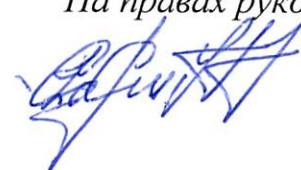


На правах рукописи



Козин Станислав Владимирович

**ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО D/H ОБМЕНА НА ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ**

Специальность 1.5.2 -Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный университет»

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор,
профессор РАН
Барышев Михаил Геннадьевич

Официальные оппоненты: **Лобышев Валентин Иванович**
доктор физико-математических наук,
профессор, Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова,
физический факультет, кафедра биофизики,
профессор

Яглова Наталья Валентиновна
доктор медицинских наук, ФГБНУ НИИ
Морфологии человека им. академика А.П.
Авцына, лаборатория развития эндокринной
системы, заведующая лабораторией

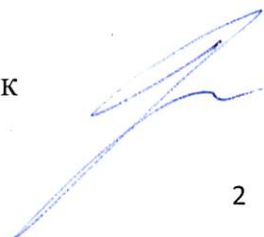
Ведущая организация ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы
народов»

Защита состоится «26» апреля 2022 года в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.2.288.02 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан «25» февраля 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Гипоксия головного мозга является следствием нарушения мозгового кровообращения, сердечной и легочной недостаточности, черепно-мозговой травмы, объемных кровопотерь, снижения кислородной емкости крови и чрезмерных физических нагрузок (Воронина Т. А., 2016, Титов Б. В., 2015). При этом аноксия мозга, вызванная цереброваскулярными нарушениями (инсульт), является наиболее опасной и занимает второе место после онкологических заболеваний по смертности и несет экономические потери за счет инвалидизации трудоспособных слоев населения (Sasaki N., 2019). Это создает актуальность поиска новых эффективных способов повышения резистентности организма с целью профилактики гипоксических состояний и коррекции постгипоксических изменений в мозге.

Основными патологическими процессами при недостатке кислорода в тканях головного мозга являются дефицит макроэргических соединений, ацидоз, глутаматная и кальциевая эксайтоксичность, а также гиперпродукция АФК и азота (Ветровой О.В., 2017). Эти явления способствуют развитию процессов перекисного окисления липидов, нарушению целостности цитоплазматической мембраны и мембраны органоидов клеток головного мозга, что приводит к апоптозу и некрозу нервной ткани (Fricker M., 2018). Когнитивные функции связаны с интегративной работой разных отделов головного мозга. Когнитивная недостаточность может развиваться как при локальной, так и при объемной дисфункции клеток головного мозга. Поэтому одной из серьезных проблем постгипоксических состояний головного мозга является нарушение когнитивных способностей человека и развитие тревожных состояний (Kalaria Raj N., 2016).

Существует несколько способов коррекции постгипоксических состояний, применяемых в современной медицине. Один из них направлен на поддержание антиоксидантной системы организма (Воронина Т. А., 2016). Другие направлены на сохранение кальциевого гомеостаза в нейронах и на усиление синаптической пластичности нервных клеток, оказывая ноотропный эффект (Шустов Е. Б., 2016). Как правило, для устранения последствий гипоксических состояний в головном мозге применяется комплексное медикаментозное лечение. При этом некоторые применяемые в клинической практике препараты не оказывают необходимого терапевтического действия и имеют побочные эффекты (Сергеев Д.В., 2011; Завалий Л.Б., 2018).

Актуальной задачей медицины и биологии является разработка новых эффективных и безопасных нейропротекторных средств, способствующих увеличению резистентности головного мозга к гипоксическим состояниям разной этиологии (Бурчинский С. Г., 2016).

Содержание дейтерия в природной воде составляет 150 ppm. Вода, в которой содержание дейтерия ниже природного значения – обедненная дейтерием вода (ОДВ). На сегодняшний день в научной литературе имеются данные о влиянии низких концентраций дейтерия на метаболические процессы в клетках и тканях млекопитающих. Уменьшение концентрации дейтерия в организме

животных способствует усилению его антиоксидантных и антитоксических функций (Басов А. А., 2015; Rehasova R., 2016; Rasooli A., 2016; Джимак С. С., 2019). Изменение баланса между дейтерием и протием во внутренней среде положительно влияет на стрессоустойчивость и уровень тревожности лабораторных животных при действии продолжительных стресс-факторов (Strekalova T., 2015), а также способствует улучшению референтной памяти (Mladin S., 2014). Между тем остается открытым вопрос о механизмах реализации данных эффектов, вызванных направленным изотопным обменом D/H в жидких средах и тканях организма.

Таким образом, актуальной задачей представляется изучение влияния изотопного D/H обмена на физико-химические процессы в тканях головного мозга крыс в эксперименте при отсутствии и в условиях действия стрессовых реакций, а также анализ возможности применения, направленного изменения изотопного D/H состава в организме животных, для профилактики и коррекции постгипоксических состояний.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы являлось изучение антигипоксического эффекта и механизма его реализации, вызванного направленным изменением изотопного D/H состава в организме лабораторных животных.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Оценить интенсивность окислительных процессов и антиоксидантного статуса в тканях головного мозга крыс в условиях нормоксии и моделирования острой гипоксии при предварительном потреблении воды с концентрацией дейтерия 50 ppm.

2. Исследовать влияние потребления лабораторными животными питьевого рациона с модифицированным изотопным D/H (50 ppm) составом на уровень тревожности и обучение крыс при нормоксии и в условиях острой гипоксии.

3. Изучить воздействие модификации изотопного D/H состава среды на выживаемость нейронов в норме и в условиях стресса в экспериментах *in vitro*.

4. Оценить содержание ионов кальция и продукцию активных форм кислорода в цитозоле нейронов при действии низких концентраций дейтерия.

5. Оценить мембранный потенциал митохондрий и электрическую активность нейронов в среде с низкой концентрацией дейтерия.

6. Изучить кинетико-термодинамические параметры ферментативной реакции в среде с модифицированным изотопным составом; оценить влияния среды с низкой концентрацией на структуру белков.

Научная новизна. Впервые показано, что снижение концентрации дейтерия в головном мозге оказывает антигипоксический эффект. Установлено, что продолжительное предварительное применение ОДВ в течение шести недель уменьшает развитие окислительного стресса и нормализует работу ферментов антиоксидантной защиты в тканях головного мозга после острой гипоксии. Выявлено, что уменьшение концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга на фоне продолжительного применения ОДВ, уменьшает уровень тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте и увеличивает время

выполнения условно-рефлекторной реакции в Т-лабиринте у крыс, подвергшихся острой гипоксии.

Впервые получены экспериментальные данные о влиянии низких концентраций дейтерия на культуру нейронов мозжечка. Установлено, что инкубация культуры нейронов мозжечка в питательной среде с пониженным содержанием дейтерия, оказывает дополнительное цитотоксическое действие, увеличивая гибель нейронов при ГД и температурном стрессе. Также показано, что помещение нейронов мозжечка в среду с низкой концентрацией дейтерия приводит к уменьшению митохондриального потенциала, снижению ионов кальция и продукции активных форм кислорода в цитозоле нейронов мозжечка.

Впервые изучено действие низких концентраций среды на каталитические функции пероксидазы хрена в двух модельных системах.

Практическая значимость. Полученные данные о воздействии низких концентраций дейтерия на интенсивность окислительных процессов и антиоксидантный статус тканей головного мозга крыс, а также на когнитивные функции животных в условиях гипоксии при продолжительном приеме ОДВ свидетельствуют о возможном применении модификации изотопного состава среды организма для повышения его резистентности. Это дает основание использовать ОДВ в качестве профилактического средства в развитии нейродегенеративных процессов, сопровождающихся оксидативным стрессом и функциональными расстройствами центральной нервной системы. По результатам экспериментальной работы был получен патент «Способ профилактики и коррекции метаболических и функциональных нарушений центральной нервной системы в условиях стресса» (№271707). Вместе с тем, полученные результаты исследований *in vitro* могут быть использованы для понимания механизмов, объясняющих эффекты высоких и низких концентраций дейтерия в биологических объектах.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, представлены на IX Всероссийской конференции с международным участием «Спектроскопия координационных соединений» (Туапсе, 2012), XII научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2017), VI съезде биофизиков России (Сочи, 2019), на VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2019).

Публикации. Основные результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, изложены в 14 публикациях, 7 из которых входят в перечень журналов ВАК, которые также включены в систему Scopus и Web of Science.

Положения, выносимые на защиту:

1. Предварительное снижение концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга на фоне продолжительного потребления лабораторными животными питьевого рациона с модифицированным изотопным D/H составом оказывает антиоксидантный и антиамнестический эффект после перенесенной

острой гипоксии, а также умеренно анксиолитический эффект в условиях нормоксии.

2. Снижение концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга на фоне непродолжительного потребления лабораторными животными питьевого рациона с модифицированным изотопным D/H составом оказывает прооксидантный эффект как в норме, так и на модели острой гипоксии.

3. Инкубация культуры нейронов мозжечка в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm усиливает цитотоксическое действие глюкозной депривации и температурного стресса, приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий, уменьшению уровня кальция и снижению продукции активных форм кислорода в цитозоле. Инкубация срезов гиппокампа в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm приводит к уменьшению электрической активности нейронов гиппокампа.

4. Среда с концентрацией дейтерия 50 ppm приводит к снижению скорости пероксидазного окисления о-дианизидина и люминола в модельных системах пероксидазой хрена, не затрагивая структурных изменений в активном центре фермента. Среда с концентрацией дейтерия 50 ppm не оказывает влияние на вторичную структуру пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 133 страницах, состоит из введения, литературного обзора, методической части, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Иллюстративный материал включает 17 рисунков и 6 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и материалы исследования: Объектом исследования была модифицированная по изотопному составу вода с концентрацией дейтерия 50 ppm. В работе использовали крыс линии Вистар разной возрастной категории в зависимости от вида исследований. Поведенческие тесты и биохимические исследования были выполнены на 3 - х месячных самцах крыс массой 280 - 310 грамм. Для проведения экспериментов на культуре тканей использовали 7 - 9 дневных крысят, родившихся от самок 5 - 6 месяцев.

Электрофизиологические исследования были проведены на самцах крыс в возрасте 5 - 6 недель массой 100 - 150 грамм.

Биохимические эксперименты проводились на 56 крысах, которые были разделены на 8 групп: группа 1А - интактные крысы (n=7), 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 (n=7), 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 (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение двух недель; группа 3 - крысы (n=7), которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение двух недель, при этом, на 15 день эксперимента им моделировали острую гипоксию; группа 4 - крысы (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение двух

недель, при этом, на 15 день эксперимента им моделировали острую гипоксию; группа 5 - крысы (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель; группа 6 – крысы (n=7), которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, при этом, на 43 день эксперимента им моделировали острую гипоксию; группа 7 - крысы (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, при этом, на 43 день эксперимента им моделировали острую гипоксию.

Через сутки после моделирования гипоксии под общей анестезией у крыс проводили декапитацию (группы 1А, 2, 3, 4- на 15 сутки; группы 1В, 5, 6, 7 на 43 сутки эксперимента), после чего головной мозг извлекали и помещали в жидкий азот. Из тканей мозга готовили супернатант. Концентрацию МДА и СРО измеряли во всех группах животных. Активность каталазы, СОД, ГР, ГП, а также уровень восстановленного глутатиона изучали только в группах 1В, 5, 6, 7.

Для изучения поведенческих реакций использовали 28 животных, разделенных на 4 группы: группа 1 (контроль) - интактные крысы (n = 7), получавшие в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, без гипоксического воздействия; группа 2 - крысы (n = 7), получавшие в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, без гипоксического воздействия; группа 3 - крысы (n = 7), получавшие в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, на 43 день эксперимента подвергались острой гипоксии; группа 4 - крысы (n = 7), получавшие в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, на 43 день эксперимента подвергались острой гипоксии.

Поведенческие исследования животных оценивали с помощью тестов «приподнятый крестообразный лабиринт» и «Г-образный лабиринт» на следующий день после гипоксии. Гипоксию моделировали путем помещения крыс в герметичный сосуд объемом 1 литр. Животные находились под постоянным наблюдением до первого агонального вздоха (Новиков В.Е., 2012; Карпова И.В., 2014).

Эксперимент с определением концентрации дейтерия в сыворотке и ткани мозга был выполнен на 66 крысах по следующей схеме. Животных разделили на две группы: 1 группа (n=33) - крысы, которые получали воду с природным содержанием дейтерия (150 ppm); 2 группа (n=33) - крысы, которые получали ОДВ. Из каждой группы выводили по 3 крысы каждый день в течение недели, затем на 10, 15, 21, 40 и 56 сутки для забора крови путем декапитации. Из полученной крови готовили сыворотку и определяли в ней концентрацию дейтерия. На 42 день эксперимента извлекали головной мозг и подвергали его лиофильной сушке для дальнейшего определения содержания дейтерия в нем.

Структурные исследования были выполнены для пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина.

Определение концентрации дейтерия в сыворотке и тканях мозга. Сыворотку изучали на ЯМР Фурье – спектрометре 400 МГц (FT NMR SYSTEM модели JNM-ECA 400) по следующей методике (Dzhimak S.S., 2015), а ткани на

масс-спектрометре DELTA^{plus} (Finnigan, Германия) с расчетом содержания дейтерия по методике (Baryshev M. G., 2012).

Изучение свободнорадикальных процессов. Интенсивность окислительных процессов в тканях головного мозга изучали методом хемилюминесцентного анализа и ТБК - тестом. Хемилюминесцентный анализ проводили с помощью аппаратно-программного комплекса "Хемилюминометр Lum-5773" и специализированного программного обеспечения "PowerGraph 3.x Professional" с определением интегрального показателя – светосуммы. Инициация свечения (окисления) производилась добавлением 30 мкл раствора сернокислого железа (Фархутдинов Р.Р., 1995). Определение концентрации МДА проводили по интенсивности поглощения окрашенного комплекса, полученного при взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой, при длине волны 535 нм (Гаврилов В.Б., 1987).

Определение активности ферментов антиоксидантной системы определяли спектрофотометрическим способом. В основе метода определения активности каталазы лежит способность пероксида водорода с молибдатом аммония образовывать окрашенный комплекс с максимумом поглощения 410 нм (Королюк М.А., 1988). Активность СОД в тканях мозга определяется способностью нитротетразолиевого синего в ходе конкурентной реакции с ферментом образовывать с супероксид анион радикалом гидразидтетразолий, фиксируемый при 540 нм (Дубинина Е. Е., 1988). Об активности ГП судили по изменению оптической плотности при 412 нм оставшегося GSH, окисляемого ГП (Моин В.М., 1986). Мерой активности ГР являлась скорость окисления НАДФН, регистрируемая по уменьшению поглощения восстановленной формы НАДФН при 340 нм (Юсупова Л.Б., 1989).

Содержание белка в пробе определяют методом Лоури с использованием коэффициента, рассчитанного по графику, построенному по калибровочному раствору человеческого сывороточного альбумина по следующей методике (Филиппович Ю.Б., 1982).

Определение компонентов не ферментативной антиоксидантной системы оценивали только по GSH. Его количество определяли с помощью реакции взаимодействия GSH с 5 5'- дитио- бис (2-нитробензойной кислотой) с образованием окрашенного продукта с максимумом поглощения 412 нм (Sedlak J., 1968).

Поведенческие исследования животных. Уровень тревожности крыс определяли количеством заходов в закрытые и открытые рукава, числом свешиваний и груминга в тесте «ПКЛ», а когнитивное состояние ЦНС животных оценивали в «Т - образном лабиринте» по числу правильных заходов и времени выполнения реакции.

Культуральные исследования были проведены на первичных культурах нейронов мозжечка, полученных методом ферментно-механической диссоциации с последующей недельной инкубацией в питательной среде, содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки и среду Игла (90 %) (Викторов И.В., 1988). Для изучения функциональной активности нейронов мозжечка были использованы

следующие флуоресцентные зонды: для обнаружения АФК в культуры добавляли дегидрородамин 123, а для определения уровня МПМ-тетраметилродамин, для обнаружения $[Ca]^{2+}$ -Fluo4 (Исаев Н.К., 2008; Генрихс Е.Е., 2017). Выживаемость нейронов мозжечка при температурном стрессе и глюкозной депривации оценивали с помощью флуоресцентного зонда - йодид пропидия (Стельмашук Е.В., 2010).

Электрофизиологический эксперимент. Электрофизиологическую активность изучали на переживающих срезах гиппокампа (Kondratenko R.V., 2003). Активность популяции пирамидных клеток области СА-1 гиппокампа оценивали по изменению амплитуды поп – спайка.

Изучение активности ПХ в модельных системах. Для определения активности ПХ (Sigma) использовали две модельные системы. Первая представляет собой реакцию пероксидазного окисления о – дианизидина перекисью водорода (Лебедева О.В., 1977). Вторая модельная система представляет пероксидазное окисление люминола пероксидом водорода, сопровождающееся хемилюминесценцией (Измайлов Д.Ю., 2017).

Оптические исследования структуры белков. Структуру ПХ и БСА (Sigma) изучали оптическими методами. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия). Собственную триптофановую флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 297 нм (Степаненко О.В., 2005), а совместную триптофановую и тирозиновую флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длиной волны 280 нм (Степаненко О.В., 2005). Спектры кругового дихроизма регистрировали на дихрографе Jasco J 810 (Япония) в УФ и видимом диапазоне.

Способ получения ОДВ. Воду с модифицированным изотопным составом по водороду получали на электрохимической установке, разработанной в Кубанском государственном университете на кафедре радиофизики и нанотехнологий (Фролов, 2014).

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙТЕРИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ТКАНЯХ МОЗГА

У крыс, в рационе которых была ОДВ, происходило достоверное снижение концентрации дейтерия в крови. При этом наиболее активное замещение дейтерия на протий в крови опытных животных наблюдалось в течение первой недели.

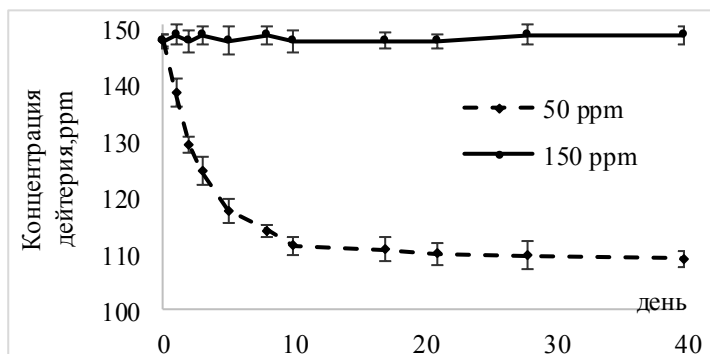


Рис. 1. Динамика изменения концентрации дейтерия в сыворотке крови по дням

В дальнейшем, начиная с 10-х суток и до конца эксперимента, концентрация дейтерия в этой группе животных не изменялась и составила около 110 ppm. При

этом концентрация дейтерия в крови контрольных животных не менялась в течение всего эксперимента и равнялась 147 ppm. Концентрация ^2H в тканях головного мозга интактных животных на 42 день исследования составила 147 ppm, тогда как у крыс, в рационе которых была ОДВ, она достоверно уменьшилась на 19 % и составила 119 ppm. Быстрое понижение концентрации дейтерия в крови является следствием активного замещения ^2H на ^1H в жидких средах организма. Выход графика на плато может означать насыщение крови и лимфы протием и началом активного замещения дейтерия на протий в тканях и органах в условиях созданного изотопного градиента. Снижение концентрации дейтерия в экстрацеллюлярной жидкости и тканях организма происходит вследствие изотопного D/H обмена в белках, липидах и нуклеиновых кислотах, образующих клетки. Известно, что наиболее активно такое замещение происходит в функциональных группах, имеющих неподелённую электронную пару и способных образовывать водородные связи. К таким атомным группировкам относятся гидроксильные (-OH), карбоксильные (-COOH), аминогруппы (-NH₂). По цепочкам водородных связей по механизму Гротгуса реализуется переход протонов и дейтронов от одной биомолекулы к другой. Также активному замещению дейтерия на протий в организме способствует изотопный обмен, реализующийся между данными группами биомолекул и гидратной оболочкой посредством водородных связей. Большинство атомов водорода в биологических системах связаны с атомом углерода. В этих связях изотопный D/H обмен практически невозможен, чем объясняется слабое снижение концентрации дейтерия в тканях и крови животных.

ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА D/H НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В результате проведенных экспериментов было установлено, что продолжительный прием ОДВ (6 недель) у крыс с моделью гипоксии способствует снижению окислительного стресса и нормализации работы ферментативного и не ферментативного звена антиоксидантной системы по сравнению с патологией. Так у этих животных показатель интенсивности ХЛ был достоверно ($p < 0,05$) на 15% меньше, а уровень МДА был так же достоверно ($p < 0,05$) меньше на 33 %, по сравнению с гипоксированными животными, не получавших ОДВ (150+гипоксия-6 нед.). Так же у гипоксированных животных 6 группы (150+гипоксия-6 нед.) было достоверное снижение активности каталазы в гомогенатах мозга крыс на 27%, при отсутствии достоверных изменений в сравнении с контролем в группе 7. В то же время, активность СОД была повышена значительно сильнее в группе 6 по сравнению с контрольной и 7 группой (на 32,9% и 16,8% соответственно). Что касается животных, потреблявших ОДВ в течение 6 недель без гипоксического воздействия, то их показатели интенсивности свободнорадикального окисления и активности ферментов первого звена антиоксидантной защиты были на уровне контрольных значений. У животных, подвергшихся гипоксии (группа 6 и 7) наблюдалось повышение активности ГП (на 108,5% и 45,8%) и ГР (на 12,3% и 13,8%) в

сравнении с контрольной группой 1 (таблица 1), что указывает на значительное напряжение функционирования ферментов тиолового цикла с более оптимальным соотношением активности ГП и ГР у крыс, потреблявших воду с концентрацией дейтерия 50 ppm. У крыс 6 группы существенный дисбаланс в работе ферментов антиокислительной защиты проявлялся наибольшим уменьшением содержания, восстановленного глутатиона по сравнению с контрольной группой и 7 группой (на 13% и 30%). При этом у животных 5 группы существенных различий в работе глутатионовой системы выявлено не было. Таким образом, продолжительный прием ОДВ в течение шести недель, оказал антиоксидантный эффект в тканях головного мозга после перенесенной острой гипоксии.

Крысы, которые получали ОДВ в течение 2-х недель, имели самые высокие показатели уровня СРО и МДА. Так в группе 4 (50+гипоксия -2 нед.) интенсивность свечения ХЛ и уровень МДА были достоверно ($p < 0,05$) выше на 23 % и 6 % по сравнению с группой 3 (150+гипоксия-2 нед.).

Таблица 1. Показатели окислительного стресса в тканях головного мозга крыс

Группа животных	Интегральный показатель СРО под кривой графика ХЛ, у.е.	Концентрация МДА, нмоль/мг
Группа 1А (150 ppm-2 нед.)	54,8±2,0	2,1±0,1
Группа 1В (150 ppm-6 нед.)	55,6±2,3	1,9±0,1
Группа 2 (50 ppm-2 нед.)	81±2,6*	2,8±0,2*
Группа 3 (150 ppm+ОГ-2 нед.)	75,4±3,0*	2,9±0,1*
Группа 4 (50 ppm+ОГ-2 нед.)	92,9±2,1*	3,1±0,3*
Группа 5 (50 ppm-6 нед.)	48,3±2,9	1,9±0,2
Группа 6 (150 ppm+ОГ-6 нед.)	72,2±4,0*	2,7±0,3*
Группа 7 (50 ppm+ОГ-6 нед.)	61,4±2,8*#	1,8±0,1#

Примечание: Данные представлены $M \pm m$; * - $p < 0,05$ к группе 1; # - $p < 0,05$ к группе 6

В этой же группе светосумма хемилюминесценции и концентрация МДА была больше на 29 % и 15 % по сравнению с группой 6 (150+гипоксия-6 нед.) и на 51 % и 72 % в сравнении с группой 7 (50+гипоксия-6 нед.). Животные группы 2 (50-2 нед.) не подвергались гипоксическому воздействию, тем не менее, их показатели уровня СРО и МДА были относительно высокими. Между группами 3 (150+гипоксия-2 нед.) и 6 (150+гипоксия-6 нед.) не было достоверного отличия. Таким образом, менее продолжительный прием ОДВ в течение двух недель способствовал развитию прооксидантного эффекта на фоне перенесенной гипоксии, так и в условиях нормоксии. Снижение концентрации дейтерия в организме, приводит к нарушению гомеостатического равновесия и развитию стрессовой реакции. В свое время еще Г. Селье высказывал предположение, что если действие стрессора адекватно и не превышает потенциал стресс-лимитирующих систем, то происходит включение неспецифических механизмов приспособления и усиление компенсаторных функций (Селье, 1979). В результате у организма вырабатывается устойчивость к данному стрессору, а также и

стрессорам иной природы. Такое явление в адаптационной медицине называется кондиционирование (Меерсон, 1993). Например, в результате ишемического прекондиционирования происходит выработка резистентности к острой гипоксии при предварительном действии неоднократных умеренных актов гипоксии или при предварительном введении низких концентраций ЛПС, вызывающих умеренную воспалительную реакцию (Баранова, 2017). Если все же действие стрессора чрезмерно, то происходит не обратимое истощение стресс-лимитирующих систем организма, приводящая к его гибели. Мы предполагаем, что в нашей работе вызванный изотопный D/H обмен в организме (как между потребляемой водой и плазмой, так и между плазмой крови и тканями органов) являлся таким умеренным стрессором, запускающим комплекс адаптивных реакций. На начальных этапах изотопный обмен действительно приводит к усилению окислительных процессов, а также снижению массы животных (Джимак, 2015), однако, при более продолжительном воздействии изотопного D/H обмена данные показатели выравнивались до контрольных значений, ни одно животное в эксперименте не погибло, следовательно, снижение концентрации дейтерия в организме можно оценивать, как адекватную стрессовую реакцию организма. В литературе такое явление получило название «изотопного шока» (Basov, 2019). В более поздних сроках поения происходило завершение адаптации к данной стрессовой реакции и активация защитных систем к действию другого стрессора в нашем случае - гипоксии, заключающаяся в мобилизации энергетических и структурных ресурсов, активации факторов транскрипции и как следствие увеличение синтеза ряда защитных белков и ферментов, изменение активности рецепторов и т.д. (Ветровой, 2017). Таким образом, животные группы 4 подверглись не только гипоксическому воздействию, но еще и дополнительному стрессу за счет изотопного D/H обмена, что и привело к повышенному образованию свободных радикалов.

Таблица 2. Показатели активности глутатионовой системы и активности ферментов 1 линии антиоксидантной защиты в тканях головного мозга крыс

Показатель	Группа 1В- контроль	Группа 5 (50 - 6 недель)	Группа 6 (150+ОГ-6 недель)	Группа 7 (50+ОГ-6 недель)
Каталаза	15003±2549	15352±1534	10996±1718*	15581±1292#
СОД	42±11	40±10	55±11	47±9
ГР	65±13	62±11	73±11	74±10
ГП	59±8	61±10	123±16*	86±12*#
GSH	1,21±0,16	1,22±0,1	1,05±0,05*	1,49±0,07*#

Примечание: Данные представлены M±m; *- p <0,05 к группе 1; # - p <0,05 к группе 6

АНКСИОЛИТИЧЕСКИЙ И АНТИАМНЕСТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ, ВЫЗВАННЫЙ ВЛИЯНИЕМ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА D/H В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

Исследование влияния изотопного D/H обмена в тканях головного мозга и жидких средах организма, на фоне продолжительного применения ОДВ, на

выработку условного рефлекса с положительным подкреплением у крыс в условиях нормы и гипоксии в Т-образном лабиринте (рис. 2) показало, что ОДВ в норме не оказывало влияния на обучаемость животных. Число правильных побегов в группе 2 (50-6 нед.) во все дни обучения практически не отличалось от таковых в контроле. Количество совершенных ошибок у животных группы 3 (150+гипоксия-6 нед.) в первые три дня было выше чем в контроле, и только на четвертый день процент правильных побегов практически не отличался от интактных животных. В то время как в группе 4 (50+гипоксия-6 нед.) число правильных побегов во все дни исследования находилось на уровне контроля (группа 1) при этом в первый день оно достоверно превышало таковое в группе 3 (150+гипоксия-6 нед.).

Кроме того, в группе 3 (150+гипоксия-6 нед.) (рис. 3) наблюдались выраженные отличия и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции. Так, несмотря на то, что в первый день обучения у всех животных время принятия решения было самым длительным, в группе 3 (150+гипоксия-6 нед.) оно достоверно превышало (на 66,7%) таковое в контрольной группе и на 52,7% в группе крыс, получавших воду с пониженным содержанием дейтерия (50-6 нед.) и подвергнутых гипоксии (группа 50 ppm).

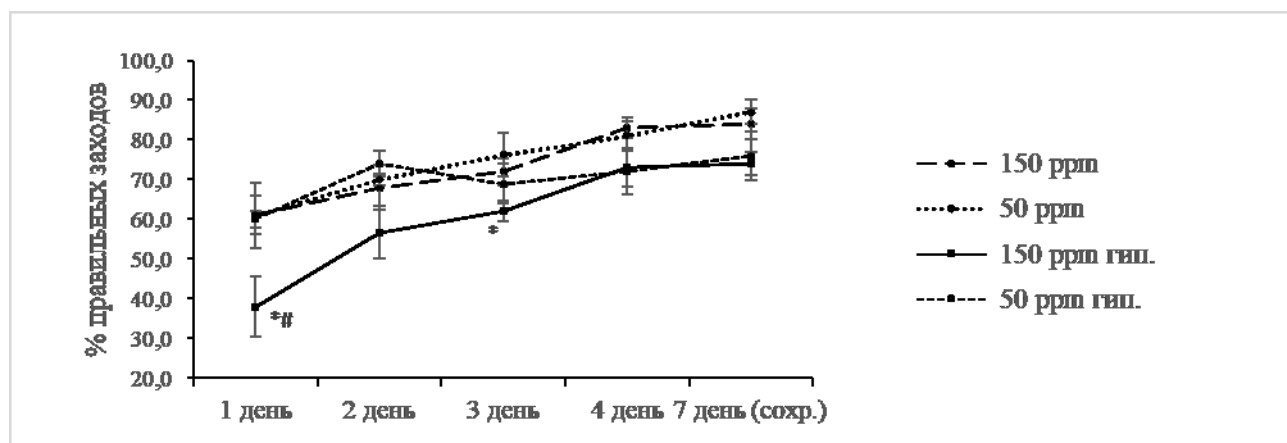


Рис. 2. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) в норме и при воздействии гипоксии на % правильных побегов в тесте «Т-образный лабиринт».

* - $p < 0.05$ в сравнении с группой «150 ppm», # - $p < 0.05$ - в сравнении с «150 ppm, гипоксия»
Данные представлены в виде $M \pm m$

И, хотя время принятия решения с каждым днём постепенно сокращалось во всех группах, в группе 3 оно было более длительным, чем в контроле (с 1 по 3 день), и достоверно более продолжительным, чем в группе 4 (1 и 3 дни). И только на четвертый день обучения время выполнения условно-рефлекторной реакции во всех группах практически не отличалось от контроля. Через 2 суток после окончания обучения у всех животных сохранились навыки условно-рефлекторной реакции двустороннего чередования право- и левосторонних побегов, при этом существенных отличий между группами не было. Не было отличий и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции.

Таким образом, установлено, что длительное применение ОДВ в норме не оказывало влияния на обучаемость животных, в то время как применение её до гипоксического воздействия (воздействие амнезирующего фактора)

способствовало сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т.е. оказывало умеренный антиамнестический эффект.

Изучение влияния воды с модифицированным (D/H) изотопным составом на тревожность крыс в нормальных условиях и после воздействия гипоксии в тесте ПКЛ показало, следующие результаты. Уровень двигательной активности (количество заходов в закрытые и открытые рукава лабиринта, время нахождения в закрытых рукавах и центре), а также уровень исследовательской активности (количество ориентировочных реакций, количество свешиваний) в этих группах животных (150+гипоксия, 50+гипоксия) достоверно не отличались от интактных животных.

У животных 2 группы (50-6 нед.) значения данных показателей были достоверно ниже, чем у интактных животных. Таким образом, вызванный изотопный D/H обмен в тканях головного мозга, на фоне длительного применения ОДВ, оказал умеренный анксиолитический эффект.

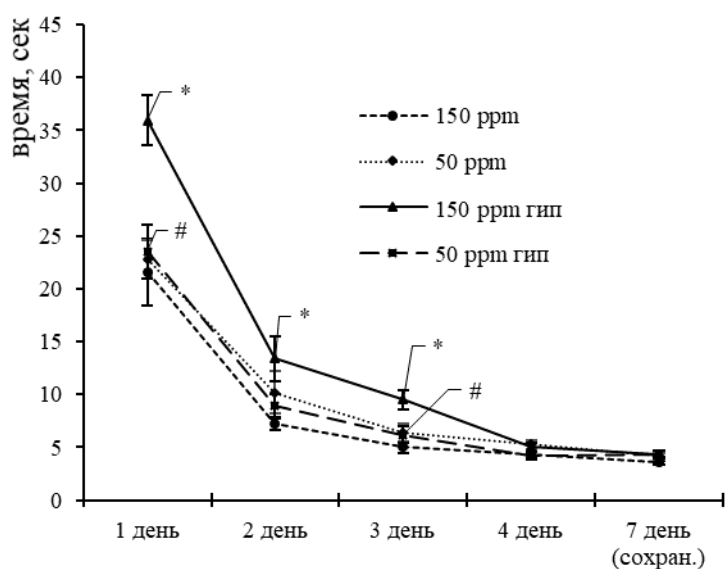


Рис.3. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) на время выполнения условно-рефлекторной реакции в тесте «Т-образный лабиринт».

* - $p < 0.05$, по сравнению с группой «контроль», # - $p < 0.05$ - «50 ppm, гипоксия» в сравнении с «150 ppm, гипоксия». Данные представлены в виде $M \pm m$

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VITRO*

Инкубация нейронов в среде с низкой концентрацией дейтерия (50 ppm) приводила к достоверному снижению интенсивности свечения дигидрорадамина 123 при концентрациях сукцината 25, 50, 100 и 200 мкМ, что свидетельствовало о снижении продукции активных форм кислорода в цитозоле клеток. МПМ, измеренный с помощью TMRE, после тридцатиминутной инкубации в среде, приготовленной на ОДВ, достоверно увеличивался на 3 % по сравнению с контрольной средой. Последующая инкубация нейронов мозжечка в инкубационном растворе с низкой концентрацией дейтерия способствовала уменьшению МПМ. Так наименьшая светимость зонда наблюдалась через 1 час и 16 часов инкубации на 6 и 8 % соответственно ($p < 0.05$). Относительная концентрация ионов кальция в цитоплазме нервных клеток также достоверно уменьшалась через 1, 2, 4 и 16 часов после инкубации ($p < 0.05$) в ИСР, приготовленном на ОДВ (рис. 4). Максимальное снижение наблюдалось через час инкубации (на 22%), при дальнейшем воздействии концентрация ионов кальция значительно не изменялась, и уменьшилось в среднем на 15%. Глюкозная

депривация (ГД) вызывала гибель нейронов мозжечка вне зависимости от концентрации дейтерия в среде. Уровень гибели нейронов в среде с природным содержанием дейтерия (группа 150+ГД) был на 18% ниже ($p < 0,05$), чем в среде с пониженным содержанием дейтерия (группа 50+ГД). Кроме того, в культурах, помещенных в среду с пониженным содержанием дейтерия и не подвергшихся ГД (группа 50), уровень гибели нейронов был на 9% выше, чем в культурах, помещенных в среду с природным уровнем дейтерия. Таким образом, среда с пониженным содержанием дейтерия оказывала дополнительное стрессорное воздействие на культуру нейронов мозжечка, что проявлялось в повышении гибели нейронов, как при ГД, так и в её отсутствие.

Анализ результатов экспериментов с температурным стрессом показал, что при температуре 22 °С в целом влияние среды со сниженным содержанием дейтерия на уровень гибели нейронов прослеживается достаточно слабо, и достоверных отличий при соответствующих концентрациях сукцината от среды с естественным содержанием дейтерия нет.

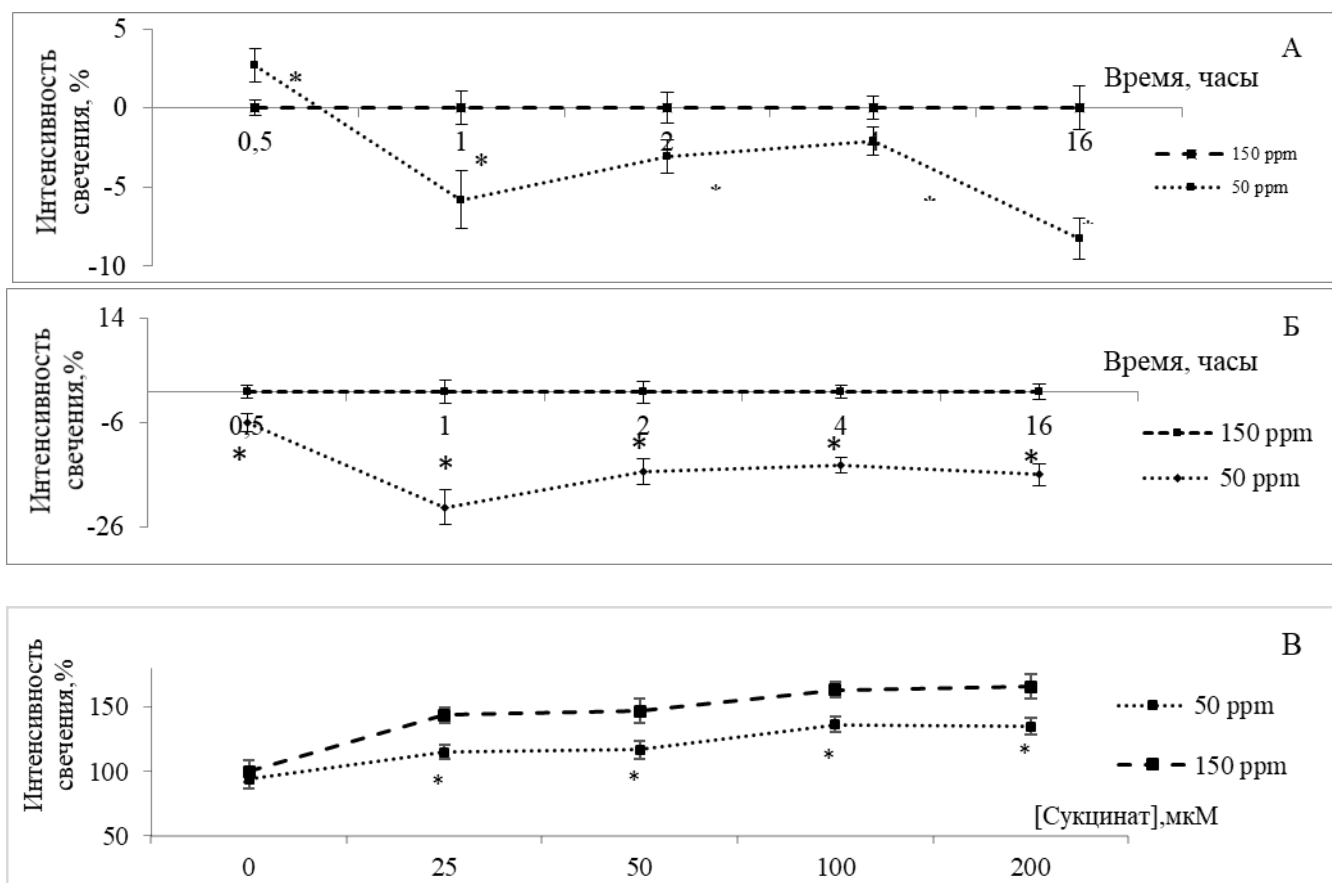


Рис. 4. Влияние среды с различным содержанием дейтерия на интенсивность флуоресцентных зондов. А) значение МППМ в культивируемых нейронах мозжечка крыс; Б) содержание ионов кальция в цитозоле нейронов мозжечка; В) продукция АФК в цитозоле нейронов мозжечка.

Примечание: по оси ординат – интенсивность свечения в %. Данные представлены в виде $M \pm m$ в % от 150 ppm при концентрации сукцината 0 мкМ.

Исключение составила группа с концентрацией сукцината 200 мкМ, когда уровень гибели в среде со сниженным содержанием дейтерия и температуре 22°С

достоверно выше, чем в среде с содержанием дейтерия 150 ppm. Однако, при воздействии температуры 39 °С в культурах, помещённых в среду с концентрацией дейтерия 50 ppm, и концентрациях сукцината 50, 100 и 200 мкМ уровень гибели достоверно выше, чем в культурах, помещённых в среду с концентрацией дейтерия 150 ppm с соответствующей концентрацией сукцината. При сравнении уровня гибели в группах по отношению к контрольной (150 ppm 0 мкМ сукцината) выяснилось, что при 22 °С и 39 °С и возрастающих концентрациях сукцината (50, 100 и 200 мкМ) среда с пониженным содержанием дейтерия способствует повышению гибели нейронов.

Функциональная активность нервной ткани также была изучена нами на переживающих срезах гиппокампа. Результаты электрофизиологических исследований представлены на рис.5. При переключении системы протока с ИСР1, приготовленной на воде с природным содержанием дейтерия (ИСР1) на ИСР2, в составе которого была вода с низкой концентрацией дейтерия (ИСР2), происходило угнетение амплитуды ПС во всех исследуемых срезах гиппокампа.

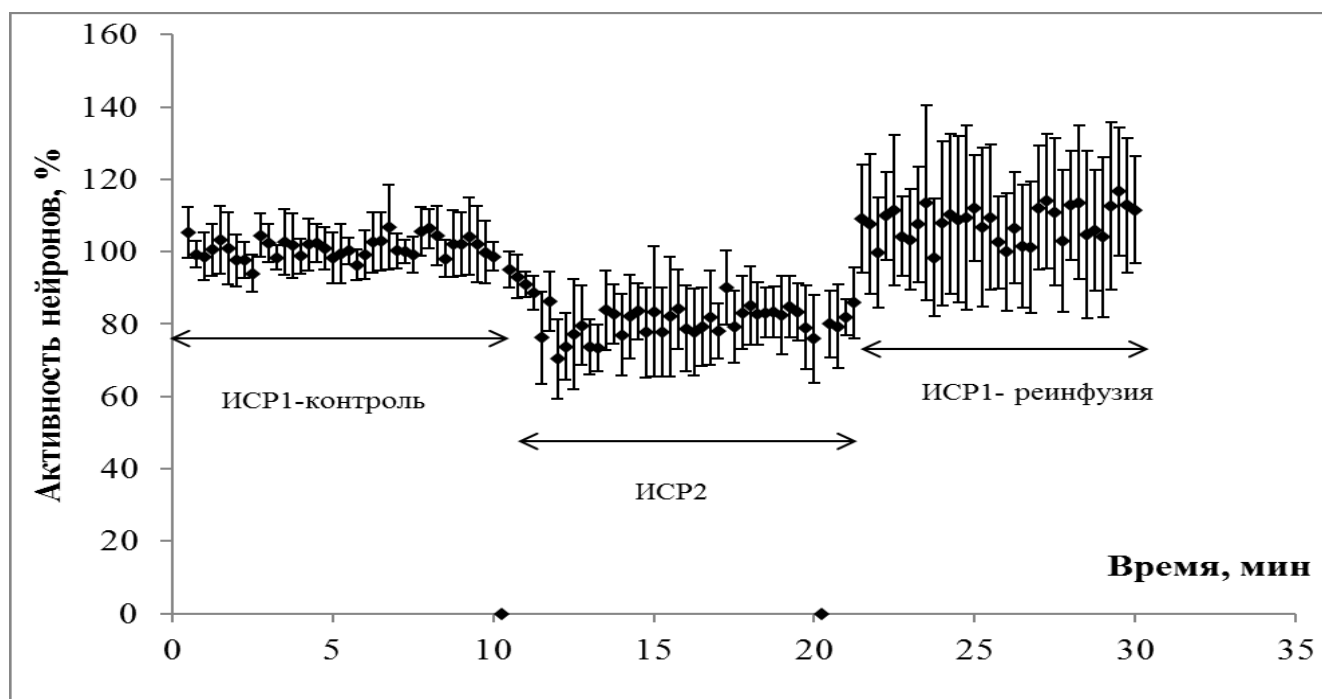


Рис. 5. Уменьшение вызванной активности нейронов в поле СА1 гиппокампа при инкубации в среде с пониженным содержанием дейтерия. Примечание: на оси ординат представлена амплитуда поп-спайка в % по отношению к исходной средней величине. ИСР1 – инкубационный солевой раствор, приготовленный на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). ИСР2 – инкубационный солевой раствор, приготовленный на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). Стрелочкой отмечено действие разных инкубационных растворов.

Эффект развивался постепенно и достигал своего максимального значения в среднем через 2-3 минуты после переключения и выходил на плато. При этом амплитуда ПС достоверно уменьшалась на 20 % по сравнению с контролем – ИСР1. При обратном переключении с ИСР2 на ИСР1 во всех случаях происходило постепенное восстановление амплитуды ПС. Максимальный эффект

наблюдали в среднем через 2 минуты после начала реинфузии. При этом величина восстановленного ПС составила 108 % от исходного значения. Таким образом, десятиминутная инкубация срезов в среде с пониженным содержанием дейтерия приводила к достоверному снижению электрической активности нейронов гиппокампа крыс. Возвращение срезов в инкубационную среду с природным содержанием дейтерия приводило к полному восстановлению электрической активности.

В литературе имеются данные, указывающие на то, что мишенью воздействия низких и высоких концентраций дейтерия в среде могут быть митохондрии клеток. Экспериментально обнаружено, что изменение концентрации дейтерия в среде сдвигает редокс-потенциал митохондрий раковых и нормальных клеток. Это выражалось изменением уровня окисленных митохондриальных белков (Zhang, 2019), активацией или ингибированием продукции АФК в этих органеллах (Zhang, 2019; Wu, 2020), при этом данные эффекты протекали в разных направлениях в зависимости от содержания дейтерия в среде. Сдвиг соотношения D/H в среде вызывал снижение эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс (Лобышев, 2020). Наблюдаемые нами эффекты в экспериментах *in vitro* возможно также связаны с влиянием вызванного изотопного D/H обмена на митохондрии нейронов. Существует предположение, что концентрация дейтерия в матриксе митохондрий меньше, чем в межмембранном пространстве митохондрий, это связано с более низкими концентрациями дейтерия в основных источниках метаболической (матриксной) воды - органических жирах (Boros, 2016). Снижение концентрации дейтерия в среде приводит к уменьшению содержания дейтерия на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, в результате концентрация дейтерия внутри митохондрии становится больше. Таким образом, снижение концентрации дейтерия в окружающей воде меняет концентрационный градиент дейтерия на внутренней мембране митохондрий (Zhang, 2019). Есть версия, что изменение дейтериевого градиента по обе стороны внутренней мембраны митохондрий нейронов способствует пока еще неизвестному механизму открытия протонных каналов и устремлению потока H^+ внутрь митохондрии, таким образом, способствуя уменьшению МПМ.

Величина МПМ зависит от концентрационного градиента ионов водорода по обе стороны внутренней мембраны. Таким образом, снижение МПМ может быть следствием накопления протонов в матриксе митохондрий. Мы предполагаем, что причинами, по которым это может происходить в низкодейтериевой среде, могут быть увеличение протонного тока в сторону матрикса через АТФ-синтазу и уменьшение потока ионов водорода обратно через протонные каналы интегральных белков 3, 4 комплекса ЭТЦ. Перемещение протонов в роторе АТФ-синтазы происходит за счет эстафетной передачи по протон-донорным и протон-акцепторным группам аминокислот (арг., тир., гл.) по водородным связям. Обратный перенос протона против градиента его концентрации осуществляется по протонным каналам, пронизывающих 3 и 4 комплекс ЭТЦ. Перемещение протона в этих каналах происходит также по

цепочке водородных связей, образованных между кластерами воды и группами аминокислотных остатков по механизму Гротгуса (Vygodina, 1997; Konstantinov, 1997). Наличие дейтрона в роторе АТФ-синтазы и в протонном канале трансмембранных белков 3,4 комплексов ЭТЦ может привести к упрочнению водородных связей и уменьшению скорости переноса, поэтому естественное соотношение D/H во внутренней среде организма создает оптимальные условия для работы протонных переносчиков. Изменение соотношения D/H в клетке изменяет кинетико-термодинамические параметры белков-переносчиков, пронизывающих внутреннюю мембрану митохондрий, что и приводит к уменьшению концентрационной составляющей МПМ и как следствие его снижению. Работа АТФ-синтазы зависит от МПМ, т. о. его сдвиг приводит к нарушению синтеза АТФ. Транспорт ионов через плазматическую мембрану осуществляется белками-транспортёрами, работа которых является АТФ-зависимым процессом. Так, Na^+/K^+ -атфаза осуществляет перенос ионов калия внутрь клетки, а ионов натрия в межклеточное пространство, осуществляя генерацию потенциала действия в возбудимых тканях. Уменьшение синтеза АТФ приводит к нарушению генерации потенциала действия в нейронах. Наблюдаемое нами снижение популяционного спайка в нейронах гиппокампа в среде с низкой концентрацией дейтерия является следствием нарушения синтеза АТФ в митохондриях. Снижение ионов кальция в цитоплазме нейронов мозжечка в среде с низкой концентрацией дейтерия может быть связано с изменением работы Ca^{2+} -транспортёров, приводящее к накоплению данных катионов. Дигидрорадамин 123, используемый нами для детекции АФК, проявляет наибольшую чувствительность к таким высокорекреационным радикалам как пероксинитрит и гипохлорит. Продукция первого зависит от генерации оксида азота, синтез которого осуществляется Ca^{2+} -зависимой NO-синтазой. Таким образом, наблюдаемое нами снижение интенсивности флуоресценции данного зонда возможно связано с уменьшением активности NO-синтазы за счет снижения ионов кальция в нейронах мозжечка. Повышение гибели нейронов мозжечка в среде с низкой концентрацией дейтерия при воздействии ГД и температурного стресса также может происходить за счет дефицита макроэргических соединений, происходящих в клетках на фоне D/H обмена.

ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПХ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Анализ полученных экспериментальных прямых в двух координатных системах (рис. 6) показал, что максимальная скорость реакции окисления о – дианизидина пероксидом водорода ПХ была выше в среде, приготовленной на воде с природным содержанием дейтерия. Константа Михаэлиса, полученная в координатах Лайнуивера – Берка была выше на 26 % для ферментативной реакции, протекающей в буфере, приготовленном на ОДВ. В координатах Иди – Хофсти данный показатель был больше на 20 % в среде с уменьшенной концентрацией дейтерия. Данный факт указывает, что сродство субстрата с ферментом в данной модельной системе становится меньше в среде, где содержание дейтерия было в три раза меньше природного. Интегральный

показатель свечения хемилюминесцентной реакции пероксидазного окисления люминола пероксидом водорода в средах с разным содержанием дейтерия, а также тангенс угла наклона кривой нарастания (рис. 7) были достоверно ($p < 0.05$) меньше в реакционной среде, приготовленной на воде с концентрацией дейтерия-50 ppm (таблица 3).

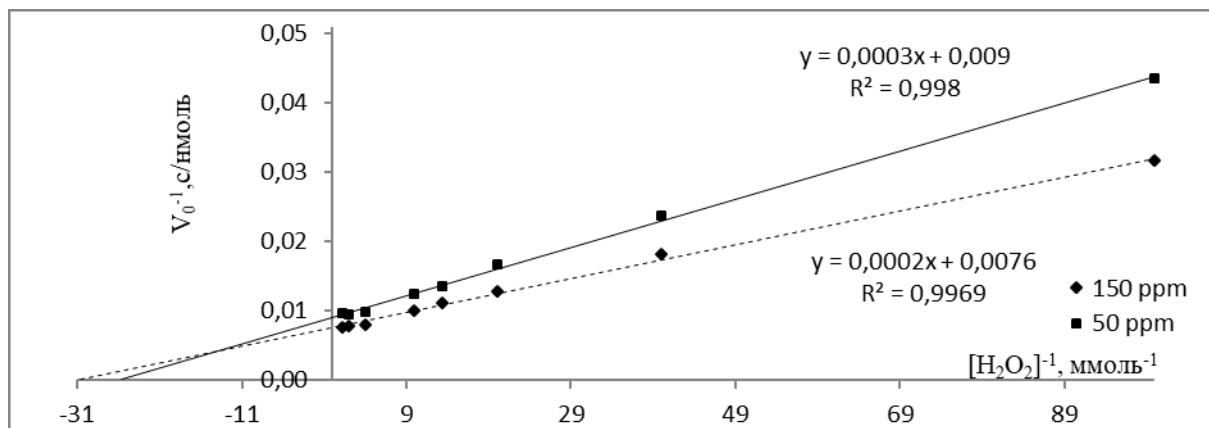


Рис. 6. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления о-дианизидина от начальной концентрации перекиси водорода в координатах Лайнуивера – Берка в среде с пониженным содержанием дейтерия при pH=7,5.

Таблица 3. Показатели активности пероксидазы хрена в средах с разным содержанием дейтерия.

D/H среды, ppm	K_m (Л.-Бера), mM	K_m (Иди- X.), mM	V_{max} (Л. - Бера), нмоль/с	V_{max} (Иди- X.), нмоль/с	Светосумма, у. е.	$tg\alpha$
150	0,026±0,002	0,035±0,003	131	136	3637±49	0,0053±10 ⁻⁴
50	0,033±0,001	0,042±0,003	111	115	2557±124	0,0019±10 ⁻⁴

Данные кинетические параметры отражают интенсивность свечения, развиваемого в ходе пероксидазного окисления люминола. Интенсивность хемилюминесценции данной реакции пропорциональна скорости генерации радикалов люминола. Таким образом, уменьшение интенсивности хемилюминесценции при окислении люминола пероксидазой хрена в среде, приготовленной на ОДВ, можно объяснить снижением активности фермента в данных условиях реакции.

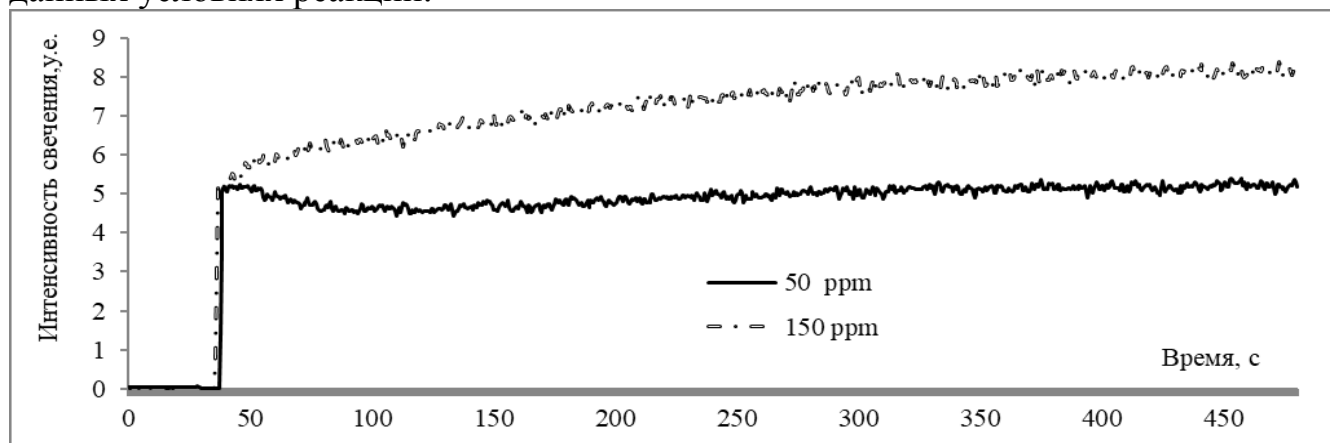


Рис. 7. Кинетическая кривая хемилюминесцентной реакции окисления люминола пероксидазой хрена в среде с пониженным содержанием дейтерия.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПХ И БСА В СРЕДЕ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ

При возбуждении светом длиной волны 297 нм спектр флуоресценции для бычьего сывороточного альбумина (БСА) имеет максимум испускания 335 нм, а для пероксидазы хрена (ПХ) 330 нм. Интенсивность флуоресценции БСА была примерно в 10 раз выше, чем у ПХ. Снижение концентрации дейтерия в растворителе не вызвало заметных сдвигов максимума эмиссии в коротковолновую или длинноволновую область спектра. Помещение белков в растворитель с концентрацией дейтерия 50 ppm привело к снижению интенсивности флуоресценции в обоих образцах.

Количество тирозина в белке БСА составляет девятнадцать против семи в молекуле ПХ. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм интенсивность флуоресценции БСА была примерно в 2,5 раза выше, чем в ПХ. Для БСА интенсивность флуоресценции при длине возбуждения 280 и 297 нм практически не отличается (разница составила 5%). Это может означать, что основной вклад в совместную флуоресценцию БСА вносят остатки триптофана. В ПХ происходит резкое увеличение интенсивности флуоресценции при 280 нм. Таким образом, основной вклад в совместную флуоресценцию фермента вносят тирозиновые остатки. Максимум испускания для БСА составил 335 нм, а для ПХ 310 нм. Коротковолновый максимум флуоресценции у молекулы ПХ возможно связан с гидрофобным окружением тирозиновых остатков. Среда с пониженным содержанием дейтерия не повлияла на положение максимумов в спектрах опытных белков, но при этом вызвала снижение интенсивности флуоресценции (рисунок 8). Исследование спектров кругового дихроизма в далекой УФ области показало, что уменьшение концентрации дейтерия в растворителе не оказывает влияние на вторичную структуру обоих белков. Известно, что атомы водорода, связанные с атомами, имеющими свободную пару электронов, как правило, претерпевают быстрый обмен с другими атомами водорода. Помещение биополимеров в среду, с измененным по дейтерию изотопным составом, приводит к изменению соотношения D/H в их структуре. Изотопное замещение дейтерия на протий протекает с минимальной скоростью в экранированных гидрофобных участках молекулы, а также в составе пептидных групп, испытывающих сферическое затруднение. Напротив, D/H обмен происходит с высокой интенсивностью в функциональных группах, активно взаимодействующих с растворителем.

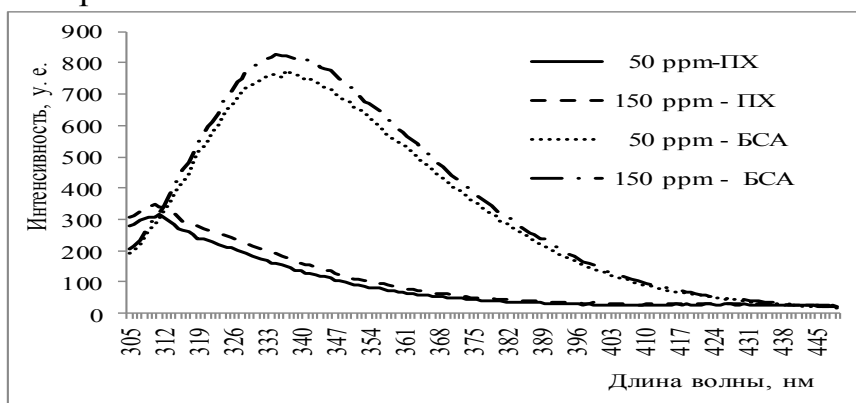


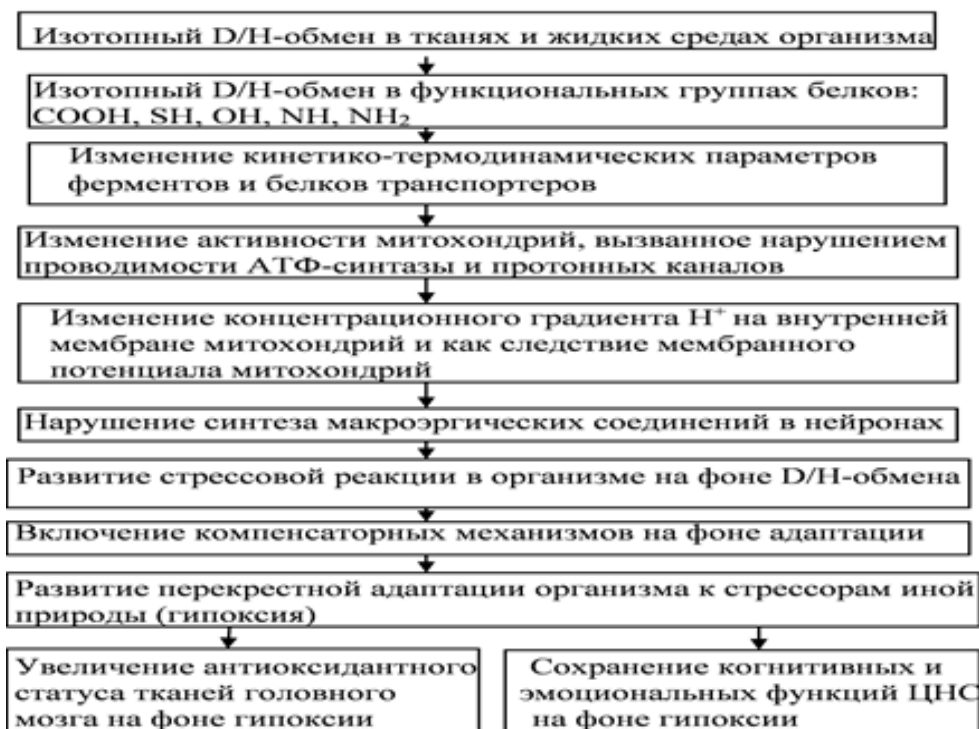
Рис. 8. Спектры совместной триптофановой и тирозиновой флуоресценции БСА и ПХ в среде с пониженным содержанием дейтерия

Вероятно, при растворении исследуемых белков в среде с пониженной концентрацией дейтерия происходит локальное замещение атомов дейтерия на протий в поверхностной структуре белка, контактирующей с гидратной оболочкой. Такое замещение приводит к уменьшению энергии водородной связи между функциональными группами аминокислотных остатков с молекулами воды. Возможно, в результате ослабления водородных связей с молекулами растворителя, амплитуда колебаний боковых групп аминокислот, смотрящих в гидрофильную область, увеличивается. В литературе имеются данные, что в белках тушение собственной флуоресценции может происходить за счет функциональных групп соседних аминокислотных остатков (Ross, 2002). Можно предположить, что усиление подвижности соседних аминокислотных радикалов, окружающих тирозиновые и триптофановые остатки, находящиеся вблизи поверхности белка, приводит к возрастанию вероятности переноса энергии с хромофоров на функциональные группы соседних акцепторов.

Таким образом, проведенные оптические исследования структуры ПХ показали, что среда с пониженным содержанием дейтерия не вызывает конформационных изменений в структуре белка, затрагивающих активный центр фермента. Возможные локальные изменения в поверхностной структуре белка, вызванные изотопным замещением дейтерия на протий, вероятно, не могут стать причиной уменьшения ферментативной активности, наблюдаемой нами в двух исследованных модельных системах. Можно предположить, что ингибирование реакции пероксидазного окисления о-дианизидина и люминола пероксидом водорода в среде с пониженным содержанием дейтерия может быть связано с наличием в активном центре ПХ молекулы воды. Из литературных источников (Henriksen, 1999; Berglund, 2002; Vetich, 2004; Kersten, 1990) известно, что молекула воды принимает участие в механизме каталитического окисления субстратов некоторыми грибными и растительными пероксидазами. Так в ПХ, молекула воды образует водородный мостик между двумя аминокислотными остатками His42 и Pro139. Роль воды заключается в переносе протона от субстрата-восстановителя на гистидиновый остаток, а также переносе электрона с восстановителя на гемм (Газарян, 2006).

Как известно, молекула воды может находиться в нескольких изотопных формах по водороду: H_2O , D_2O и HDO . Вероятно, понижение концентрации дейтерия в реакционной среде может привести к полному или частичному замещению дейтерия на протий в молекуле воды активного центра фермента, и, как следствие, ослаблению водородной связи между аминокислотными остатками His42 и Pro139. В конечном итоге данный процесс может стать причиной уменьшения вероятности передачи протона и электрона по водородной связи от субстрата-восстановителя на реакционные группы активного центра ПХ и понижения активности фермента.

В **заклучении** диссертации подробно описаны основные результаты, квинтэссенцией которых является схема возможного механизма влияния низких концентраций дейтерия на организм млекопитающих (блок-схема 1)



Блок-схема 1. Возможный механизм влияния низких концентраций дейтерия, вызванный D/H- обменом в тканях и крови животных.

ВЫВОДЫ

1. Вызванное изменение изотопного D/H состава внутренней среды организма, на фоне продолжительного применения (6 недель) обедненной дейтерием (50 ppm) воды, способствует антиоксидантному эффекту в тканях головного мозга, а также умеренному антиамнестическому эффекту после перенесенной острой гипоксии и умеренно анксиолитическому на фоне нормоксии

2. Изменение изотопного D/H состава внутренней среды организма, на фоне непродолжительного применения (2 недели) обедненной дейтерием (50 ppm) воды, способствует прооксидантному эффекту в тканях головного мозга как в норме, так и после перенесенной острой гипоксии.

3. Инкубация нейронов мозжечка в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm обуславливает стрессовое действие и вызывает умеренную цитотоксичность на фоне внешних стрессовых факторов. Гибель нейронов в среде с природным содержанием дейтерия на фоне глюкозной депривации и без нее была на 18% и 9% ниже, чем в среде с пониженным содержанием дейтерия.

4. Инкубация в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm оказывает достоверное влияние на физико-химические параметры нервной ткани:

- а) снижение мембранного потенциала митохондрий мозжечка в среднем на 5 %;
- б) понижение ионов Ca^{2+} в цитозоле нейронов мозжечка в среднем на 15 %;
- в) снижение продукции активных форм кислорода в нейронах мозжечка при увеличении метаболической нагрузки;
- г) снижение амплитуды популяционного спайка в нейронах гиппокампа на 20 %.

5. Уменьшение концентрации дейтерия в реакционной среде приводит к уменьшению скорости пероксидазного окисления о-дианизидина и люминола пероксидом водорода в модельных системах. Константа Михаэлиса пероксидазной реакции окисления о-дианизидина пероксидом водорода, рассчитанная в координатах Лайнуивера-Берка и Иди-Хофсти, для среды с концентрацией дейтерия 150 ppm составила 0,026 и 0,035 мМ, а для среды 50 ppm 0,033 и 0,042 мМ.

6. Уменьшение концентрации дейтерия в среде со 150 до 50 ppm не вызывает конформационных изменений вблизи активного центра пероксидазы хрена и не оказывает влияние на вторичную структуру фермента и бычьего сывороточного альбумина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Kravtsov A. Reduction of Deuterium Level Supports Resistance of Neurons to Glucose Deprivation and Hypoxia: Study in Cultures of Neurons and on Animals / A. Kravtsov, **S. Kozin**, A. Basov, M. Baryshev, A. Elkina, S. Dzhimak, V. Malyshko, E. Butina, A. Moiseev // **Molecules**. – 2022. – Vol. 27. – No 1. – DOI 10.3390/molecules27010243.

2. **Kozin S.** Electrophysiological Activity and Survival Rate of Rats Nervous Tissue Cells Depends on D/H Isotopic Composition of Medium / S. Kozin, V. Skrebitsky, R. Kondratenko, A. Kravtsov, E. Butina, A. Moiseev, V. Malyshko, M. Baryshev, A. Elkina, S. Dzhimak // **Molecules**. 2021.- Vol.26, №7. <https://doi.org/10.3390/molecules26072036>

3. **Козин С.В.** Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние ЦНС животных в условиях гипоксии / С.В. Козин, А.А. Кравцов, Э.И. Злищева, Л.В. Шурыгина, В.В. Малышко, А.В. Моисеев, А.А. Елкина, М.Г. Барышев // **Биофизика**. - 2020. - Т. 65, № 6. - С. 1196-1202.

4. **Козин С.В.** Изменение функциональной активности пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным изотопным $^2\text{H}/^1\text{H}$ -составом / С.В. Козин, А.А. Кравцов, К.К. Туроверов, А.В. Фонин, Е.В. Чихиржина, В.В. Малышко, А.В. Моисеев, А.В. Чуркина // **Биофизика**. - 2020. - Т. 65, № 2. - С. 229-236.

5. **Козин С.В.** Изотопное замещение дейтерия на протий в тканях головного мозга крыс изменяет его резистентность к гипоксии / С.В. Козин, А.А. Кравцов, А.А. Елкина, Э.И. Злищева, Е.В. Барышева, Л.В. Шурыгина, А.В. Моисеев, М.Г. Барышев // **Биофизика**. - 2019. - Т. 64, № 2. - С. 362-370.

6. Басов А.А. Изменение показателей прооксидантно-антиоксидантной системы в крови и головном мозге крыс в условиях моделирования острой гипоксии при потреблении питьевого рациона, обедненного дейтерием / А.А. Басов, **С.В. Козин**, И.М. Быков, К.А. Попов, А.В. Моисеев, А.А. Елкина, С.С. Джимаков // **Известия Российской академии наук. Серия биологическая**. - 2019. - № 6. - С. 572-576.

7. Kravtsov A.A. Effect of drinking ration with reduced deuterium content on brain tissue prooxidant-antioxidant balance in rats with acute hypoxia model / A.A. Kravtsov, **S.V. Kozin**, A.A. Elkina, D.I. Shashkov, M.G. Baryshev, E.R. Vasilevskaya, L.V. Fedulova, K.A. Popov, V.V. Malyshko, A.V. Moiseev // **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**. - 2018. - V. 8, № 2. - С. 42-51.
8. Способ профилактики и коррекции метаболических и функциональных нарушений центральной нервной системы в условиях стресса / **С.В. Козин**, А.А. Кравцов, Э.И. Злищева, Л.В. Шурыгина, Л.В. Ломакина, С.С. Джимаков, М.Г. Барышев, А.А. Басов // **Патент на изобретение RU 2717107 C1**, 18.03.2020. - Заявка № 2019130782 от 27.09.2019.
9. Елкина А.А., Козин С. В., Кравцов А. А. Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние ЦНС животных в условиях нормы и нормобарической гипоксии с гиперкапнией // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: Материалы Международной конференции, Гурзуф, май 2021 года. – Москва, 2021. С. - 306-310.
10. Влияние изотопного D/H-состава среды на активность и структуру пероксидазы хрена / Козин С.В., Кравцов А.А.// VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Сборник тезисов, октябрь 2020 г.: тез. докл. - Кольцово, 2020. С. - 279-282.
11. Изменение функционального состояния нейронов мозжечка в средах с различным изотопным $^2\text{H}/^1\text{H}$ составом / С. В. Козин, А. А. Кравцов // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Сборник тезисов, октябрь 2019 г.: тез. докл. - Кольцово, 2019. С. 279-282.
12. Изотопное замещение D/H во внутренней среде организма приводит к смещению про – и антиоксидантного статуса тканей головного мозга / С.В. Козин, А. А. Кравцов, М.Г. Барышев // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России, сентябрь 2019 г.: тез. докл. - Сочи, 2019. - С. 41-42.
13. Влияние низких концентраций дейтерия воды на живые системы / С.В. Козин, С.С. Джимаков // Актуальные вопросы биологической физики и химии. - 2017. - Т. 2(1), сентябрь 2017 г.: тез. докл. - Севастополь, 2017. - С. 134-137.
14. Действие воды с пониженным содержанием дейтерия на рост микромицетов *Ulocladium chartarum*/ **С.В. Козин**, Л.К. Панина, С.С. Джимаков, М.Г. Барышев // Современная микология в России. Том 6. Материалы 4-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2017. 460 с. ISBN 978-5-901578-26-1 страница 68.

Публикации 1-8 из перечня ВАК