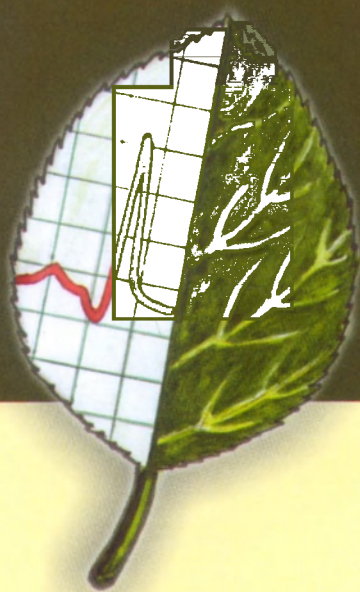


ISSN 2070-0997

ТЕХНОЛОГИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ



Редактор А.И.Григорьев

Том 9, № 10
2012



Тел./факс: (495) 625-9241
E-mail: info@radiotec.ru
[Http://www.radiotec.ru](http://www.radiotec.ru)

АКТИВИРОВАННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ РАДИКАЛОБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ТКАНИ МОЗГА

**А.М. Полимова, Г.Р. Хакимова, Г.К. Владимиров,
Т.В. Жидкова, Д.Ю. Измайлов, Е.В. Проскурнина,
М.В. Угрюмов, Ю.А. Владимиров**

Разработана методика исследования радикалообразующей способности ткани мозга, основанной на регистрации люцигенин-активированной хемилюминесценции.

Ключевые слова: хемилюминесценция, люцигенин, срезы мозга, паркинсонизм.

The aim of this study was to develop a method of study of the radical-producing ability of the brain tissue based on the registration of lucigenin-dependent chemiluminescence.

Keywords: chemiluminescence, lucigenin, brain slices, parkinsonism.

Введение

Прогрессирующая гибель специфических нейронов головного мозга лежит в основе развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Все больше данных свидетельствуют об участии свободных радикалов в гибели специфических нейронов головного мозга при этих заболеваниях [1–4]. Основными источниками образования свободных радикалов при болезни Паркинсона считаются: окислительный метаболизм дофамина [5–8], нарушение функционирования митохондрий [1, 9]. В результате последнего образуются активные формы кислорода (АФК), которые вызывают интенсивную липидную пероксидацию [10] и повреждение митохондриальной ДНК [11]. Важный вклад в общий пул образования АФК вносит активация микроглиальных клеток. Это подтверждается исследованиями биопсийного материала ткани мозга после вскрытия людей с болезнью Паркинсона [12, 13].

Определение уровня содержания свободных радикалов в живой ткани является важной проблемой. Количество свободных радикалов трудно измерить ввиду их крайне высокой активности, поэтому доказать их роль в биологических процессах, как правило, можно только косвенным путем. Обычно для этого определяют устойчивые молекулярные продукты реакций (маркеры оксидативного стресса), в которых участвовали

© Авторы, 2012

**Анастасия Михайловна
Полимова** –

аспирант, кафедра медицинской
биофизики, факультет
фундаментальной медицины,
МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: corason27@mail.ru

**Гульнара Ринатовна
Хакимова** –

мл. науч. сотрудник,
лаборатория гормональных
регуляций,
ФГБУН Институт биологии
развития им. Н.К. Кольцова РАН
(Москва)
E-mail: 27.khakimova@gmail.com

**Георгий Константинович
Владимиров** –

студент 3-го курса,
Первый московский
медицинский университет
им. И.М. Мечникова
E-mail: ura_vladimirov@mail.ru

**Татьяна Владимировна
Жидкова** –

аспирант, факультет
фундаментальной медицины,
МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: t_msu@mail.ru

© Авторы, 2012

**Дмитрий Юрьевич
Измайлов –**

к.б.н., ст. преподаватель,
факультет фундаментальной
медицины,
МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: dizm@mail.ru

**Елена Васильевна
Проскурнина –**

доцент, кафедра медицинской
биофизики, факультет
фундаментальной медицины,
МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: proskurnina@gmail.com

**Михаил Вениаминович
Угрюмов –**

д.б.н., профессор, академик,
зав. лабораторией
гормональных регуляций,
ФГБУН Институт биологии
развития им. Н.К. Кольцова РАН
(Москва)
E-mail: mugrumov@mail.ru

**Юрий Андреевич
Владимиров –**

д.б.н., профессор, академик,
зав. лабораторией,
кафедра медицинской биофизики,
факультет фундаментальной
медицины,
МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: yuvlad@mail.ru

радикалы («метод отпечатков пальцев», fingerprinting) — измеряют конечные продукты взаимодействия АФК с биологическими макромолекулами, такими как ДНК, протеинами, липидами и антиоксидантами с низкомолекулярной массой [14–16]. К прямому методу анализа свободных радикалов относится метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), в том числе с использованием спиновых ловушек, которые могут влиять на протекающие в системе биохимические реакции или разрушаться в ходе некоторых из них. Электронный парамагнитный резонанс позволяет не только обнаружить, но и идентифицировать многие радикалы. Однако в биологических системах этот метод часто оказывается недостаточно чувствительным из-за крайне низкой стационарной концентрации радикалов в клетках и тканях [17].

Метод хемилюминесценции (ХЛ) является эффективным для изучения реакций, идущих с участием свободных радикалов. Данный метод регистрирует даже самые активные радикалы, концентрация которых в изучаемой системе может быть ничтожно мала, поскольку интенсивность ХЛ пропорциональна не концентрации радикалов, а скорости реакции, с которой они образуются.

Методом ХЛ оценивают роль активных частиц как *in vivo*, так и *ex vivo*. Хемилюминесценцию *in vivo* можно регистрировать с поверхности ткани (например, с поверхности предварительно обнаженных участков мозга [18]). Для исследований *ex vivo* используют гомогенаты ткани исследуемых областей [18, 19] или тонкие срезы [20, 21].

Один из способов регистрации ХЛ основан на использовании охлаждаемой фотоматрицы [22, 23]. Главным его достоинством является возможность регистрации ХЛ нескольких срезов ткани одновременно. Однако данный метод имеет ряд недостатков – малую чувствительность, низкую воспроизводимость, плохое пространственное разрешение, практически исключающее исследование реальной морфологической структуры [21–23], и самое главное — высокую стоимость прибора.

Более перспективным является использование фотоумножителя, обеспечивающего большую чувствительность и позволяющего регистрировать ХЛ небольших срезов мозга в оптимальных условиях (рН, температура, аэрация, введение вещества по ходу эксперимента).

Разработаны хемилюминесцентные методы анализа различных форм АФК, основанные на регистрации и анализе кинетики свечения в присутствии химических (люминол, люцигенин) и физических (кумарин С-525) активаторов [17, 24–26], которые могут быть использованы не только в модельных биохимических системах [27, 28], но и в изолированных клетках [29] и в маленьких кусочках ткани, например, печени и почек [30].

Цель работы – разработка методики анализа патологических процессов в мозге на модели паркинсонизма у мышей. Основное внимание при этом было уделено исследованию роли в патогенезе паркинсонизма АФК с использованием методов активированной ХЛ.

Материалы и методы

В работе были проведены исследования на мышцах линии C57BL/6 в возрасте 2,5–3 мес. Для получения токсин-индуцированного паркинсонизма использовали 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропирдин (МФТП, «Sigma», США), растворенный в физиологическом растворе (0,9%-ный NaCl, «Рестер», Россия). Концентрация МФТП составила $7 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Раствор вводили подкожно опытным мышам за 14 дней до декапитации по четыре раза в дозе по 12 мг/кг с 2-часовым интервалом (суммарно 48 мг/кг). Контрольным животным подкожно вводили такой же объем физиологического раствора четыре раза с 2-часовым интервалом. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями. Через две недели животных декапитировали. Группу животных, которым не вводили МФТП и физиологический раствор, декапитировали сразу. Затем у всех животных выделяли мозг, а из мозга – блоки ткани, содержащие стриатум и черную субстанцию. Далее из блоков ткани с помощью вибратора (Vibratome 1000 Plus, «Vibratome», США) получали срезы толщиной 300 мкм. Из одного полушария получали по три среза каждой области (стриатума и черной субстанции). Из полученных срезов выделяли стриатум (область проекции дофаминергических аксонов) и под контролем бинокулярной лупы черную субстанцию (место локализации тел дофаминергических нейронов) [31].

Хемилюминесценцию срезов регистрировали с помощью современного кюветного измерительного прибора SmartLum 5773, предназначенного для регистрации слабых и сверхслабых световых потоков (<http://www.powergraph.ru/hard/lum.asp>). Отдельно исследовали ХЛ срезов стриатума и черной субстанции из левого и правого полушарий. По три среза исследуемой области мозга помещали в 1000 мкл раствора Кребса-Рингера (г/л: NaCl – 6,96; KCl – 0,36; CaCl₂ – 0,22; MgSO₄·H₂O – 0,33; NaHCO₃ – 2,1; D-глюкоза – 1,82; HEPES – 4,8; аскорбиновая кислота – 0,02, все реактивы производства Sigma, США; pH 7,4), содержащего 60 мкМ люцигерина (динитрат 10,10-диметил-9,9-биакри-

диния; Sigma, США) и предварительно инкубировали при 37 °С в течение 10 мин без аэрации и перемешивания. В качестве ХЛ-зондов также использовали люминол (50 мкМ, 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион; «ICN Biomedicals», США), кумарин С-525 (10 мкМ, 2,3,5,6-1Н,4Н-тетрагидро-9-(2,-бензоимидазол-ил); ООО НПФ «Альфа-Аконис», Россия).

Для оценки влияния ХЛ-зондов и режима аэрации хемилюминесценцию далее регистрировали в течение длительного периода времени (до 30 мин). Для оценки воспроизводимости методики и влияния токсин-индуцированного паркинсонизма на динамику образования супероксид анион-радикалов (САР) эксперимент проводили по следующей схеме (рис. 1): сначала регистрировали ХЛ срезов левого полушария в условиях аэрации в течение 4 мин, в это время правое полушарие находилось в водяной бане при 37 °С без аэрации. Затем в течение 4 мин регистрировали ХЛ срезов правого полушария, а кювету со срезами левого полушария помещали на водяную баню при 37 °С без аэрации. Аналогичные циклы повторяли 5 раз. Схема с циклами последовательной регистрации ХЛ была обусловлена тем фактом, что ткань мозга теряла жизнеспособность при инкубации, а технические особенности прибора позволяли регистрировать ХЛ только одной пробы. Таким образом, чтобы получить данные для левого и правого полушарий одного животного, была необходима последовательная регистрация ХЛ срезов через определенные промежутки времени.

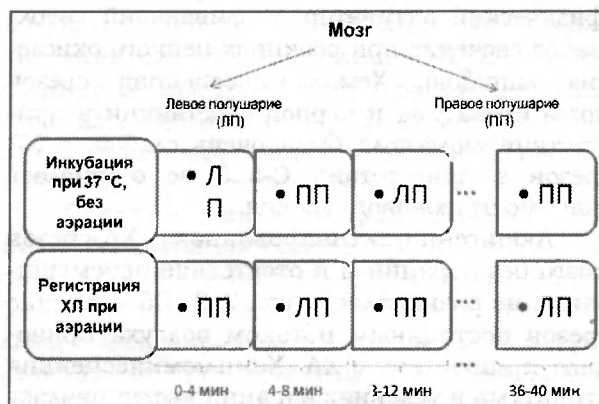


Рис. 1. Схема проведения эксперимента

Аэрацию в кюветном отделении хемилюминометра осуществляли продуванием через раствор слабого тока воздуха при помощи перистальтического насоса (Watson Mar-



low Pumps 323). Подобная аэрация обеспечивала и перемешивание среды. После эксперимента ткань взвешивали.

В качестве ингибитора CAP в раствор со срезами мозга добавляли миметик СОД 519В (комплексное соединения *N*-ацил-*L*-цистеина $C_5H_7NO_3SCo \cdot 5,5H_2O$ [Пат.РФ №225608 от 26 июля 2004 г., $M = 470,93$ г/моль]). Использовали разбавитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол (ДНФ) («Sigma», США), ингибитор Комплекса I ротенон (MP Biomedicals, Inc.), ингибитор миелопероксидазы и других гемсодержащих ферментов азид натрия («Sigma», США). В качестве растворителей для ингибиторов использовали метиловый спирт (Merck KGaA, Германия), диметилсульфоксид (ДМСО, MP Biomedicals).

Для характеристики происходящих изменений в ходе опытов в качестве аналитического сигнала использовали суммарную интенсивность ХЛ (S) за последние 3 мин цикла регистрации, нормированную на массу образца. Параметр S отражает общее количество образовавшихся радикалов за выбранный промежуток времени.

Результаты

Влияние активаторов и аэрации на динамику развития ХЛ. Исследовали три наиболее широко используемых активатора ХЛ: люминол (химический активатор, чувствительный к активным формам кислорода), люцигенин (химический активатор, селективный к супероксидным анион-радикалам) и кумарин С-525 (физический активатор, усиливающий сверхслабое свечение при реакциях цепного окисления липидов). Хемилюминесценция срезов мозга стриатума и черной субстанции в присутствии люминола была очень слабой, а ХЛ срезов в присутствии С-525 не отличалась значимо от фонового уровня.

Люцигенин-активированная ХЛ-срезов мозга без аэрации и в отсутствие перемешивания не развивалась (рис. 2, б). Обеспечение срезов постоянным потоком воздуха приводило к нарастанию ХЛ. Хемилюминесценция стриатума в условиях аэрации увеличивалась со временем, достигая максимума через 10 мин, а затем постепенно ослабевала (рис. 2, а). На рис. 2, а – аэрация среды, содержащей срезы стриатума левого полушария, осуществлялась в течение всего опыта, на рис. 2, б – аэрация начиналась в момент,

указанный стрелкой. Состав среды: 1000 мкл раствора Кребса–Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, срезы мозга. Сигнал обработан в программе PowerGraph 3.3.8 с использованием функции сглаживания по 32 точкам. Сходная кинетика ХЛ наблюдалась и для срезов мозга области черной субстанции, но свечение характеризовалось меньшей интенсивностью.

Если на фоне развивающегося свечения прекратить аэрацию раствора, то ХЛ сначала резко усиливалась, а затем снижалась до уровня люцигенин-независимого свечения омывающего раствора (рис. 3). Причем амплитуда вспышки превышала примерно в два раза предыдущий уровень развития ХЛ, который наблюдали до выключения перистальтического насоса.

Люцигенин-зависимая хемилюминесценция срезов мозга была обусловлена исключительно самой тканью: после извлечения ткани из кюветы свечение падало почти до контрольного значения 0,08 отн. ед. (ХЛ раствора люцигенина в растворе Кребса–Рингера) (табл. 1).

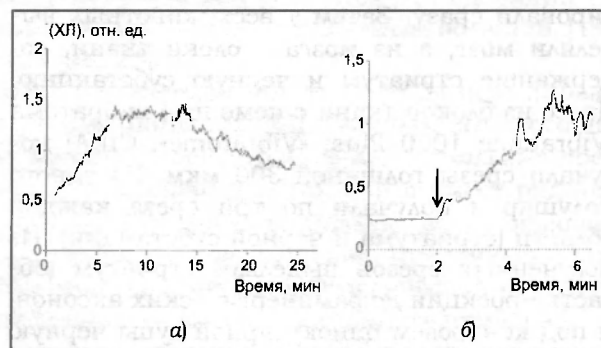


Рис. 2. Типичные кривые развития хемилюминесценции для срезов мозга

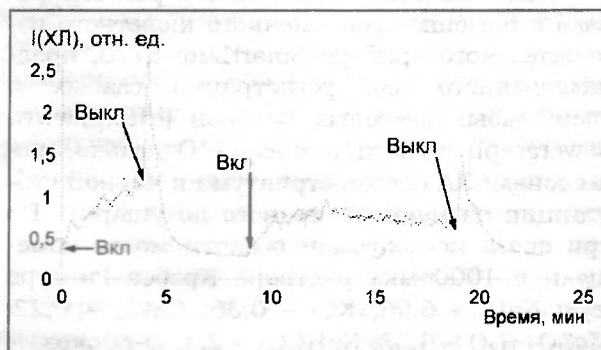


Рис. 3. Влияние режима аэрации на интенсивность ХЛ срезов стриатума. Стрелками указаны время включения и выключения насоса. Состав системы такой же, как и на рис. 2

Два процесса, от которых зависят интенсивность ХЛ. Хемилюминесценция срезов мозга характеризуется сложной кинетикой, поэтому необходимо выявить ее основные составляющие. Для этого в эксперименте срезы стриатума и черной субстанции

Таблица 1. Интенсивность ХЛ раствора Кребса-Рингера с люцигенином в присутствии и в отсутствие срезов стриатума в условиях аэрации

Условия регистрации ХЛ	$I(XL)_{cp}^*$, отн. ед.
ХЛ срезов через 45 мин при 37 °С в условиях аэрации	$0,50 \pm 0,03$
Контроль 1: ХЛ раствора, из которого убрали срезы	$0,14 \pm 0,01$
Контроль 2: люцигенин в растворе Кребса-Рингера	$0,08 \pm 0,01$

Примечание: $I(XL)_{cp}$ – усредненное значение интенсивности ХЛ за 3 мин; данные получены от срезов правого и левого полушарий трех животных, $n = 6$, $p < 0,001$.

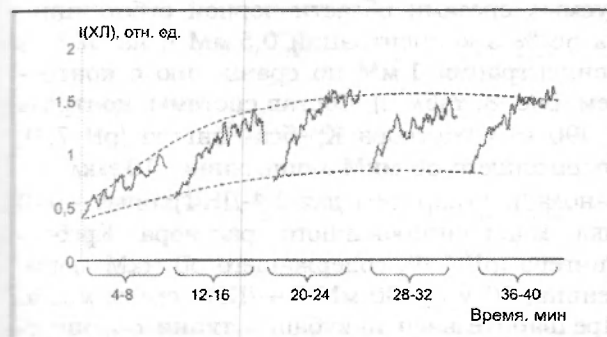


Рис. 4. Развитие ХЛ во времени для срезов стриатума из правого полушария мозга

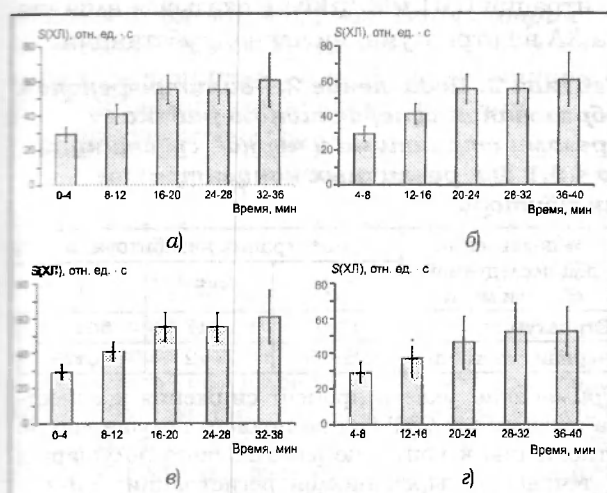


Рис. 5. Воспроизводимость результатов тканевой ХЛ срезов мозга

инкубировали в термостатируемых условиях в течение 4 мин, но без перемешивания, а затем помещали в кювету хемилюминометра и измеряли ХЛ также в течение 4 мин. Эти циклы повторяли несколько раз для одного и того же образца. Кинетика ХЛ во всех циклах эксперимента была аналогичной для стриатума и черной субстанции: за 4 мин регистрации интенсивность свечения увеличивалась примерно в 2 раза; за время последующей инкубации она падала, при этом происходило постепенное увеличение интенсивности в ходе инкубации, на которое накладывались более кратковременные процессы усиления свечения в условиях аэрации (рис. 4). Состав среды: 1000 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, срезы ткани; предварительная инкубация ткани с люцигенином в течение 10 мин. Регистрацию производили периодами по 4 мин, в промежутке между измерением ХЛ (8–12; 16–20; 24–28; 32–40 мин соответственно) кювета находились в термостатированных условиях (37°С) без аэрации. Сигнал обработан в программе PowerGraph 3.3.8 с помощью функции сглаживания (усреднения) по 10 точкам. Таким образом, кинетика ХЛ срезов мозга обусловлена двумя процессами.

Согласно полученным данным, при использовании шести животных ошибка средней лежит в пределах $\pm 25\%$ от измеряемой интенсивности свечения (рис. 5). Здесь состав системы, как и на рис. 2, а и б – стриатум, в и г – черная субстанция; а и в – левое полушарие, б и г – правое полушарие. Аналитический сигнал – суммарная (S) ХЛ за последние 3 мин цикла регистрации, $P = 0,95$, $n = 6$ для всех объектов. По оси абсцисс указан период времени (согласно схеме рис. 1) измерения аналитического сигнала.

Действие ингибиторов. Для выяснения механизма свечения к срезам добавляли различные ингибиторы. Для каждого ингибитора получены данные от срезов правого и левого полушарий (стриатум и черная субстанция) от трех животных. Для выяснения природы радикалов, ответственных за свечение срезов ткани, к срезам стриатума и черной субстанции левого полушария добавляли миметик СОД 519В в концентрации 0,01 мМ и сравнивали люцигенин-активированную ХЛ с ХЛ срезов правого полушария без ингибитора. Измерения проводили по-



очередно, по 4 мин для каждого из полушарий. Добавление СОД-миметика приводило к снижению интенсивности ХЛ — после 16-й минуты регистрации ХЛ снижение составляло 30 % (рис. 6). Условия как на рис. 2, концентрация 519В – 0,01 мМ. Аналитический сигнал – суммарная (S) ХЛ за последние 3 мин цикла регистрации. Таким образом, люцигенин-зависимая ХЛ ткани обусловлена именно супероксидными радикалами.

Для оценки вклада ферментных комплексов митохондрий и цитоплазмы проведены эксперименты с использованием разобщителя окислительного фосфорилирования (2,4-динитрофенол), ингибитора ферментов дыхательной цепи митохондрий (ро-

тенон) и ингибитора железосодержащих ферментов (азид натрия).

Разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол (ДНФ) в концентрации 0,5 мМ снижал ХЛ ткани стриатума на 58 % и в концентрации 1 мМ подавлял на 80 % (рис. 7). На рисунке состав системы: контроль – 990 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл метанола (растворитель для 2,4-ДНФ); опыт: а – действие 1 мМ ДНФ – 990 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл 100мМ 2,4-ДНФ, срезы мозга; б – действие 0,1 мМ ДНФ – 990 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл 10 мМ 2,4-ДНФ, срезы мозга; Предварительная инкубация ткани с люцигенином в течение 10 мин. Стрелкой указан момент добавления ингибитора. Аналитический сигнал – суммарная (S) ХЛ за последние 3 мин цикла регистрации. Ингибитор снижал после 16-й минуты регистрации ХЛ образование радикалов, продуцируемых срезами области черной субстанции, на 56 % в концентрации 0,5 мМ и на 87 % в концентрации 1 мМ по сравнению с контролем (рис. 8, табл. 2). Состав системы: контроль – 990 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл метанола (растворитель для 2,4-ДНФ); опыт – 990 мкл модифицированного раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл 100 мМ 2,4-ДНФ, срезы мозга. Предварительная инкубация ткани с люцигенином в течение 10 мин. Стрелкой указан момент времени добавления ингибитора. В концентрации 0,01 мМ ДНФ не оказывал влияния на ХЛ ни стриатума, ни черной субстанции.

Таблица 2. Подавление 2,4-динитрофенолом образования супероксидного радикала срезами стриатума и черной субстанции ($p < 0,1$ для различных концентраций ингибитора)

% подавления для исследуемой области мозга	Концентрация ингибитора, мМ		
	0,1	0,5	1
Стриатум	19±7	40±7	64±15
Черная субстанция	26±15	38±2	56±25

Примечание: указан процент снижения количества образуемых САР (срезы правого полушария) по отношению к контролю (срезы левого полушария) в течение четырех циклов регистрации; данные получены от срезов правого и левого полушарий трех животных, $n = 3$.

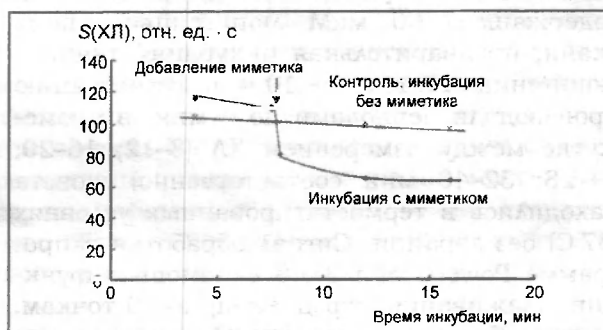


Рис. 6. Влияние миметика СОД 519В на скорость образования супероксидного радикала срезами стриатума

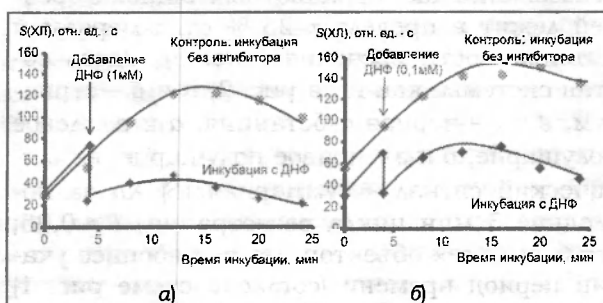


Рис. 7. Действие 2,4-ДНФ на ХЛ срезов стриатума

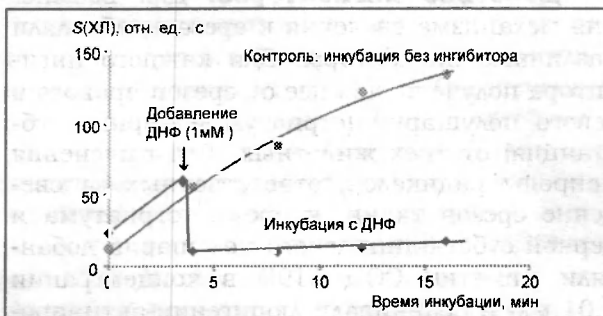


Рис. 8. Действие 1 мМ 2,4-ДНФ на ХЛ области черной субстанции

Ротенон является ингибитором дыхательной цепи митохондрий, препятствующим переходу электронов из железо-серных центров Комплекса I на убинон. Добавление 0,1 мМ ротенона приводило к снижению интенсивности ХЛ тонких срезов стриатума и черной субстанции на 54 и 56 %, соответственно, на 16-й минуте регистрации ХЛ (рис. 9). Состав систем: контроль – 990 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл ДМСО; опыт – 990 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащего 60 мкМ люцигенина, 10 мкл ротенона 10 мМ. Это говорит в пользу того, что большой вклад в образовании САР вносит Комплекс I митохондрии.

Азид натрия является ингибитором мие-лопероксидазы и других гемсодержащих ферментов, в том числе и цитохром с оксидазы (Комплекс IV). NaN₃ даже в концентрации 0,1 мМ не оказывал ингибирующего действия на ХЛ стриатума и черной субстанции (табл. 3).

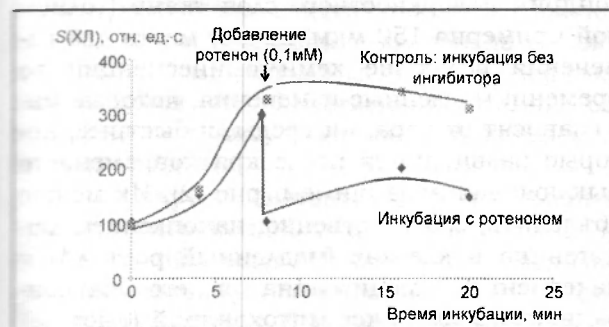


Рис. 9. Действие 0,1 мМ ротенона на ХЛ срезов стриатума

Таблица 3. Влияние 0,1 мМ азид натрия на образование супероксидных радикалов в срезах стриатума и черной субстанции ($p > 0,05$ между контролем и опытом для каждой структуры)

Структура	S (ХЛ-контроль) *, отн. ед.	S (ХЛ-опыт) отн. ед.
Стриатум	880±40	880±40
Черная субстанция	230±40	210±10

Примечание: * – суммарная интенсивность ХЛ за четыре цикла (12 мин); контроль – срезы мозга левого полушария в 1000 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащем 60 мкМ люцигенина; опыт – срезы мозга правого полушария в 1000 мкл раствора Кребса-Рингера (рН 7,4), содержащем 60 мкМ люцигенина и 0,1 мМ азид натрия; данные получены от срезов правого и левого полушарий трех животных, $n = 3$.

Изменение ХЛ срезов мозга на модели паркинсонизма.

Моделирование паркинсонизма на животных является важным инструментом для изучения патогенеза и разработки стратегии лечения болезни Паркинсона. В работе использована экспериментальная модель ранней симптомной стадии паркинсонизма, разработанная в лаборатории гормональной регуляции Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН совместно с коллегами из других институтов [32, 33].

Для исследования образования свободных радикалов в ткани мозга на модели паркинсонизма использовали две пары мышей. В каждой паре одно животное было интактным (контроль), другому моделировали токсин-индуцированный паркинсонизм (см. выше). Регистрировали люцигенин-активированную ХЛ срезов стриатума и черной субстанции из правого и левого полушарий в условиях аэрации как описано выше (см. рис. 1).

Наблюдалось уменьшение образования САР в модели паркинсонизма по сравнению с контролем для стриатума (рис. 10, а, б) в 1,9 и 1,2 раза для срезов левого и правого полушарий соответственно. В случае черной субстанции — увеличение образования САР для правого полушария в 1,3 раза по сравнению с контролем, а для левого полушария уменьшение в 1,3 раза (рис. 10, в, г). Состав системы, как и на рис. 2. Данные получены для двух пар животных (два опытных и два кон-

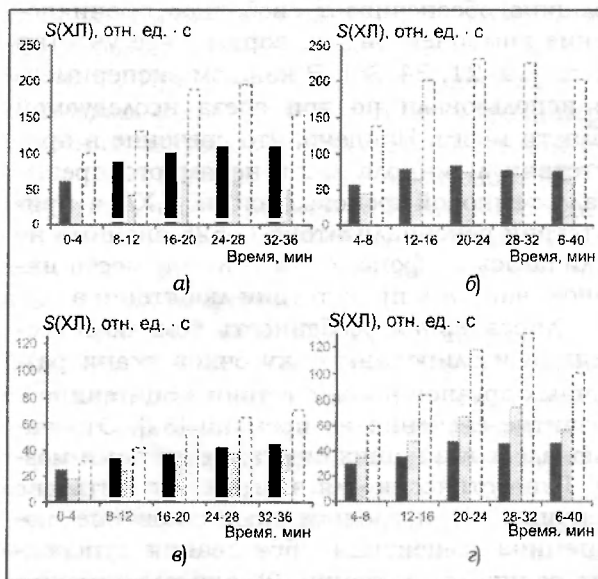


Рис. 10. Увеличение образования радикалов в срезах мозга мышей при паркинсонизме, вызванном введением МФТП



трольных): а, б – данные для срезов стриатума; в и г – для срезов черной субстанции; а, в – данные для левого полушария; б, г – данные для правых полушарий. Темные столбики – усредненные значения для контрольных животных; светлые столбики – усредненные значения для животных после введения МФТП; столбики, обозначенные пунктиром – усредненные значения для животных после введения МФТП, нормированные на количество сохранившихся тел нейронов (57 %) и терминалей (32 %) аксонов дофаминергических нейронов. Срезы мозга для измерения ХЛ приготавливали спустя 14 дней после введения мышам 0,9%-ного раствора NaCl (контроль) и МФТП (опыт). По оси абсцисс указан период времени (согласно схеме рис. 1), в котором измеряли аналитический сигнал.

Обсуждение результатов

Целью данной работы была разработка метода оценки радикалообразующей способности ткани мозга по интенсивности ХЛ. Этот метод является прямым методом определения скорости реакций радикалов, ответственных за ХЛ, и весьма чувствителен при обнаружении именно высокореакционных радикалов в живых тканях.

В работе были использованы срезы головного мозга мышей в области стриатума и черной субстанции толщиной 300 мкм. Такая толщина обеспечивает свободное проникновение компонентов раствора во все участки среза [19, 21, 34–36]. В каждом эксперименте использовали по три среза исследуемой области мозга. Найдено, что свечение в присутствии люминола лишь незначительно превышало темновой фоновый сигнал, ХЛ в присутствии сенсibilизатора С-525 значительно отличалась от фона, однако имела место интенсивная ХЛ в присутствии люцигенина.

Характерная особенность хемилюминесценции изолированных кусочков ткани различных органов в присутствии люцигенина – развитие свечения во времени [32]. Это наблюдалось и в наших опытах со срезами мозга. Гипотетически для этого могут быть две причины: 1) медленное проникновение люцигенина к центрам образования супероксид-радикала в ткани; 2) одноэлектронное восстановление люцигенина Luc^{2+} до катион-радикала Luc^{+} , поскольку именно последний

вступает в реакцию с супероксидным радикалом, которая и приводит к образованию продукта реакции метилакридона в электронно-возбужденном состоянии [18]. Поскольку и сам люцигенин, и его катион-радикал представляют собой липофильные катионы, они должны накапливаться не просто в клетке (с потенциалом $-60...70$ мВ по сравнению с окружающей средой), но преимущественно в матриксе митохондрий (с потенциалом -175 мВ по сравнению с внемитохондриальной средой). Это означает, что основная часть люцигенин-зависимой ХЛ в ткани определяется супероксидными радикалами в матриксе, куда, как известно, поступают радикалы, образующиеся с участием дыхательного Комплекса I в результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, растворенного в среде. Одноэлектронное восстановление люцигенина происходит, скорее всего, и в дыхательной цепи митохондрий. В соответствии с двухэтапным процессом поступления люцигенина в митохондрии поверхностного слоя ткани (толщиной примерно 150 мкм) имеют место два изменения в уровне хемилюминесценции во времени: медленные изменения, которые мало зависят от аэрации среды, и быстрые, которые развиваются после кратковременного выключения аэрации (см. рис. 2). Их можно объяснить, соответственно, накоплением люцигенина в клетках (медленный рост ХЛ) и накоплением люцигенина и его катион-радикала в матриксе митохондрий (быстрый рост ХЛ после кратковременного выключения и последующего включения аэрации).

Однако быстрые изменения ХЛ при включении и выключении аэрации объясняются, разумеется, не только выходом и входом люцигенина из матрикса и в матрикс, а также прямым влиянием концентрации кислорода на скорость образования супероксидных радикалов.

В отсутствие аэрации и перемешивания среды ХЛ тканей, зависящая от люцигенина, не развивается [32]. Выключение пропускания воздуха приводит к сравнительно быстрому исчезновению ХЛ, которому обычно предшествует кратковременная вспышка ХЛ. Причина последней неизвестна; возможно, при обычных концентрациях кислорода интенсивность ХЛ уменьшена в результате кислородного тушения люминесценции возбужденных молекул продукта ХЛ-реакции, и

это тушение снимается при уменьшении концентрации кислорода. Скорость последующего снижения ХЛ в отсутствие аэрации определяется, по всей видимости, скоростью потребления кислорода в среде дышащими клетками. Включение аэрации приводит к быстрому росту свечения. При недостатке кислорода свечение может быть снижено по двум причинам: 1) вероятность перехвата молекулой O_2 электрона, находящегося, по всей вероятности, на флавиновой группе дыхательного Комплекса I в цепи переноса электронов митохондрий, пропорциональна концентрации O_2 в среде, поэтому скорость образования супероксида зависит от концентрации кислорода; 2) падение мембранного потенциала при остановке переноса электронов из-за отсутствия кислорода приводит к снижению концентрации люцигенина в матриксе и снижению интенсивности ХЛ при одной и той же концентрации супероксидных радикалов. Вклад каждого из этих процессов в наблюдаемую зависимость ХЛ от подачи кислорода воздуха оценить сложно, тем более, что содержание кислорода в каждом данный момент времени в слое клеток, находящемся на определенной глубине от поверхности ткани, различно, в зависимости от этой глубины.

В простых системах для выявления вклада супероксидных анион-радикалов в тот или иной процесс, включая ХЛ, используют селективный перехватчик САР — супероксиддисмутаза. В наших опытах СОД не подавляла ХЛ ткани, что свидетельствует об образовании САР внутри клеток, поскольку высокомолекулярный белок СОД не может проникнуть в клетку [37–39]. Напротив, низкомолекулярный миметик СОД, который проникает через мембраны, подавлял ХЛ срезов мозга.

В литературе нет единого мнения о внутриклеточной локализации центров образования супероксидных радикалов. По данным работы [21], основным источником супероксидного радикала в срезах мозга при оксигенации является цитоплазма, а при ре-оксигенации — митохондрии. В изолированных клетках печени за образование супероксида ответственен цитоплазматический фермент ксантиноксидаза [40], а в фагоцитах — НАДФН-оксидаза [41]. Наши результаты по подавлению ХЛ срезов мозга разобщением окислительного фосфорилирования

2,4-динитрофенолом и ингибитором дыхания ротеноном показывают, что в срезах черной субстанции и стриатума генерация САР происходит в митохондриях.

Стандартизация процедуры приготовления срезов и режима измерения ХЛ позволила достичь достаточно хорошей воспроизводимости результатов за счет относительно небольших индивидуальных различий; разброс данных (в пределах $\pm 25\%$) связан с тем, что сама по себе скорость образования радикалов у разных особей может варьировать. У нормальных животных было выявлено различие в интенсивности ХЛ срезов стриатума и черной субстанции. Эти результаты позволили приступить к изучению изменения уровня САР в участках мозга, функции которых нарушаются при болезни Паркинсона и при моделировании паркинсонизма у лабораторных животных. В данной работе было проведено изучение уровня ХЛ срезов стриатума и черной субстанции на 14-е сутки после четырехкратного подкожного введения пронеуротоксина МФТП в дозе 12 мг/кг с 2-часовым интервалом между инъекциями. У этих мышей наблюдалось изменение моторного поведения и структурно-функциональные изменения дофаминергических нейронов, а именно снижение концентрации дофамина в стриатуме на 75 % и уменьшение количества терминалей дофаминергических аксонов на 68 %; в черной субстанции уровень дофамина не изменялся, а количество тел дофаминергических нейронов снижалось на 43 %. При этом содержание дофамина в отдельных сохранившихся телах дофаминергических нейронов возрастало более, чем на 70 %. Это согласуется с данными работ [33] и [42] о том, что на ранней симптомной стадии паркинсонизма у мышей синтез дофамина компенсаторно усиливается как в телах, так и в аксонах нейронов.

Оценка образования САР в срезах мозга показала, что после введения МФТП количество радикалов уменьшилось в стриатуме и черной субстанции левого полушария, а в черной субстанции правого полушария, наоборот, незначительно возросло. Неясно, связано ли это с повреждением митохондрий или с компенсаторной активацией синтеза дофамина. Возможными причинами изменения образования САР после введения МФТП так же могут быть: изменение количества тел



нейронов и терминалей в исследуемой области ткани мозга, изменение активности микроглиальных клеток.

Если предположить, что основной причиной изменения количества образования САР при токсин-индуцированном паркинсонизме является гибель нейронов и терминалей, то следует провести нормирование результатов на количество сохранившихся тел нейронов (57 %) и терминалей (32 %) аксонов дофаминергических нейронов, количество которых оценивали в преддущем исследовании [33] путем подсчета в световом микроскопе на иммуногистохимически окрашенных на тирозингидроксилазу срезах черной субстанции и стриатума. В результате наблюдали увеличение образования САР в модели паркинсонизма по сравнению с контролем как для стриатума (в 1,6 и 2,6 раза для срезов левого и правого полушарий соот-

ветственно), так и для черной субстанции (в 1,4 и 2,3 раза для срезов левого и правого полушарий соответственно). Было также обнаружено, что возрастание образования САР в стриатуме и черной субстанции в правых полушариях намного выше, чем в левом. Эти исследования будут продолжены.

Таким образом, разработана ХЛ-методика оценки радикалообразующей способности ткани мозга, которая характеризуется хорошей воспроизводимостью на интактных мышцах (ошибка средней – в пределах +25 %). Данная методика использована для оценки изменения образования АФК в ранней симптомной стадии токсин-индуцированного паркинсонизма у мышей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2004) и гранта президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Литература

1. Tretter L., Sipos I., Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease // *Neurochem. Res.* 2004. V. 29. № 3. P. 569–577.
2. Olanow C.W., Tatton W.G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // *Annu. Rev. Neurosci.* 1999. V. 22. P. 123–44.
3. Andersen J. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? // *Nat Med.* 2004. V. 10 Suppl. P. S18–S25.
4. Zhou C., Huang Y., Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1147. P. 93–104.
5. Halliwell B. Oxygen radicals and the nervous system // *Trends Neurosci.* 1985. V. 8. P. 22–29.
6. Olanow C. Oxidation reactions in Parkinson's disease // *Neurology.* 1990. 40. № 10. Suppl. 3. P. suppl. 32–37. Discussion 37–39.
7. Olanow C.A. radical hypothesis for neurodegeneration // *Trends Neurosci.* 1993. V. 16. № 11. P. 439–44.
8. Lotharius J., O'Malley K. The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 49. P. 38581–38588.
9. Betarbet R., Sherer T., Greenamyre J. Animal models of Parkinson's disease // *Bioessays.* 2002. V. 24. № 4. P. 308–318.
10. Retz W. Free radicals in Alzheimer's disease // *J. Neural. Transm. Suppl.* 1998. V. 54. P. 221–236.
11. Pappolla M. Alzheimer beta protein mediated oxidative damage of mitochondrial DNA: prevention by melatonin // *J. Pineal. Res.* 1999. V. 27. № 4. P. 226–229.
12. McGeer P. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains // *Neurology.* 1988. V. 38. № 8. P. 1285–1291.
13. Liu B., Gao H., Hong J. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation // *Environ. Health Perspect.* 2003. V. 111. № 8. P. 1065–1073.
14. Zhang Y. Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells // *Carcinogenesis.* 2002. V. 23. № 1. P. 207–211.
15. Sodum R., Chung F. Structural characterization of adducts formed in the reaction of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal with deoxyguanosine // *Chem. Res. Toxicol.* 1989. V. 2. № 1. P. 23–28.
16. Fairbairn D., Olive P., O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review // *Mutat. Res.* 1995. V. 339. № 1. P. 37–59.
17. Владимиров Ю., Проскурнина Е. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии.* 2009. Т. 49. С. 341–388.
18. Adamo A. Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats // *J. Biochem.* 1989. V. 263. № 1. P. 273–277.
19. Sato Y. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. № 3. P. 346–350.
20. Sasaki T. Development of real-time bioluminescence system for functional and metabolic imaging in living brain tissue // *Brain Res.* 2006. V. 1077. № 1. P. 161–169.
21. Sasaki T. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation // *J. Neurosci. Res.* 2011. V. 89. № 4. P. 601–610.
22. Sasaki T. Effects of aging and every-other-day feeding on the levels of oxygen radicals in rat brain slices // *Neurosci. Lett.* 2010. V. 469. № 1. P. 84–87.
23. Sasaki T. Age-related increase of reactive oxygen generation in the brains of mammals and birds: is reactive oxygen a signaling molecule to determine the aging process and life span? // *Geriatr. Gerontol. Int.* 2010. V. 10. Suppl. 1. P. S10–S24.
24. Vladimirov Y. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // *Free Radic. Biol. Med.* 1995. V. 18. № 4. P. 739–745.
25. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах // *Бюллетень экспериментальной биологической медицины.* 2007. Приложение № 2 (Сб. научных трудов, посвященных 25-летию создания НИИ физико-химической медицины). С. 13–20.
26. Владимиров Ю., Проскурнина Е., Измайлов Д. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения

- реакции свободных радикалов // Биофизика. 2011. Т. 56. № 6. С. 1081–1090.
27. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С., Любимский О.Б., Новиков А.А., Измайлов Д.Ю., Осипов А.Н., Тихонов В.П., Казан В.Е. Дигидрокверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза // Биохимия. 2009. Т. 74. № 3. С. 301–307.
 28. Демин Е., Проскурнина Е., Владимиров Ю. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина и квертина в пероксидазных реакциях, катализируемых пектином с // Вестник МГУ. Сер. Химия. 2008. Т. 5. С. 354–360.
 29. Vladimirov Y. Quinolizin-coumarins as physical enhancers of chemiluminescence during lipid peroxidation in live HL-60 cells // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 384. № 1. P. 154–162.
 30. Матвеева Н.С. Активированная люцигенином химилуминесценция тканей животных // Биофизика. 2007. Т. 52. № 6. С. 1120–1127.
 31. Franklin K., Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 3rd edition. San Diego: Academic Press. 2007.
 32. Галиндрова В.Г., Козина Е.А., Кучеряну В.Г., Ермакович Г.Н., Кудрин В.С., Клодт П.Д., Бочаров Е.В., Раевский К.С., Угрюмов М.В. Моделирование прекинической и ранней симптоматической стадий болезни Паркинсона // Журнал неврологии и психиатрии. 2010. № 7. С. 41–47.
 33. Ugrumov M. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
 34. Sasaki T. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds // Aging. Cell. 2008. V. 7. № 4. P. 459–469.
 35. Omata N. Hypoxic but not ischemic neurotoxicity of free radicals revealed by dynamic changes in glucose metabolism of fresh rat brain slices on positron autoradiography // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2000. V. 20. № 2. P. 350–358.
 36. Kondo Y. Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 377. № 1. P. 291–296.
 37. Ohara Y., Peterson T., Harrison D. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. № 6. P. 2546–2551.
 38. Davies G. Mucosal reactive oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease // Gut. 1992. V. 33. № 11. P. 1467–1472.
 39. Davies G. Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo // Gut. 1994. V. 35. № 2. P. 179–185.
 40. Fredericks W., Vreeling-Sindelarova H. Ultra-structural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells // Acta Histochem. 2002. V. 104. № 1. P. 29–37.
 41. van Manen H. Single-cell optical imaging of the phagocyte NADPH oxidase // Antioxid. Redox Signal. 2006. V. 8. № 9–10. P. 1509–1522.
 42. Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Синтез дофамина в нигростриатной системе на доклинической и ранней симптоматической стадиях паркинсонизма у мышей // ДАН. 2011. Т. 440. С. 847–849.

Поступила после доработки 27 августа 2012 г.

ENHANCED CHEMILUMINESCENCE AS A METHOD OF ESTIMATION OF RADICAL-PRODUCING ABILITY OF BRAIN TISSUE

Authors. 2012

A.M. Polimova, G.R. Khakimova, G.K. Vladimirov, T.V. Zhidkova, D.Yu. Izmailov, E.V. Proskurnina, M.V. Ugrumov, Yu.A. Vladimirov

Regeneration of brain neurons in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's diseases, is generally explained by their damage of the cells under the action of free radicals. Meanwhile, there exist very few methods of a direct detection of radicals in isolated life cells and human and animal tissues. The chemiluminescence (CL) in the presence of the sensitizers can be one of them. The aim of this study was to develop a method of study of the radical-producing ability of brain tissue based on recording of lucigenin-sensitized chemiluminescence (CL). The CL of thin slices (300 μ m thick) of brain areas has been studied in C57BL/6 mice: of substantia nigra (SN), the localization point of the bodies of dopaminergic neurons, and striatum, the area of projection of their axons. In order to determine the possible application of the method to comparative analysis of free radical production in norm and disease, normal mice and those with toxin-induced parkinsonism have been investigated. In a chemiluminescent experiment three slices of a certain brain region were placed into a cuvette of a chemiluminometer, stirred and aerated by air current. CL in the presence of luminol, a well-known chemiluminescent probe sensitive to reactive oxygen species, was very weak, while the tissue CL in the presence of lucigenin, a sensitizer enhancing the ultraweak luminescence in the reactions of chain lipid oxidation, was not detectable at all. The lucigenin-sensitized CL was produced solely by brain sections and not by the washing solution. Not any luminescence appeared without stirring and aeration. A superoxide dismutase (SOD) mimetic and oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol inhibited CL in concentrations of 0.1 to 1.0 mM.

In experiments with intact animals, a good reproducibility of results was obtained for both the striatum and SN. The chemiluminescence intensity of these areas was shown to be different. The data of inhibitory analysis have indicated that mitochondria are the major source of SAR in the brain tissue. Our preliminary results show that the method could be applied to investigations of free radical production in pathology. As a model, we used an early symptomatic stage of Parkinson's disease. Two pairs of animals (control and MPTP treated) were taken. Not any significant decrease in SAR production was observed in the experiments in spite of the fact that the amount of life neurons was reported to be severely reduced at this stage of parkinsonism. In our opinion, the developed method of SAR detection in brain slices, where the sensitive photomatrix is used, has an advantage over a very laborious and expensive method with the use of cooled photomatrix.