

Trifonova AP, Kotova DA, Ivanova AD, Pochechuev MS, Khramova YuV, Sudoplatov MA, Katrukha VA, Sergeeva AD, Raevskii RI, Solotnikov MA, Fedotov IV, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM, Bilan DS. *In vivo* study of the role of hydrogen peroxide in the development of ischemic stroke in a model of streptozotocin-induced type I diabetes in rats using genetically encoded biosensor HyPer7. *Genes & Cells*. 2023;18(4):578–581. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623313>

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding sources.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-15-00299.

## AUTHORS' CONTACT INFO

\* A.P. Trifonova; address: 9 Institutsky lane, 141700 Dolgoprudny, Russian Federation; e-mail: [trifonova.ap@phystech.edu](mailto:trifonova.ap@phystech.edu)