

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623461>

Регистрация изменения биохимических параметров *in vivo* в модели ишемического инсульта

Ю.В. Храмова^{1, 2*}, Д.А. Котова², А.Д. Иванова², М.С. Почечуев¹, И.В. Кельмансон²,
А.П. Трифонова^{2, 3}, М.А. Судоплатов^{2, 4}, В.А. Катруха^{1, 2}, А.Д. Сергеева^{1, 2}, Р.И. Раевский²,
М.А. Солотенков¹, И.В. Федотов^{1, 5}, А.Б. Федотов^{1, 5, 6}, В.В. Белоусов^{2, 4, 7, 8}, Д.С. Билан^{2, 4}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация;

² Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация;

³ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Российская Федерация;

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация;

⁵ Российский квантовый центр «Сколково», Москва, Российская Федерация;

⁶ Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, Российская Федерация;

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

⁸ Институт сердечно-сосудистой физиологии, Университетский медицинский центр Гёттингена, Университет Георга-Августа, Гёттинген, Германия

АННОТАЦИЯ

Инсульт является одним из важнейших социально значимых заболеваний. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, он занимает второе место среди болезней, приводящих к летальным исходам [1]. Исследование молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания позволит разработать эффективные способы предотвращения развития инсульта и терапии, позволяющей минимизировать его негативные последствия. Несмотря на обилие экспериментальных данных, большая часть их получена косвенными методами, в то время как исследование динамики биохимических параметров в тканях головного мозга в режиме реального времени в острой фазе ишемического инсульта затруднены. Использование генетически кодируемых сенсоров открывает новые возможности для регистрации изменений различных биохимических и метаболических параметров в тканях *in vivo*.

В настоящем исследовании проводили изучение изменения pH, генерации перекиси водорода как одного из биологически значимых видов АФК, синтеза полисульфидов в различных типах клеток тканей мозга крыс SHR при развитии ишемического инсульта в режиме реального времени при помощи сенсоров SypHer3s (детекция pH), HyPer7 (детекция H₂O₂) и PersIc (детекция полисульфидов). Ишемический инсульт моделировали путем окклюзии средней мозговой артерии. Регистрацию сигналов сенсоров *in vivo* проводили при помощи оптоволоконной установки, собранной в лаборатории спектроскопии и нелинейной оптики МГУ.

В результате проведенных исследований было показано, что в острой фазе инсульта в цитоплазме нейронов хвостатого ядра — эпицентра ишемии — происходило развитие ацидоза, причем значение pH изменялось от $7,25 \pm 0,08$ до $6,7 \pm 0,15$ в первые секунды от начала окклюзии артерии. После резкого падения наблюдали постепенное повышение значения pH, которое продолжалось и во время реперфузии, однако восстановление pH до исходного значения происходило не у всех животных. В области зоны пенумбры наблюдали волнообразное изменение сигнала сенсора, в то время как в здоровом полушарии сигнал сенсора не изменялся. Исследование динамики образования H₂O₂ в матриксе митохондрий нейронов хвостатого ядра показало, что в острой фазе инсульта происходит незначительное окисление сенсора как во время ишемии, так и при реперфузии, что свидетельствует о слабой продукции АФК. Однако спустя 24 часа после проведения операции регистрировали существенное повышение сигнала сенсора. Таким образом, было подтверждено развитие окислительного стресса в больном полушарии, однако динамика его развития оказалась отличной от общепринятой точки зрения. Ранее считалось, что именно в острой фазе происходит чрезмерная продукция H₂O₂, приводящая к окислительному стрессу и связанной с этим гибелью клеток мозга. Сравнение динамики продукции перекиси водорода в нейронах и астроцитах выявило различия между этими популяциями клеток. Оказалось, что уже через 12 часов после окклюзии средней мозговой артерии сигнал сенсора в астроцитах нарастал интенсивнее, чем в нейронах. Данная тенденция сохранялась вплоть до окончания измерений через 40 часов после операции. Подобные различия могут быть связаны как с защитной функцией глиальных клеток, предотвращающих повреждающее действие перекиси водорода на нейроны и способствующих поддержанию

Рукопись получена: 15.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

структуры миелина в головном мозге, так и с ролью астроцитов в развитии нейровоспаления. Известно, что помимо активных форм кислорода в развитии патологических процессов также существенную роль играют активные формы серы. Измерение сигнала сенсора PersIsc, детектирующего появление полисульфидов и персульфидов, не выявило различий между хвостатым ядром здорового полушария и полушария с очагом развития инсульта. Однако отдельный интерес представляет зона пенумбры, учитывая волны ацидоза, которые мы наблюдали с помощью сенсора SurHer3s, мы предполагаем, что они могут быть связаны как с распространяющейся деполяризацией и изменением концентрации кальция, так и с развитием нейровоспаления, что в свою очередь может приводить к синтезу полисульфидов, являющихся модуляторами воспалительных реакций.

Таким образом, полученные нами данные существенно дополняют имеющийся пул информации о метаболических изменениях, протекающих во время развития ишемического повреждения мозга.

Ключевые слова: ишемический инсульт; генетически кодируемые сенсоры; оптоволоконная спектроскопия; активные формы кислорода и серы; нейроны; астроциты; pH.

Как цитировать:

Храмова Ю.В., Котова Д.А., Иванова А.Д., Почечуев М.С., Кельмансон И.В., Трифонова А.П., Судоплатов М.А., Катруха В.А., Сергеева А.Д., Раевский Р.И., Солотенков М.А., Федотов И.В., Федотов А.Б., Белоусов В.В., Билан Д.С. Регистрация изменения биохимических параметров *in vivo* в модели ишемического инсульта // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 487–490. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623461>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pega F., Nafradi B., Momen N.C., et al. Global, regional, and national burdens of ischemic heart disease and stroke attributable to exposure to long working hours for 194 countries, 2000–2016: A systematic analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury // Environment International. 2021. Vol. 154. P. 106595. doi: 10.1016/j.envint.2021.106595

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* Ю.В. Храмова; адрес: Российская Федерация, 119234, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1; e-mail: yul.khramova@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623461>

Recording changes in biochemical parameters *in vivo* in the ischemic stroke model

Yu.V. Khramova^{1,2*}, D.A. Kotova², A.D. Ivanova², M.S. Pochechuev¹, I.V. Kelmanson², A.P. Trifonova^{2,3}, M.A. Sudoplatov^{2,4}, V.A. Katrukha^{1,2}, A.D. Sergeeva^{1,2}, R.I. Raevskii², M.A. Solotnikov¹, I.V. Fedotov^{1,5}, A.B. Fedotov^{1,5,6}, V.V. Belousov^{2,4,7,8}, D.S. Bilan^{2,4}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

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

³ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russian Federation;

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

⁵ Russian Quantum Center "Skolkovo", Moscow, Russian Federation;

⁶ National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russian Federation;

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

⁸ Institute for Cardiovascular Physiology, University Medical Center Göttingen, Georg-August University, Göttingen, Germany

ABSTRACT

Stroke is a significant and socially insidious disease that ranks second among fatal diseases according to the World Health Organization [1]. Understanding the molecular mechanisms behind the pathogenesis of this ailment will enable the development of more effective preventative measures and treatment strategies to minimize the negative consequences of stroke. Despite the abundance of experimental data, most of which were acquired indirectly, the study of the dynamics of biochemical parameters in brain tissue in real time during the acute phase of ischemic stroke is difficult. The use of genetically-encoded sensors creates novel possibilities for monitoring alterations in different biochemical and metabolic parameters *in vivo* tissues.

In this study, we evaluated pH changes, hydrogen peroxide production (an important type of biologically active ROS), and polysulfide synthesis in various types of brain tissue cells of SHR rats during the development of ischemic stroke in real time using sensors such as SypHer3s (for pH detection), HyPer7 (for H₂O₂ detection), and PersIc (for polysulfide detection). Middle cerebral artery occlusion was used to simulate an ischemic stroke. The *in vivo* sensor signals were registered with a fiber optic setup that was created in the laboratory of spectroscopy and nonlinear optics at Moscow State University.

The studies revealed that in the acute phase of stroke, acidosis occurred in the cytoplasm of neurons in the caudate nucleus, the epicenter of ischemia. The pH mutated from 7.25±0.08 to 6.7±0.15 within the first few seconds after arterial occlusion initiation. A gradual increase in pH was observed after the initial drop, which persisted throughout reperfusion but did not return to the original value in all animals. In the penumbra zone, a wave-like shift in sensor signal was detected, whereas no change in sensor signal was noted in the healthy hemisphere. Investigation of the dynamics of H₂O₂ formation in the mitochondrial matrix of caudate neurons revealed minimal sensor oxidation during ischemia/reperfusion in the acute phase of stroke, indicating low ROS production. Nevertheless, a substantial increase in the sensor signal was detected after 24 hours following the surgery. Thus, the confirmation of oxidative stress development in the affected hemisphere differed from the commonly accepted view in terms of its dynamics. Previously, it was believed that excessive production of H₂O₂ leading to oxidative stress and related brain cell death occurred primarily in the acute phase. However, a comparison of hydrogen peroxide production dynamics in neurons and astrocytes revealed differences between these cell populations. It was discovered that as early as 12 hours after middle cerebral artery occlusion, the sensor signal in astrocytes increased more intensely than in neurons. This trend persisted until the end of the measurements, 40 hours after surgery. The observed distinctions may stem from glial cells' protective function in counteracting the harmful consequences of hydrogen peroxide on neurons, along with their contribution to maintaining the myelin structure in the brain. Additionally, the role of astrocytes in neuroinflammation development is noteworthy. Reactive sulfur species, in addition to reactive oxygen species, appear to be significant contributors to the development of pathological processes. The PersIc sensor signal measurement did not show any disparities between the caudate nucleus of the healthy hemisphere and the hemisphere affected by stroke development in terms of polysulfide and persulfide appearance detection. However, the area surrounding the core infarction is noteworthy due to the observed bouts of acidosis using the SypHer3s sensor. Our findings suggest a potential association between

Received: 15.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

these bouts, spreading depolarization, changes in calcium concentration, and the development of neuroinflammation. These reactions may ultimately lead to the synthesis of polysulfides, known modulators of inflammatory reactions. Thus, our data provides valuable additions to the existing knowledge on metabolic changes that take place during the progression of ischemic brain injury.

Keywords: ischemic stroke; genetically encoded sensors; fiber optic spectroscopy; reactive oxygen and sulfur forms; neurons; astrocytes; pH.

To cite this article:

Khramova YuV, Kotova DA, Ivanova AD, Pochechuev MS, Kelmanson IV, Trifonova AP, Sudoplatov MA, Katrukha VA, Sergeeva AD, Raevskii RI, Solotnikov MA, Fedotov IV, Fedotov AB, Belousov VV, Bilan DS. Recording changes in biochemical parameters *in vivo* in the ischemic stroke model. *Genes & Cells*. 2023;18(4):487–490. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623461>

ADDITIONAL INFORMATION

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

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Pega F, Nafradi B, Momen NC, et al. Global, regional, and national burdens of ischemic heart disease and stroke attributable to exposure to long working hours for 194 countries, 2000–2016: A systematic analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury. *Environment International*. 2021;154:106595. doi: 10.1016/j.envint.2021.106595

AUTHORS' CONTACT INFO

* Yu.V. Khramova; address: 1 Leninskye Gory street, 119234 Moscow, Russian Federation; e-mail: yul.khramova@gmail.com