

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**«Нейропротекторное действие инсулина *in vitro* и *in vivo*
и его возможный механизм»**

Зорина Инна Игоревна
06.06.01 - Биологические науки
03.01.04 – Биохимия

Научный руководитель
д.б.н. Шпаков Александр Олегович

ИЭФБ РАН
Санкт-Петербург

2019

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Окислительный стресс в значительной мере определяет повреждение и гибель нервных клеток мозга при ишемических (инсульт мозга) и нейродегенеративных его поражениях, а также при диабетической нейропатии. Эти болезни являются одними из основных причин смерти людей в пожилом возрасте. Они приводят к тяжелым формам инвалидности, нарушению когнитивных функций и старческому слабоумию, и потому имеют большую социально-экономическую значимость.

В настоящее время инсулин рассматривают не только как гормон, регулирующий метаболизм глюкозы в организме, но и как важнейший ростовой фактор, обладающий модуляторной активностью и нейропротекторными свойствами [3, 9, 12, 23]. Инсулин реализует свое нейропротекторное действие через посредство нескольких механизмов. При действии на нервные клетки инсулин способен ингибировать апоптоз, подавлять β -амилоидную и глутаматную токсичность, снижать окислительную деструкцию биомолекул и препятствовать развитию стресса эндоплазматического ретикулума [3, 9, 12, 14, 22, 23]. Нейропротекторный эффект инсулина реализуется через сигнальный каскад, включающий PI-3-K/Akt/mTOR/p70-S6K, а также через каскад IRS/PI-3-K/Akt/GSK-3 β [7-9, 12, 18]. Установлено, что инсулин и инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) активируют ERK1/2, киназу, регулируемую внеклеточными сигналами, в нервных клетках *in vivo* и *in vitro* [10]. Однако изучение влияния инсулина на активность протеинкиназы B (Akt) и ERK1/2 в нейронах коры мозга и других нервных клетках проводилось, как правило, в одной-трех временных точках после начала действия прооксиданта. Следствием этого стали противоречивые результаты. Не определена роль GSK3 β , киназы гликогенсинтазы-3 β : показано как ингибирование ее активности, так и отсутствие влияния инсулина на активность этого фермента [8]. Практически не изучено влияние инсулина на активность АМПК, АМФ-активируемой протеинкиназы, при индукции окислительного стресса, хотя АМПК является основным энергетическим сенсором клетки и играет определяющую роль в обеспечении энергией компонентов антиоксидантной системы [2]. В связи с этим возникает необходимость изучения влияния инсулина на эти показатели в динамике развития окислительного стресса, что и было осуществлено в проведенном нами исследовании.

Защитный эффект инсулина в значительной степени зависит от его антиоксидантной активности [4, 18] и обусловлен функциональной активностью про- и антиапоптотических белков митохондрий Bax/Bcl-2. В ряде работ показано, что антиапоптотический белок Bcl-2 обладает антиоксидантным действием и способствует

снижению уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках [3, 9]. В то же время увеличение уровня проапоптотического белка Вах, напротив, повышает интенсивность свободнорадикальных реакций. Известно, что инсулин повышает уровень Vcl-2 в нейронах коры мозга [8, 18]. При этом его влияние на уровень Вах и отношение Вах/Vcl-2 остаются неизученными.

Острая ишемия мозга является комплексным патологическим процессом. Нарушение мозгового кровотока запускает серию событий на клеточном и молекулярном уровнях, вызывая истощение запасов энергии и смерть нейронов. Ишемия мозга сопровождается образованием активных форм кислорода и азота, окислительным стрессом, нарушением функций митохондрий, эксайтотоксичностью, ингибированием синтеза белка, развитием стресса эндоплазматического ретикулума и активацией процессов воспаления. Это приводит к нарушению функционирования сигнальных каскадов мозга, результатом чего является гибель нейронов путем апоптоза, некроза или аутофагии [21]. При реперфузии мозга, восстановлении кровотока, отмечается дальнейшее усугубление запущенных в ходе аноксии процессов, в том числе интенсификация свободнорадикальных реакций. При ишемии-реперфузии мозга происходит окислительная деструкция биомолекул, что ведет к накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной инактивации транспортеров, в том числе Na^+ , K^+ -АТФазы, активность которой является маркером функционирования нейронов. Функциональное состояние антиоксидантной системы также важно для выживания нейронов после ишемии [21].

Экспериментальные и клинические исследования последних лет показали перспективность использования интраназально вводимого инсулина для лечения когнитивных нарушений при травматических повреждениях головного мозга, болезнях Альцгеймера и Паркинсона, диабетической нейропатии, а также нейропатии, вызываемой ВИЧ [3, 6, 22, 23]. Подробно исследованы механизмы транспорта инсулина в ЦНС при интраназальном способе его доставки, при котором происходит его проникновение и прямое воздействие на структуры мозга без существенного влияния на уровень глюкозы в крови [15]. Однако работы по изучению эффектов интраназально вводимого инсулина при ишемии головного мозга отсутствуют, несмотря на доказанные механизмы его нейропротекторного действия при нейродегенеративных заболеваниях. Необходимо отметить, что при инсультах в настоящее время имеются данные только в отношении нейропротекторного эффекта интраназально вводимого IGF-1 [14].

Таким образом, выяснение механизмов нейропротекторного действия инсулина в ходе развития окислительного стресса *in vitro* и при интраназальном его введении в условиях ишемического повреждения *in vivo* представляется актуальной задачей современной нейрохимии и нейробиологии. Основной целью исследования являются поиск возможных механизмов защитного действия инсулина при окислительном стрессе и оценка нейропротекторного действия интраназально вводимого инсулина при ишемическом поражении мозга. Основными задачами исследования являются: (1) изучение механизмов защитного действия инсулина на первичные культуры нейронов коры мозга *in vitro* в условиях развития окислительного стресса, индуцированного добавлением перекиси водорода, и (2) изучение в условиях *in vivo* способности инсулина, вводимого интраназально, оказывать защитный и антиоксидантный эффект на мозг при двухсосудистой ишемии мозга крыс с гипотензией и реперфузией.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Изучение нейропротекторного действия инсулина при индукции окислительного стресса на моделях *in vitro* и *in vivo* и выяснение механизмов, лежащих в основе проявляемого им защитного эффекта.

Задачи:

1. Исследовать защитный, в том числе антиапоптотический, эффект инсулина на нейроны коры головного мозга крыс в культуре при воздействии на нее прооксиданта – перекиси водорода;
2. Изучить антиоксидантное действие инсулина на нейроны коры мозга крыс в условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода;
3. С целью выяснения молекулярных механизмов нейропротекторного действия инсулина исследовать его эффекты на активность протеинкиназ Akt, GSK3 β , ERK1/2 и АМРК в нейронах первичной культуры коры мозга крыс в динамике развития окислительного стресса при добавлении перекиси водорода;
4. Оценить влияние ингибиторов и активаторов протеинкиназ Akt, GSK3 β , ERK1/2 и АМРК на защитный эффект инсулина при его действии на культивируемые нейроны коры мозга крыс в условиях окислительного стресса при добавлении перекиси водорода;
5. Исследовать в опытах *in vivo* способность инсулина, вводимого интраназально, влиять на накопление продуктов перекисного окисления липидов, активность и экспрессию Na⁺, K⁺-АТФазы, активность и экспрессию ферментов антиоксидантной защиты, уровень общего глутатиона и экспрессию генов про- и антиапоптотических

белков Вах и Bcl-2 в коре мозга при двухсосудистой ишемии мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Инсулин обладает защитным, в том числе антиапоптотическим, эффектом при действии на нейроны коры мозга крыс в культуре в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода, причем его нейропротекторный эффект является дозозависимым и реализуется в наномолярных концентрациях.

2. Инсулин подавляет продукцию активных форм кислорода, вызванную действием перекиси водорода на нейроны коры мозга крыс, и предотвращает падение мембранного потенциала митохондрий в этих клетках в условиях окислительного стресса.

3. Вызываемое инсулином повышение жизнеспособности нейронов коры мозга в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода, обусловлено модулирующим влиянием инсулина на активность протеинкиназ Akt и GSK3 β и нормализацией соотношения про- и антиапоптотических белков Вах/Bcl-2.

4. Инсулин активирует ERK1/2 и ингибирует активность АМПК, что положительно коррелирует с эффективностью его нейропротекторного действия на нейроны коры мозга крыс в условиях окислительного стресса.

5. При однократном интраназальном введении крысам, подвергнутым двухсосудистой ишемии мозга и реперфузии, инсулин оказывает выраженное защитное действие, что проявляется в снижении накопления продуктов перекисного окисления липидов, в повышении экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и в нормализации активности и экспрессии Na⁺, K⁺-АТФазы.

Научная новизна работы

Впервые показано, что инсулин в наномолярном диапазоне концентраций оказывает защитное, в том числе антиапоптотическое, действие на культуру нейронов коры мозга крыс в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода. Впервые изучена модуляция инсулином активности Akt, GSK3 β , ERK1/2, АМПК и уровней про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2 в нейронах первичной культуры коры мозга крыс в динамике развития окислительного стресса в восьми временных точках после добавления прооксиданта. Впервые показано, что не только защитный, но и антиоксидантный эффект инсулина на нейроны коры мозга в значительной степени подавляется в присутствии ингибитора сигнального пути PI-3-K/Akt LY294002 и ингибитора MEK1/2 SL327. Впервые изучено влияние интраназального введения инсулина крысам при двухсосудистой ишемии мозга с

гипотензией и реперфузией. В результате обнаружено, что однократное интраназальное введение инсулина крысам, подвергнутым двухсосудистой ишемии мозга и реперфузии, снижает накопление продуктов перекисного окисления липидов, повышает экспрессию генов супероксиддисмутаза-1 и -2 и гена антиапоптотического белка Bcl-2, а также нормализует активность и экспрессию Na^+ , K^+ -АТФазы в коре мозга крыс.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 23 работы в печатных изданиях. Из них 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в том числе статья в журнале *International Journal of Molecular Sciences* (IF=4.331), и 17 тезисов конференций. Результаты работы представлены и обсуждены на 10 российских и международных конференциях, среди которых XV Всероссийское Совещание с международным участием, посвященное памяти академика Л. А. Орбели и 60-летию ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, 2016 г.), FENS Regional Meeting (Печ, Венгрия, 2017 г.), XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017 г.), Всероссийский конгресс «Боткинские чтения» (Санкт-Петербург, 2018 г.), 11th FENS (Берлин, Германия, 2018 г.), XIV и XV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018 и 2019 г.), Алмазовский молодежный медицинский форум (Санкт-Петербург, 2019 г.).

Теоретическое и практическое значение работы

В настоящее время отмечается острый недостаток эффективных нейропротекторов, способных предотвратить или снизить интенсивность повреждения мозга при инсульте и преинсультных состояниях. Полученные данные о механизмах защитного действия инсулина, как на культуре кортикальных нейронов, так и в модели двухсосудистой ишемии мозга, имеют не только фундаментальное, но и практическое значение. Расшифровка и изучение механизмов нейропротекторного действия инсулина при окислительном стрессе в нейронах коры мозга и при ишемии и реперфузии мозга открывает новые перспективы для его широкого использования в условиях клиники для лечения пациентов с ишемическими поражениями мозга. Впервые показанный защитный эффект интраназально вводимого инсулина, действующего через центральные механизмы, позволяет рекомендовать его внедрение и применение в условиях клиники для лечения пациентов с нормо- и гипогликемией при ишемическом инсульте. Подобные исследования открывают новые перспективы для развития нейропротекторных и нейрокогнитивных технологий, основанных на применении интраназально вводимого инсулина. Результаты исследования могут быть

использованы при подготовке курсов лекций для студентов и аспирантов медицинских и биологических вузов.

Материалы и методы

Все эксперименты проводили в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Этическим комитетом ИЭФБ РАН, и правилами и требованиями, изложенными в документах «European Communities Council Directive 1986» (86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Выделение нейронов из коры мозга эмбрионов крыс линии Вистар проводили на 17-18 день эмбрионального развития с помощью модифицированного метода Дихтера [25]. Для минимизации влияния инсулина, который содержится в ростовой среде, клеточную среду заменяли на среду Neurobasal medium, содержащую 1% ростовой добавки В-27 без инсулина, за 12 ч перед экспериментом. **Определение жизнеспособности нейронов** оценивали с помощью колориметрического метода с использованием МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) [25]. Для этого клетки инкубировали с инсулином в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ и 1 мкМ в течение 1, 5 или 20 ч, затем добавляли 100 мкМ H_2O_2 и инкубировали в течение 6 ч. При изучении механизмов защитного действия инсулина нейроны в течение 30 мин инкубировали с 30 мкМ LY294002 (ингибитор PI-3-K), 10 мкМ SL327 (ингибитор MEK1/2), 1 мкМ BMS-754807 (ингибитор тирозинкиназы рецепторов инсулина и IGF-1), 100 мкМ AICAR (активатор AMPK). После этого нейроны инкубировали с 1 мкМ инсулином в течение 1 ч, и подвергали действию 100 мкМ H_2O_2 в течение 6 ч. Результаты выражали в процентах от контроля (клетки без добавления H_2O_2), который принимали за 100 %. Наряду с этим, оценивали число клеток, гибель которых была предотвращена в результате преинкубации с инсулином (уровень “rescue rates”).

Для изучения антиапоптотического действия инсулина нейроны инкубировали с 100 нМ и 1 мкМ инсулином в течение 1 ч, далее добавляли 100 мкМ H_2O_2 и инкубировали 6 ч. **Активность каспазы-3** в клетках определяли с использованием набора «CASP3F-1КТ» («Sigma-Aldrich», США). Активность каспазы-3 выражали в у. е. Для **определения** уровня **образования АФК** нейроны инкубировали с 100 нМ и 1 мкМ инсулином в течение 1, 5 или 20 ч [25]. Содержание АФК выражали в у. е., отражающих интенсивность флуоресценции в клетках. **Определение уровня мембранного потенциала $[\Delta\psi(m)]$** в нейронах проводили методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного красителя TMRM (тетраметилродамин) [25]. Нейроны инкубировали с 100 нМ или 1 мкМ инсулином в

течение 1 или 20 ч, добавляли 100 мкМ H_2O_2 и инкубировали в течение 1 ч. Уровень флуоресценции контрольных клеток принимали за 100%, интенсивность флуоресценции анализируемых проб рассчитывали в процентах от контроля. Для **изучения экспрессии белков** использовали метод **Вестерн-блоттинга** [25]. Равное количество белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в 14 %-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли, затем проводили перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану и проводили инкубацию с первичными антителами – Anti-pAkt (Ser⁴⁷³) (1:1000), Anti-Akt (1:1000), Anti-pGSK3 β (Ser⁹) (1:1000), Anti-GSK3 β (1:1000), Anti-ERK1/2 (1:1000), Anti-Bax (1:1000), Anti-Bcl-2 (1:1000), Anti-pAMPK α (Thr¹⁷²) (1:1000), Anti-AMPK α (1:1000), Anti-каспаза-3 (Asp¹⁷⁵) (1:1000), Anti-GAPDH (1:2000) («Cell Signaling Technology», США), Anti-pERK1(pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴)&ERK2(pThr¹⁸⁵/pTyr¹⁸⁷) (1:2000), Anti- α -тубулин (1:2000) («Sigma-Aldrich», США). Затем добавляли вторичные анти-кроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:1000, «Cell Signalling Technology», США). Сигнал вторичных антител усиливали с помощью набора для иммунохемилюминесценции (Novex ECL Western Blotting Detection Reagents, «Invitrogen», США). Хемилюминесцентное свечение фиксировали на голубой фото пленке («Phenix Research Products», США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга окрашивали с использованием Anti-Akt, Anti-ERK1/2, Anti-GSK3 β , Anti-AMPK, Anti- α -тубулин или Anti-GAPDH антител. Проявленные фото пленки визуализировали на сканере Canon CanoScan 800F. Данные обрабатывали денситометрически с помощью программы Bio7. Отношение pERK1/2 / ERK1/2, pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt, pGSK3 β (Ser⁹)/GSK3 β , pAMPK α (Thr¹⁷²)/AMPK α в контрольных клетках принимали за 1.0.

Для **моделирования двухсосудистой ишемии мозга крыс с гипотензией и реперфузией** использовали самцов крыс линии Вистар, 250-300 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Изучали следующие группы животных: контрольные, ложно-оперированные животные (ЛО, $n=7$); животные, подвергнутые ишемии мозга и реперфузии (ИР, $n=7$); животные, подвергнутые ишемии мозга и реперфузии, которым перед ишемией вводился инсулин в дозе 0.5 МЕ/крысу (ИР-Инс, $n=7$). Перед проведением операций для минимизации стрессорного воздействия животные подготавливались для интраназальных инъекций путем предварительного введения физиологического раствора. Бычий инсулин («Sigma Aldrich», США) растворяли в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.5, и хранили при -20°C. Инсулин/физиологический раствор вводили в каждую ноздрю по 10 мкл раствора за 60

мин до индукции ишемии. В качестве наркоза использовали хлоральгидрат (400 мг/кг, внутривенно). Двухсосудистая ишемия переднего мозга вызывалась путем окклюзии каротидных артерий в сочетании с гипотензией и проводилась в течение 20 мин [19]. Для этого проводили препарирование правой бедренной артерии и общих сонных артерий. Далее проводили катетеризацию бедренной артерии и осуществляли отбор артериальной крови в шприц с гепарином 50 ед/мл до достижения артериального давления в 50 мм Нг. Контроль артериального давления производили с использованием системы «Систола» («Нейроботикс», Россия). После 20 мин окклюзии общих сонных артерий для достижения реперфузии переднего мозга их разжимали и возобновляли подачу крови в мозг, одновременно вводили отобранную кровь по 1-2 мл/мин. ЛО животные анестезировались, у них проводилось препарирование сосудов, но не отбиралась кровь и не осуществлялась окклюзия артерий. Через 60 мин реперфузии выделяли кору головного мозга и использовали для определения активности Na^+ , K^+ -АТФазы, продуктов ПОЛ, для экстракции тотальной РНК, для определения уровня общего глутатиона, активности супероксиддисмутазы (СОД) в субклеточных фракциях.

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы, выделенной из грубой синаптосомальной фракции коры мозга крыс, определяли по сопряженной реакции в присутствии избытка пируваткиназы, лактатдегидрогеназы и фосфоэнолпирувата при регистрации убыли НАДН в среде инкубации [13]. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли по разнице между суммарной активностью и активностью Mg^{2+} -АТФазы, измеряемой в присутствии строфантина G. Активность фермента выражали в микромолях неорганического фосфата (Ф_n)/мг белка/час. Для **выделения цитозольной и митохондриальной субклеточных фракций коры головного мозга** крыс использовали метод дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы [1]. В полученных субклеточных фракциях определяли активность СОД и уровень общего глутатиона. **Определение активности СОД** проводили с использованием методики, основанной на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксид, образующийся при взаимодействии НАДН и феназинметасульфата [1]. Активность СОД рассчитывали в условных единицах на 1 мг белка соответствующей фракции, выделенной из 1 г ткани. **Уровень общего глутатиона** определяли с использованием метода, основанного на реакции восстановленной SH-группы цистеина в составе глутатиона с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой с образованием окрашенного продукта 2-нитро-5-тиобензойной кислоты [1]. Количество общего глутатиона определяли по калибровочной кривой и выражали в нмоль/мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури. Кору головного мозга

крыс также использовали для **выделения липидов из тканей животных по методу Фолча** [1]. Полученный липидный экстракт использовали для определения количества общих липидов (определение по сухому остатку в навеске) и продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ). **Метод количественного определения ДК и ТК** основан на способности сопряженных двойных связей интенсивно поглощать свет в УФ-области спектра [1]. Количество ДК оценивали с использованием молярного коэффициента экстинкции ($2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и выражали в у. е. ДК на 1 мг общих липидов. Уровень ТК выражали в у. е. на мг общих липидов. **Метод количественного определения содержания ОШ** основан на регистрации флуоресценции ОШ в липидном экстракте при максимуме возбуждения в области 340-360 нм и максимуме испускания в области 440-450 [1]. Количество ОШ выражали в у. е. на мг общих липидов. **Определение содержания конечных продуктов ПОЛ, активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП)**, проводили с использованием ТБК-теста в гомогенате коры мозга крыс [1].

Для проведения **количественной ПЦР в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией**, выделяли тотальную РНК из коры головного мозга крыс фенол-хлороформной экстракцией с помощью реагента «Extract RNA» («Евроген», Россия). Измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре «NanoPhotometer P300» («IMPLEN», Германия). Образец, содержащий 1 мкг РНК, подвергали обратной транскрипции с использованием набора «MMLV-RT kit» («Евроген», Россия) и Random Hexamer Primer. Реакция ПЦР амплификации проводилась в 25 мкл смеси, содержащей 10 нг продукта после обратной транскрипции, 0.4 мкМ прямого и обратного праймера и реагента «qPCRMix-HS SYBR+LowROX» («Евроген», Россия). Регистрация амплификационного сигнала осуществлялась с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System («Thermo Fisher Scientific», США) согласно температурному режиму, рекомендованному производителем. Температура отжига праймеров рассчитывалась с помощью программы Primer-Blast и проводилась проверка эффективности подобранной температуры. Последовательности праймеров были взяты из литературных источников. Для расчета уровня экспрессии целевого гена использовали метод $\Delta\Delta\text{CT}$. В качестве эндогенного контроля использовали ген 18S рРНК (*18S rRNA*). Все данные представлены в виде относительных единиц уровня мРНК целевого гена (RQ), расчет которых проводили по отношению к контрольной группе.

Статистическую обработку проводили с использованием программы «IBM SPSS Statistics». Данные представлены как $M \pm m$. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух зависимых/независимых

выборок с нормальным распределением использовали парный/двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – ANOVA с использованием *post hoc* теста Тьюки. Данные, не удовлетворяющие критериям нормального распределения, обрабатывали с применением непараметрических статистических методов анализа. Для сравнения двух независимых групп использовали *U*-критерий Манна-Уитни, для сравнения трех и более групп – тест Крускала-Уоллиса с последующим попарным сравнением с применением *U*-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Изучение защитного действия инсулина на культивируемые нейроны коры головного мозга крыс, подвергнутые действию перекиси водорода *in vitro*

Исследовали способность инсулина влиять на выживаемость нейронов коры мозга крыс в условиях окислительного стресса, вызванного добавлением H_2O_2 . Показано, что защитный эффект инсулина на кортикальные нейроны, подвергнутые действию 100 мкМ H_2O_2 , в наномолярном диапазоне концентраций инсулина (1 нМ < 10 нМ < 100 нМ и/или 1 мкМ) является дозозависимым (Рис. 1). Далее для исследования защитных свойств инсулина и механизмов его нейропротекторного действия были выбраны концентрации 100 нМ и 1 мкМ.

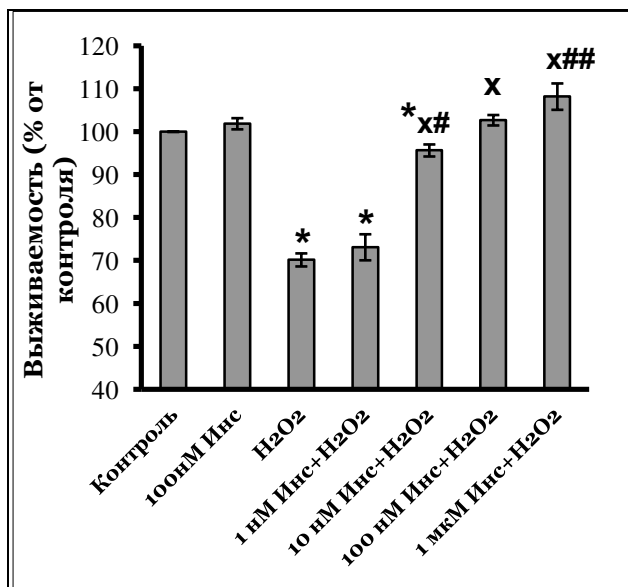


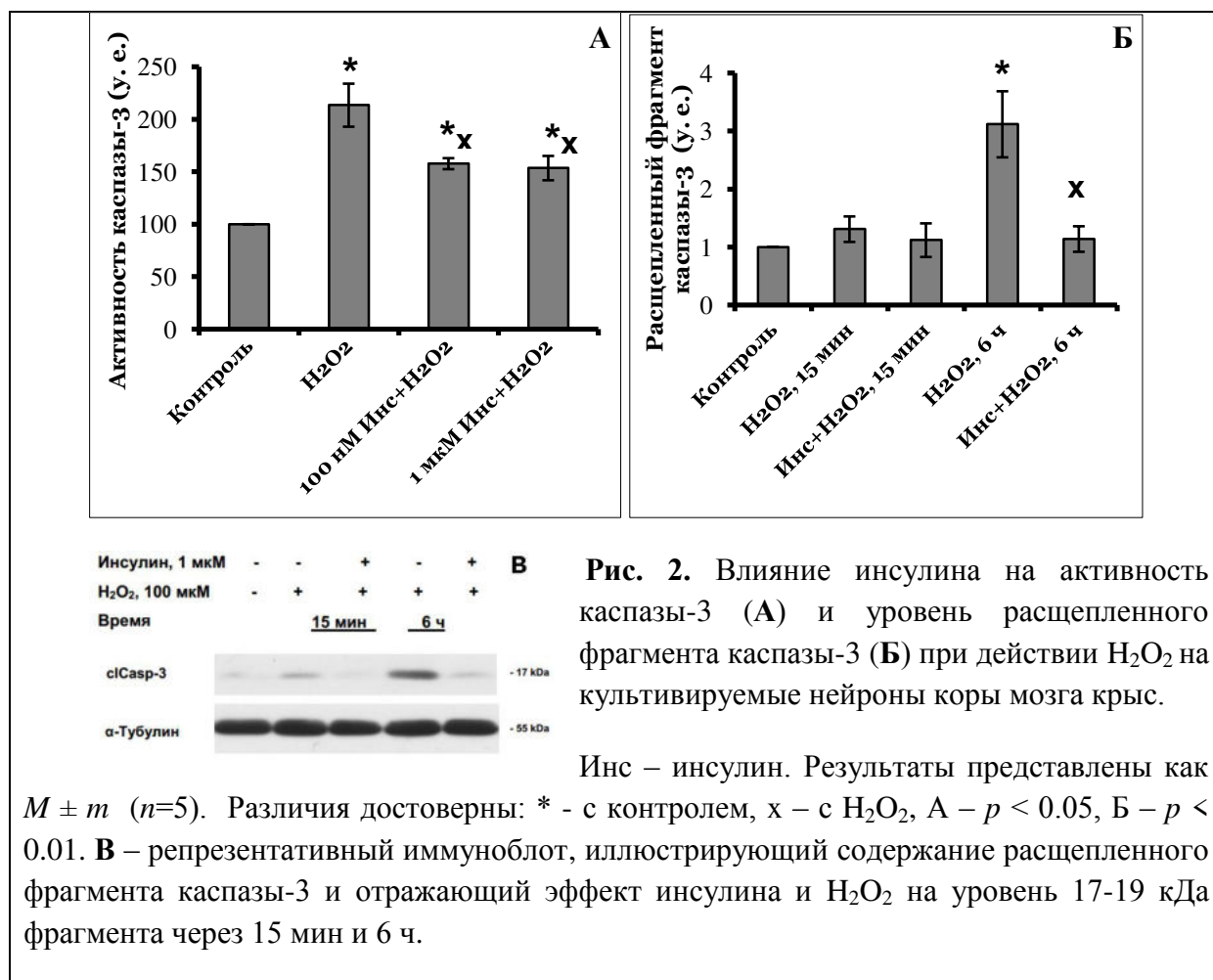
Рис. 1. Влияние инсулина на выживаемость нейронов коры мозга крыс в условиях воздействия на них перекиси водорода.

Инс – инсулин. Выживаемость клеток определялась с использованием МТТ-теста. Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – с контролем, x – с H_2O_2 , # – в присутствии 1 нМ инсулина и H_2O_2 , ## – в присутствии 10 нМ инсулина и H_2O_2 , $p < 0.01$ во всех случаях.

В литературе описано защитное действие инсулина в концентрации 1 и 10 мкМ при преинкубации с ним нейронов коры мозга крыс в течение 48 ч перед индукцией в них окислительного стресса, но при этом была использована ростовая добавка В-27 с инсулином [8]. Имеются основания полагать, что это способно привести к инактивации рецепторов инсулина. В наших экспериментах мы предварительно за 12 ч заменяли

среду на аналогичную, но содержащую добавку В-27 без инсулина, и показали наличие защитного эффекта как 10 нМ, так и 100 нМ инсулина.

Далее мы изучили влияние инсулина в условиях окислительного стресса на активность каспазы-3 и накопление расщепленного фрагмента каспазы-3 (Рис. 2), отражающие гибель клеток путем апоптоза при добавлении H_2O_2 .



Обнаружено, что при действии H_2O_2 происходит достоверное увеличение уровня фрагмента каспазы-3 через 6 ч после добавления H_2O_2 (Рис. 2Б) в 3.1 раза по сравнению с контролем, что сопровождается повышением активности каспазы-3 в 2.1 раза в кортикальных нейронах (Рис. 2А). Преинкубация нейронов с инсулином нормализовала, как уровень расщепленного фрагмента каспазы-3 (Рис. 2Б), так и активность каспазы-3 через 6 ч после действия прооксиданта (Рис. 2А). При этом эффекты 100 нМ и 1 мкМ инсулина достоверно не различались (Рис. 2А).

Изучение влияния инсулина на генерацию активных форм кислорода при добавлении перекиси водорода в нейронах коры мозга крыс *in vitro*

Для изучения антиоксидантного действия инсулина определяли влияние инкубации нейронов коры мозга крыс с 100 нМ и 1 мкМ инсулином при добавлении

H₂O₂. Добавление 100 мкМ H₂O₂ приводило к значительному накоплению АФК в нейронах коры мозга крыс (Табл. 1). Инсулин в концентрации 1 мкМ снижал накопление АФК в нейронах коры мозга при преинкубации в течение 1, 5 и 20 ч. Достоверный эффект 100 нМ и 1 мкМ инсулина наблюдался уже после 1 ч преинкубации (Табл. 1). При 20 ч преинкубации инсулин в еще большей степени, чем при более коротких сроках инкубации с ним, снижал образование АФК, индуцированное H₂O₂ в нейронах коры мозга. Не было выявлено достоверных различий в антиоксидантном эффекте 100 нМ или 1 мкМ инсулина при одних и тех же сроках преинкубации.

Таблица 1. Влияние инсулина на накопление активных форм кислорода при добавлении перекиси водорода при преинкубации с ним нейронов коры мозга крыс в течение 1, 5 и 20 ч.

	1 ч	5 ч	20 ч
Контроль	31.2 ± 0.6	43.1 ± 2.4	29.8 ± 0.5
Контроль + 1 мкМ Инс	29.6 ± 0.4	41.8 ± 0.5	27.1 ± 0.4
H ₂ O ₂	54.7 ± 1.0 *	78.3 ± 3.0 *	56.7 ± 4.9 *
100 нМ Инс + H ₂ O ₂	45.3 ± 2.6 *, #	67.9 ± 2.1 *, #	35.4 ± 2.1 *, #
1 мкМ Инс + H ₂ O ₂	47.4 ± 2.0 *, #	66.9 ± 1.9 *, #	39.0 ± 0.6 *, #

Примечание: Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Нейроны коры мозга инкубировали с инсулином в разных концентрациях в течение 1, 5 или 20 ч, а затем подвергали воздействию 100 мкМ H₂O₂. Различия достоверны: * - с контролем, $p < 0.01$, # – с H₂O₂, $p < 0.05$.

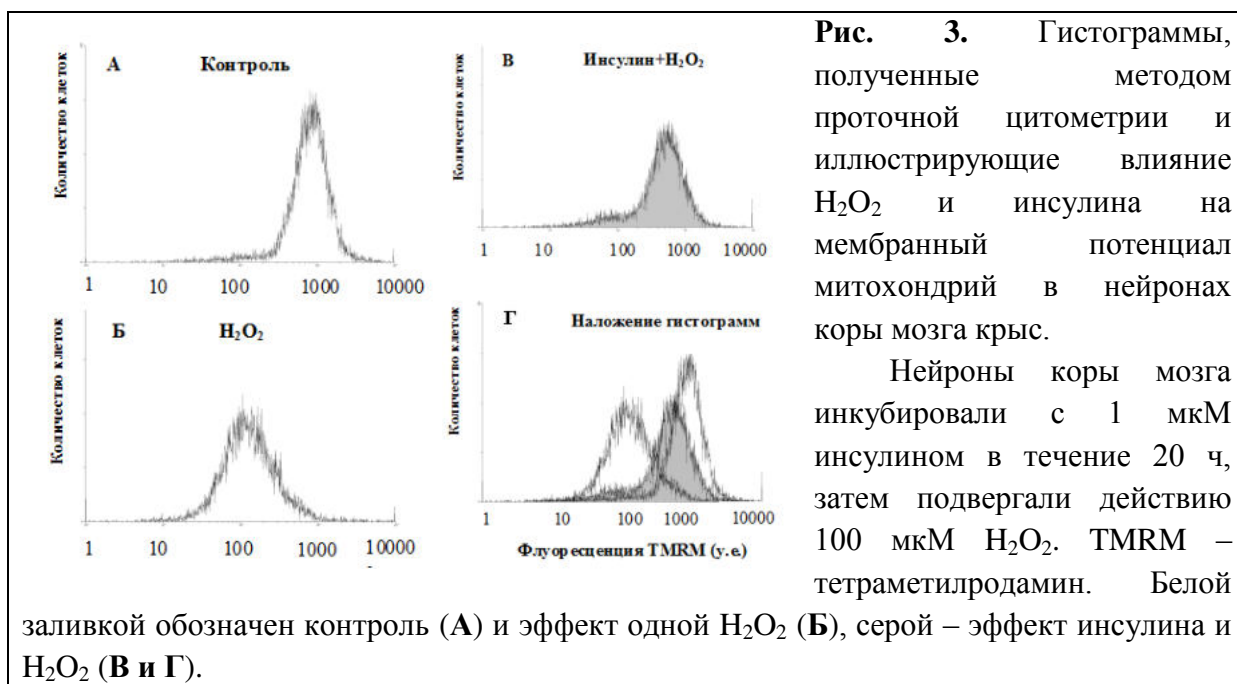
Генерация АФК зависит от состояния митохондрий, цепь переноса электронов в которых служит основным источником АФК в клетке. В связи с этим исследовали влияние инсулина на величину мембранного потенциала митохондрий $\Delta\psi(m)$ в условиях окислительного стресса методом проточной цитометрии. Найдено, что H₂O₂ достоверно снижает величину $\Delta\psi(m)$ в нейронах коры мозга, но преинкубация с 1 мкМ и 100 нМ инсулином в течение 1 ч или 20 ч повышает этот показатель (Табл. 2).

Таблица 2. Влияние инсулина при преинкубации с ним в течение 1 и 20 ч на мембранный потенциал митохондрий в нейронах коры мозга крыс при действии H₂O₂.

	Контроль	Инс, 1 мкМ	H ₂ O ₂	1мкМ Инс+H ₂ O ₂	100 нМ Инс+H ₂ O ₂
1 ч	100±0.1	97.0±1.5	80.5±1.7 *	95.9±4.9 #	95.2±1.9 #
20 ч	100±0.2	97.2±2.7	61.7±2.6 *	88.7±3.4 #	89.2±4.1 #

Инс – инсулин. Данные типичных опытов представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Нейроны инкубировали со 100 нМ или 1 мкМ инсулином в течение 1 ч или 20 ч, затем подвергали действию 100 мкМ H₂O₂. Различия достоверны: * - с контролем, $p < 0.01$, # - с H₂O₂, $p < 0.05$.

На Рис. 3 представлены гистограммы, иллюстрирующие результаты типичного опыта, полученные методом проточной цитометрии. Видно, что под влиянием H_2O_2 (Рис. 3Б) основной пик смещается влево от контроля (Рис. 3А), т.е. в область клеток с меньшей величиной мембранного потенциала митохондрий $\Delta\psi(m)$, чем в контроле. Преинкубация с инсулином до добавления прооксиданта смещает основной пик вправо в область контрольных клеток с большей величиной $\Delta\psi(m)$ митохондрий (Рис. 3В и 3Г). Таким образом, инсулин значительно уменьшает вызванное прооксидантом накопление АФК и падение $\Delta\psi(m)$ в нейронах коры мозга.

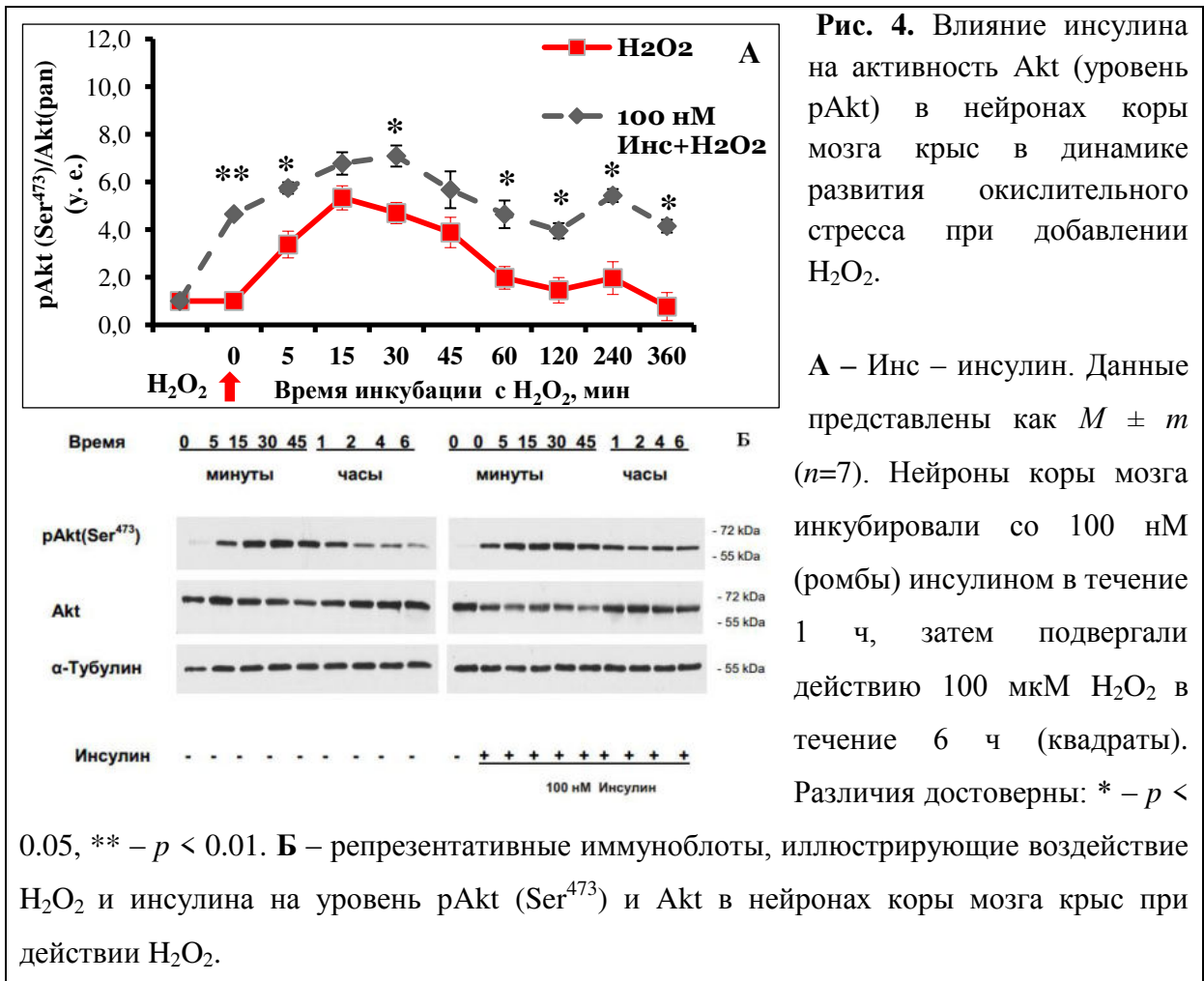


Изучение механизмов, лежащих в основе защитного действия инсулина, в динамике развития окислительного стресса в нейронах коры мозга крыс *in vitro*

Активацию инсулином PI-3-K/Akt-сигнального пути рассматривают, как основной механизм его действия [9, 11, 12, 18, 23]. Одной из мишеней Akt является киназа GSK3 β , Akt-опосредуемое фосфорилирование которой по Ser⁹ приводит к ее инактивации и ингибированию проапоптотического потенциала GSK3 β [8, 12, 20]. Важную роль в регуляции апоптоза играют белки Bax и Bcl-2, от уровня и активности которых зависит судьба клеток при неблагоприятных условиях. Мы исследовали способность инсулина модулировать активность Akt, GSK3 β и влиять на уровни про- и антиапоптотического белков Bax и Bcl-2 в динамике развития окислительного стресса в нейронах первичной культуры коры мозга крыс.

Инсулин в концентрации 100 нМ в среднем в 5 раз увеличивал базальную активность Akt, оцениваемую по уровню pAkt (Ser⁴⁷³) (Рис. 4). Перекись водорода

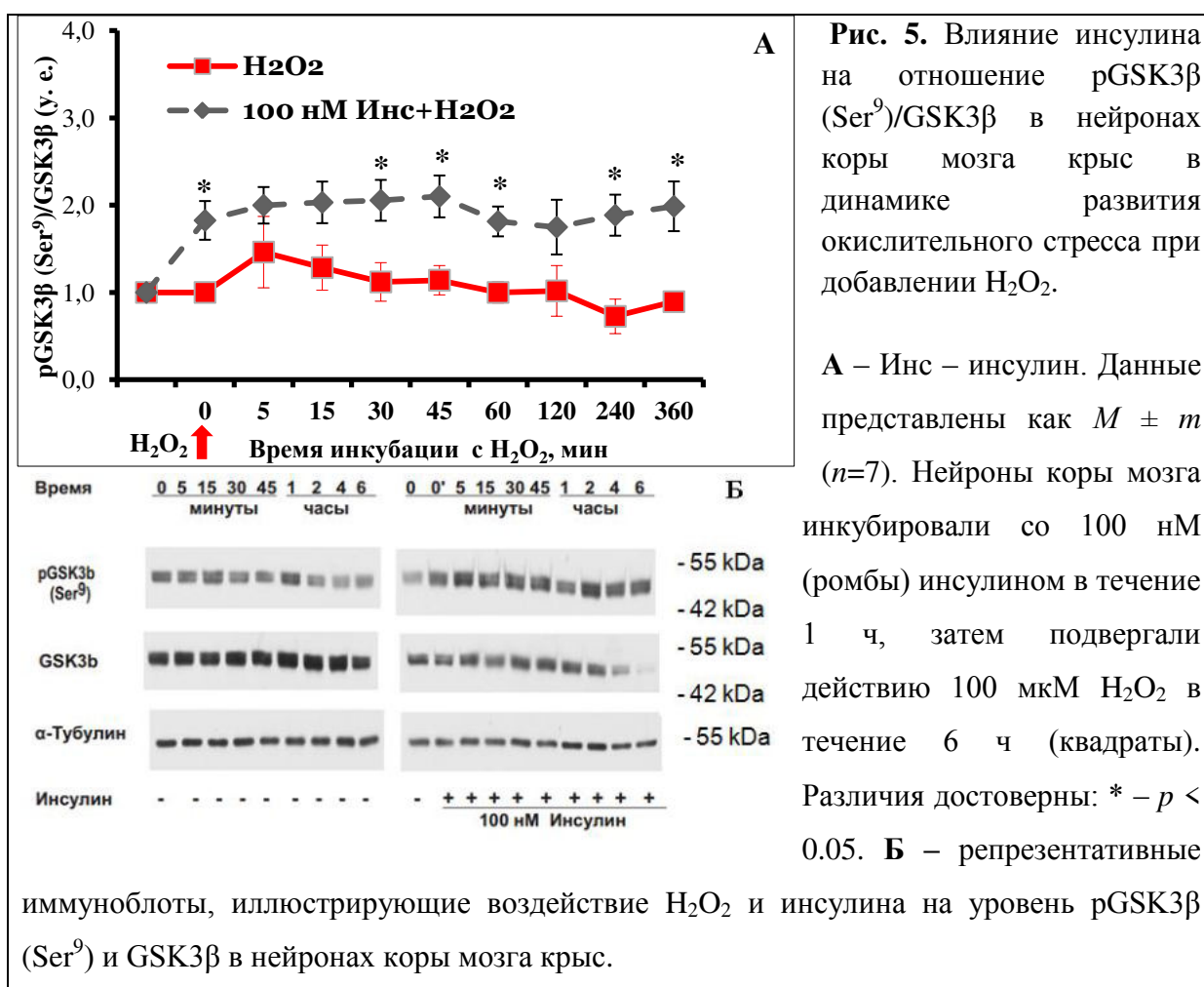
увеличивала уровень pAkt (Ser⁴⁷³) максимально через 15-30 мин после начала ее действия (Рис. 4). Это повышение может быть обусловлено компенсаторным эффектом, направленным на усиление антиапоптотического потенциала Akt. Преинкубация со 100 нМ инсулином в значительной степени повышала активность Akt на разных этапах воздействия H₂O₂ на нейроны коры мозга по сравнению с одной H₂O₂, и этот эффект сохранялся на всем протяжении эксперимента. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о том, что при действии инсулина на сенсорные нейроны ганглиев задних корешков крыс происходит быстрая и длительная (до 30 ч) активация пути PI-3-K/Akt/CREB, что приводит к нормализации функционирования митохондрий. Это иллюстрируется предотвращением падения митохондриального потенциала, повышением синтеза АТФ, увеличением доли восстановленного НАДФН в клетках, что особенно важно при окислительном стрессе [11].



Инактивация протеинкиназы GSK3 β , мишени Akt, может способствовать ингибированию апоптоза и снижению интенсивности образования АФК посредством контроля митохондриальной поры mPTP, что снижает пагубное действие окислительного стресса и повышает выживаемость нейронов. Важно подчеркнуть, что

не только окислительный стресс может приводить к падению $\Delta\psi$ (m) и открытию mPTP, но и открытие mPTP может предшествовать дальнейшей активации свободнорадикальных реакций в клетках, в том числе в нервных [24]. Поэтому инактивация GSK3 β инсулином может определять не только его защитный, но и антиоксидантный эффект.

Нами был изучен уровень pGSK3 β (Ser⁹) по отношению к уровню нефосфорилированной формы GSK3 β при действии инсулина после добавления H₂O₂ (Рис. 5). Показано, что 100 нМ инсулин повышает уровень pGSK3 β (Ser⁹) в контрольных нейронах в 1.8 раза (Рис. 5). Кривая изменения уровня pGSK3 β (Ser⁹) в нейронах коры мозга под влиянием инсулина после добавления прооксиданта не имела выраженных пиков, как было показано в случае активации Akt (Рис. 4).



Достоверное повышение уровня pGSK3 β (Ser⁹)/GSK3 β при добавлении инсулина наблюдалось с 30 мин и сохранялось в течение 6 ч по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию только одной H₂O₂, что свидетельствует об инактивации GSK3 β под влиянием инсулина.

Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 являются важнейшими регуляторами митохондриального пути апоптоза. Повышение их уровня и уменьшение

отношения Вах/Vcl-2 способствуют повышению выживаемости клеток, причем усиление Vcl-2-опосредуемых эффектов может быть следствием активации Akt. Так, IGF-1, активируя Akt-киназу и индуцируя, тем самым, фосфорилирование транскрипционного фактора CREB, стимулирует синтез Vcl-2 [17]. Однако до наших исследований сведения о стимулирующем влиянии инсулина на уровень и активность Vcl-2 в условиях окислительного стресса отсутствовали [8].

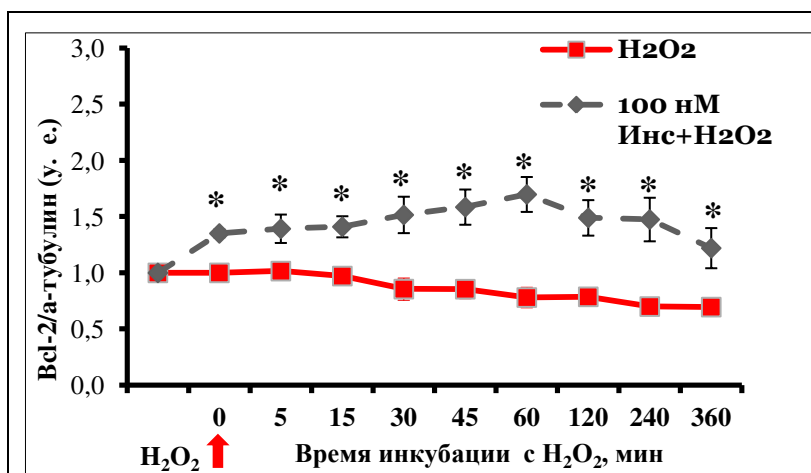
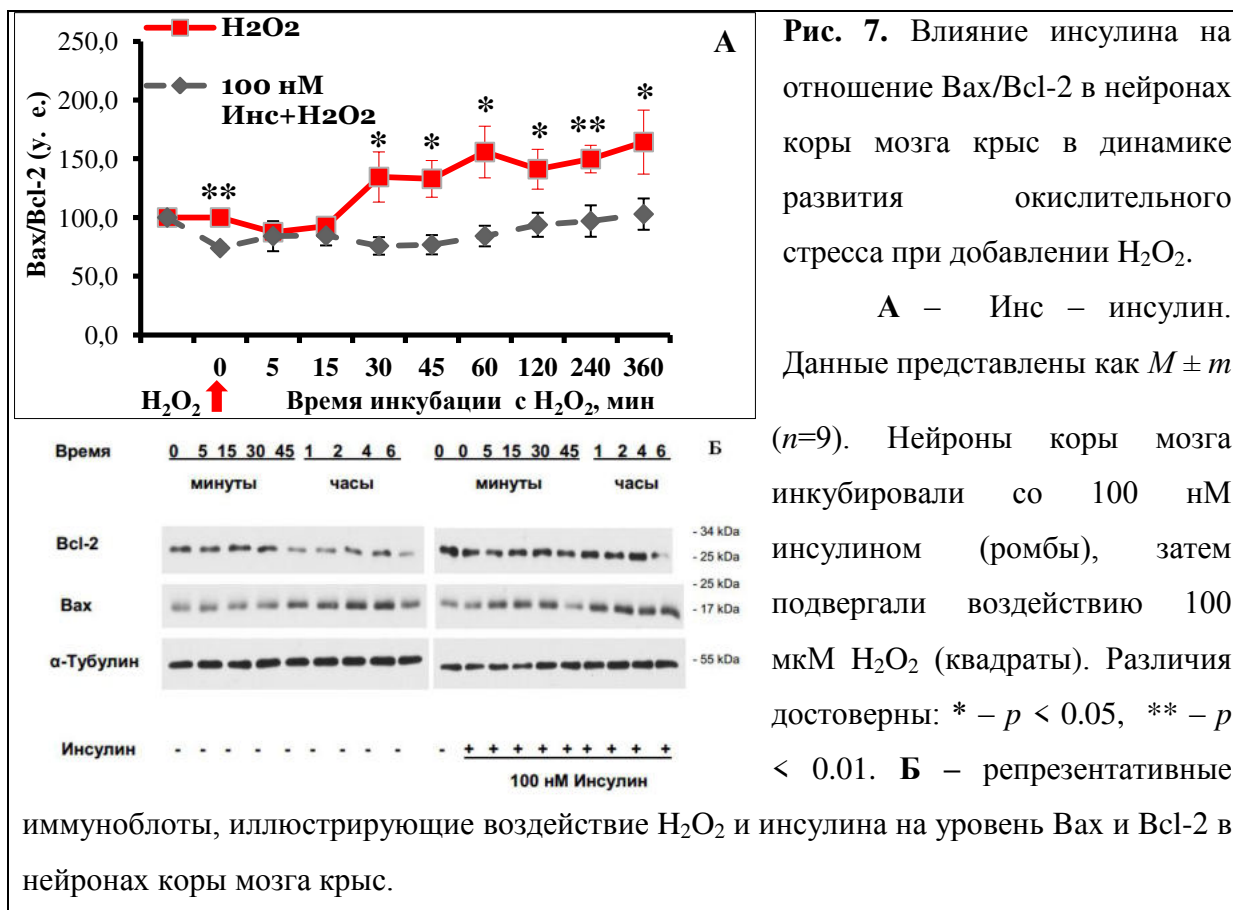


Рис. 6. Влияние инсулина на уровень антиапоптотического белка Vcl-2 в нейронах коры мозга крыс в динамике развития окислительного стресса при добавлении H₂O₂.

Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=9$). Нейроны коры мозга инкубировали с 100 нМ инсулином (ромбы) в течение 1 ч, затем их подвергали действию 100 мкМ H₂O₂ (квадраты). Различия достоверны: * – $p < 0.05$.

Нами показано, что 100 нМ инсулин достоверно повышает базальный уровень Vcl-2 на 35% (Рис. 6) и на 26% уменьшает отношение Вах/Vcl-2 в нейронах коры мозга (Рис. 7). После добавления H₂O₂ уровень Vcl-2 в нейронах постепенно снижается, через 1-6 ч после начала воздействия прооксиданта это снижение становится достоверным и составляет 0.70 ± 0.18 у. е. (Рис. 6). Преинкубация со 100 нМ инсулином на всех сроках эксперимента достоверно повышает уровень Vcl-2 в нейронах, подвергнутых воздействию прооксиданта (Рис. 6).

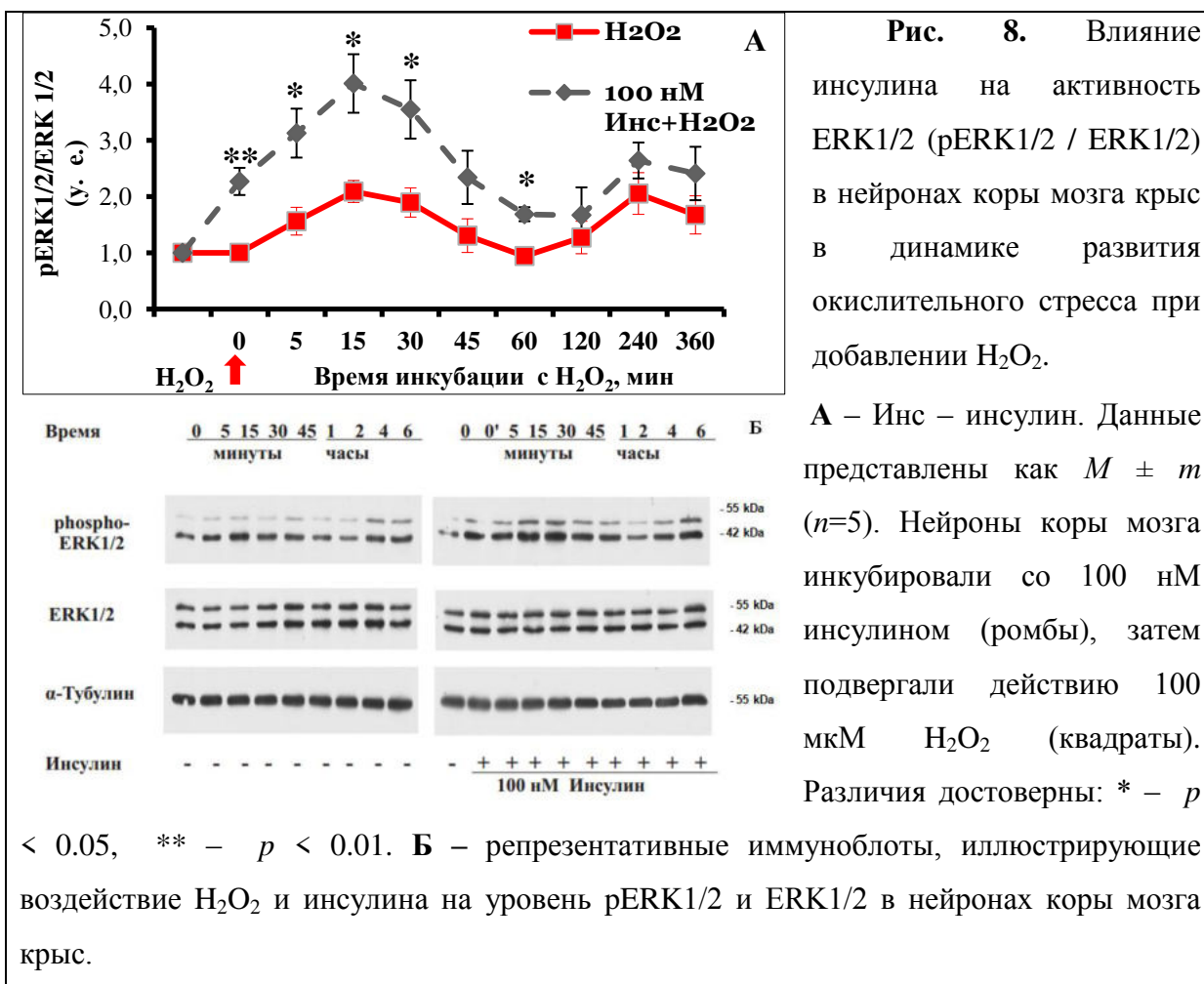
Отношение про- к антиапоптотическому белку Вах/Vcl-2 достоверно увеличивается в клетках под влиянием H₂O₂ уже через 30 мин после ее добавления и сохраняется на высоком уровне на протяжении 6 ч (Рис. 7). Увеличение доли Вах может приводить к значительному снижению жизнеспособности нейронов. Преинкубация со 100 нМ инсулином нормализует отношение Вах/Vcl-2 на разных сроках воздействия (Рис. 7). При этом эффект инсулина в нейронах в условиях окислительного стресса статистически значим, начиная с 30 мин и до 6 ч после добавления H₂O₂.



Защитное действие инсулина может быть опосредовано активацией MEK/ERK1/2 сигнального пути. Нами показано, что 100 нМ инсулин повышает базальную активность ERK1/2 в нейронах коры мозга крыс, на что указывает повышение уровня фосфорилированной формы фермента (pERK1/2) (Рис. 8). Уровень pERK1/2 в ходе преинкубации с 100 нМ инсулином в течение 1 ч возрастал с 1.0 ± 0.1 в контроле до 2.27 ± 0.24 ($p < 0.01$). При индукции окислительного стресса с помощью H₂O₂ обнаружено, что динамика изменения уровня pERK1/2 имеет двухфазный характер с двумя максимумами через 30 мин и 2 ч (Рис. 8). Преинкубация нейронов со 100 нМ и 1 мкМ инсулином увеличивала активацию ERK1/2 (уровень pERK1/2) на ранних этапах воздействия H₂O₂. Уровень pERK1/2 после инкубации нейронов коры мозга с инсулином был достоверно выше в пробах через 5 мин после добавления прооксиданта с максимумом через 15-30 мин. Достоверное повышение уровня pERK1/2 сохранялось до 60 мин после добавления H₂O₂ к нейронам, преинкубированным с инсулином. Влияния инсулина и H₂O₂ на уровень нефосфорилированной формы ERK1/2 нами выявлено не было.

Как известно, нейротрофины, флавоноиды и ганглиозиды краткосрочно активируют ERK1/2, повышая выживаемость нервных клеток. Однако длительная активация ERK1/2 при окислительном стрессе приводит к гибели нейронов. Ранняя

активация ERK1/2 повышает жизнеспособность нейронов гиппокампа при действии глутамата, тогда как поздняя активация приводит к их гибели [16].



При окислительном стрессе и других неблагоприятных условиях в нейронах отмечается активация AMPK, основного энергетического сенсора клетки [2]. Нами установлено, что H₂O₂ активирует AMPK, что отражается в повышении уровня pAMPKα (Thr¹⁷²) уже через 15 мин после воздействия H₂O₂ по сравнению с таковым в контрольных клетках, принятым за 1.0 (Рис. 9). Преинкубация нейронов с инсулином ингибирует активность AMPK, что выражается в достоверном снижении уровня pAMPKα (Thr¹⁷²) через 15, 30, 60 и 120 мин после добавления H₂O₂ (Рис. 9).

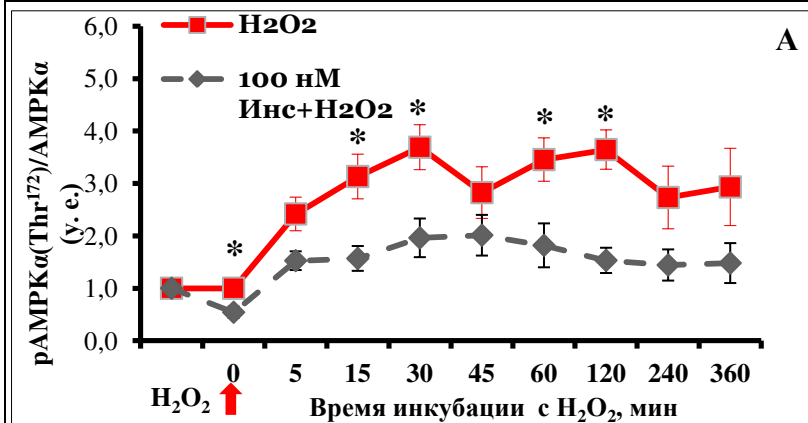
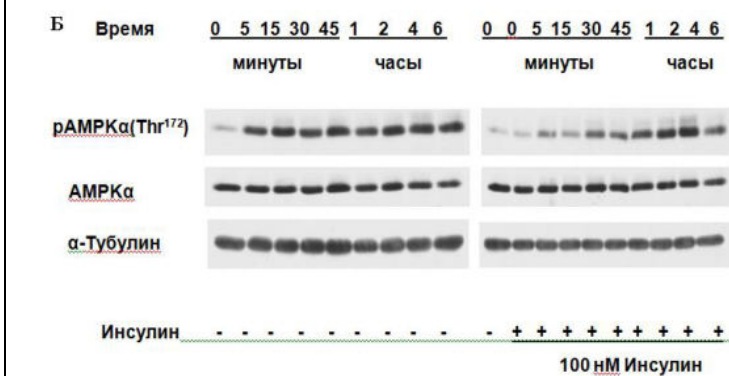


Рис. 9. Влияние инсулина на активность АМРК α (pАМРК α (Thr¹⁷²)/АМРК α) в нейронах коры мозга крыс в динамике развития окислительного стресса при добавлении H₂O₂.

А – Инс – инсулин.



Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Нейроны коры мозга инкубировали со 100 нМ инсулином (ромбы), затем подвергали действию 100 мкМ H₂O₂ (квадраты). Различия достоверны: * – $p < 0.05$. Б –

репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие воздействие H₂O₂ и инсулина на уровень pАМРК α (Thr¹⁷²) и АМРК α в нейронах коры мозга крыс.

Исследование влияния ингибиторов и активаторов протеинкиназ Akt, GSK3 β , ERK1/2 и АМРК на защитный эффект инсулина при его действии на культивируемые нейроны коры мозга крыс в условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂

Как отмечалось выше, определяющую роль в воздействии инсулина на различные типы клеток-мишеней играет активация им протеинкиназы Akt. В связи с этим, исследовали влияние LY294002, ингибитора сигнального пути PI-3-K/Akt, на защитный эффект инсулина при его действии на нейроны коры мозга в культуре и на индуцированное инсулином снижение образования АФК в этих клетках при добавлении H₂O₂. Показано, что в присутствии LY294002 защитный и антиоксидантный эффекты инсулина на нейроны коры мозга достоверно снижаются. Так, преинкубация с 1 мкМ инсулином предотвращала гибель 43.3±1.1% клеток при действии H₂O₂ (Табл. 3), в то время как при добавлении 30 мкМ LY294002 (Табл. 3) защитный эффект инсулина снижался примерно в 2 раза.

Антиоксидантный эффект инсулина также снижается в присутствии LY294002 (Табл. 4). В этой серии опытов 100 нМ инсулин снижал прооксидантное действие H₂O₂ на 94%, но в присутствии LY294002 этот эффект инсулина достоверно снижался, и уменьшение генерации АФК происходило на 41%, хотя и оставалось значимым ($p < 0.05$). Таким образом, защитный и антиоксидантный эффекты инсулина зависят от

активации им Akt-киназы, которая в свою очередь вызывает инактивацию GSK3 β и влияет на отношение Вах/Vcl-2.

Таблица 3. Влияние инсулина на показатель «rescue rates», рассчитанный в условиях окислительного стресса в присутствии ингибиторов/активаторов различных сигнальных путей.

	Rescue rates без ингибитора/активатора	Rescue rates с ингибитором/активатором
BMS-754807	43.4 \pm 1.4%	12.1 \pm 5.7% *
LY294002	43.3 \pm 1.1%	20.9 \pm 6.4% *
SL327	40.8 \pm 4.4%	21.2 \pm 6.0% #
AICAR	38.9 \pm 5.3%	19.0 \pm 5.5% #

LY294002 – ингибитор сигнального пути PI-3-K/Akt, BMS-754807 – ингибитор тирозинкиназы рецепторов инсулина и IGF-1, SL327 – ингибитор MEK1/2-киназы, AICAR – активатор AMPK. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – с группой без ингибитора, $p < 0.01$, # – с группой без ингибитора/активатора, $p < 0.05$.

Показано также, что защитный эффект инсулина на нейроны коры мозга реализуется только благодаря его взаимодействию с инсулиновыми рецепторами, расположенными на поверхности этих нейронов. Действие BMS-754807, ингибитора тирозинкиназы рецепторов инсулина и IGF-1, полностью подавляло защитный эффект инсулина (Табл. 3 и 4).

При изучении вклада ERK1/2 в реализацию защитного и антиоксидантного действия инсулина использовали SL327, ингибитор MEK1/2-киназ, мишенью которых являются протеинкиназы ERK1/2. В присутствии SL327 защитное и антиоксидантное действие инсулина снижалось при добавлении H₂O₂ (Табл. 3 и 4). Преинкубация с 1 мкМ инсулином повышала выживаемость нейронов на 16% при действии H₂O₂, в то время в присутствии SL327 выживаемость повышалась лишь на 9.4%, хотя эффект инсулина оставался достоверным (Табл. 4). Сходный эффект выявлен и при изучении образования АФК при инкубации с инсулином и SL327. В присутствии ингибитора вызываемая перекисью водорода генерация АФК в нейронах, преинкубированных с инсулином, оставалась на высоком уровне, хотя и была достоверно ниже, чем в отсутствие инсулина (Табл. 4).

Далее изучали влияние AICAR, активатора AMPK, на способность инсулина нормализовать активность AMPK в нейронах в условиях окислительного стресса (Рис. 9). Преинкубация с 100 мкМ AICAR приводила к достоверному снижению уровня rescue rates (Табл. 3) с 38.9 \pm 5.3% до 19.0 \pm 5.5%. Возможно, что регуляция инсулином активности AMPK важна для проявляемого им защитного действия.

Таблица 4. Снижение защитного и антиоксидантного эффектов инсулина на нейроны коры мозга в условиях окислительного стресса в присутствии LY294002 (ингибитора сигнального пути PI-3-K/Akt), BMS-754807 (ингибитора тирозинкиназы рецепторов инсулина и IGF-1) и SL327 (ингибитора MEK1/2-киназы).

	Контроль	H ₂ O ₂	Инс+H ₂ O ₂	Контроль+BMS	H ₂ O ₂ +BMS	Инс+H ₂ O ₂ +BMS
Выживаемость, % от контроля	100±0.1	60.1±0.7 *	77.5±2.1 *, x	78.1±4.4	56.7±2.0 &	58.4±3.2 &
	Контроль	H ₂ O ₂	Инс+H ₂ O ₂	Контроль+LY	H ₂ O ₂ +LY	Инс+H ₂ O ₂ +LY
Выживаемость, % от контроля	100±0.2	68.4±1.9 *	80.8±1.5 *, x	87.3±2.5	72.2±2.2 &	75.7±0.7 &
Образование АФК, у. е.	37.3±0.1	116.3±3.7 *	60.1±2.3 *, x	24.8±2.3 *	101.7±2.7 &	72.3±4.4 &, #
	Контроль	H ₂ O ₂	Инс+H ₂ O ₂	Контроль+SL	H ₂ O ₂ +SL	Инс+H ₂ O ₂ +SL
Выживаемость, % от контроля	100±0.3	74.8±2.4	86.8±3.5	101.8±2.2	69.6±1.4	76.2±1.8
Образование АФК, у. е.	41.3±1.0	81.3±1.3 *	57.1±2.2 *, x	36.2±2.0	79.8±1.4 *	72.8±2.4 *, #

Инс – инсулин, LY – LY294002, BMS – BMS-754807, SL – SL327. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Различия достоверны: * – с контролем, $p < 0.01$; x – с H₂O₂, $p < 0.01$; & – с контролем + LY294002/BMS-754807/SL327, $p < 0.05$; # – с H₂O₂+LY2949002/ H₂O₂+ SL327, $p < 0.05$.

Влияние интраназально вводимого инсулина на процессы перекисного окисления липидов, активность и экспрессию Na⁺, K⁺-АТФазы и супероксиддисмутазы, уровень общего глутатиона и экспрессию генов про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2 при двухсосудистой ишемии мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией

Изучали влияние инсулина, вводимого интраназально, в дозе 0.5 МЕ/крысу на уровень продуктов ПОЛ, а также на активность Na⁺, K⁺-АТФазы в коре мозга крыс, перенесших ишемию переднего мозга и последующей реперфузией (ИР). Показано, что в коре мозга крыс, подвергнутых ИР, достоверно повышаются уровни таких продуктов ПОЛ, как ДК, ТК и ОШ. Обнаружено также снижение активности Na⁺, K⁺-АТФазы и экспрессии гена ее каталитической субъединицы *Atp1a2* по сравнению с группой ЛО (Табл. 5, Рис. 10). Инсулин вызывал достоверное снижение содержания таких продуктов ПОЛ, как ДК, ТК и оснований Шиффа в коре мозга крыс, подвергнутых ИР (Табл. 5). Достоверных изменений в содержании ТБК-АП в коре мозга крыс, как при ИР, так и при введении инсулина крысам, подвергнутым ИР, выявлено не было. Антиоксидантное действие инсулина, показанное нами и другими авторами *in vitro*, а также механизмы, лежащие в основе этого эффекта, могут иметь место и *in vivo* в

условиях активации свободнорадикальных процессов при ишемии и реперфузии мозга [4, 9, 14]. Интраназальное введение крысам 0.5 МЕ инсулина предотвращало снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы и экспрессии гена *Atp1a2* под влиянием ИР. Установлено, что ИР сопровождается повышением активности СОД в митохондриальной фракции на 47% (Табл. 5). При этом не было обнаружено изменений в активности СОД в цитоплазматической фракции коры головного мозга крыс, перенесших ИР. Интраназальное введение крысам инсулина в дозе 0.5 МЕ при ИР не влияло на активность этого фермента в цитоплазматической фракции, но в значительной степени снижало его активность в митохондриальной фракции (Табл. 5).

Таблица 5. Защитное действие инсулина, вводимого интраназально, в дозе 0.5 МЕ/крысу на уровень продуктов ПОЛ, активность Na^+ , K^+ -АТФазы и супероксиддисмутазы и уровень общего глутатиона в коре мозга крыс, перенесших ишемию переднего мозга и последующей реперфузией.

Крысы	Ложно-оперированные	Ишемия и реперфузия	Ишемия и реперфузия + инсулин
Показатель			
Диеновые конъюгаты, у. е./мг липидов	58±2.7	76±6.2 *	59.8±5.5 #
Триеновые конъюгаты, у. е./мг липидов	14.1±0.6	17.9±1.6 *	13.5±1.0 #
Основания Шиффа, у. е./мг липидов	102.1±14.7	199.0±26.6 *	119.4±22.0 #
ТБК-АП, нмоль/мг белка	0.153±0.007	0.173±0.014	0.164±0.012
Глутатион общий, цитоплазм. фракция, мкмоль/мг белка	0.144±0.004	0.166±0.015	0.354±0.021 #
Глутатион общий, митохонд. фракция, мкмоль/мг белка	0.148±0.008	0.146±0.010	0.100±0.004 #
Na^+ , K^+ -АТФаза, мкмоль Фн/мг белка/ч	22.4±1.0	15.9±0.8 *	22.5±2.8 #
Активность СОД, цитоплазм. фракция, у. е./мг белка	0.454±0.060	0.497±0.081	0.438±0.053
Активность СОД, митохонд. фракция, у. е./мг белка	0.400±0.051	0.588±0.040 *	0.245±0.058 #

Примечание – Данные представлены как $M \pm m$ из 7 опытов. Различия достоверны: * – по сравнению с ложно-оперированными животными; # – по сравнению с крысами, подвергнутыми двухсосудистой ишемии и реперфузии без обработки инсулином, $p < 0.05$.

При введении инсулина крысам, перенесшим ИР, содержание общего глутатиона повышалось в цитоплазматической фракции и уменьшалось в митохондриальной фракции коры мозга (Табл. 5). Из данных литературы известно, что защитное действие инсулина связывают с его способностью стимулировать глутатионредуктазу и ингибировать глутатионпероксидазу, что позволяет поддерживать на высоком уровне соотношение GSH/GSSH [7].

Мы предположили, что инсулин может влиять на экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты в условиях окислительного стресса, который развивается при ишемии-реперфузии мозга. Показано, что в группе ИР происходит достоверное снижение экспрессии гена цитоплазматической формы СОД *Sod1* и наблюдается тенденция к снижению экспрессии митохондриальной формы СОД ($p = 0.082$, Рис. 10). Интраназальное введение инсулина препятствует снижению экспрессии исследуемых генов и повышает уровень мРНК для *Sod1* в 1.7 раза по сравнению с ЛО и в 2.8 раза по сравнению с группой ИР. Наряду с этим, выявлена нормализация экспрессии *Sod2*.

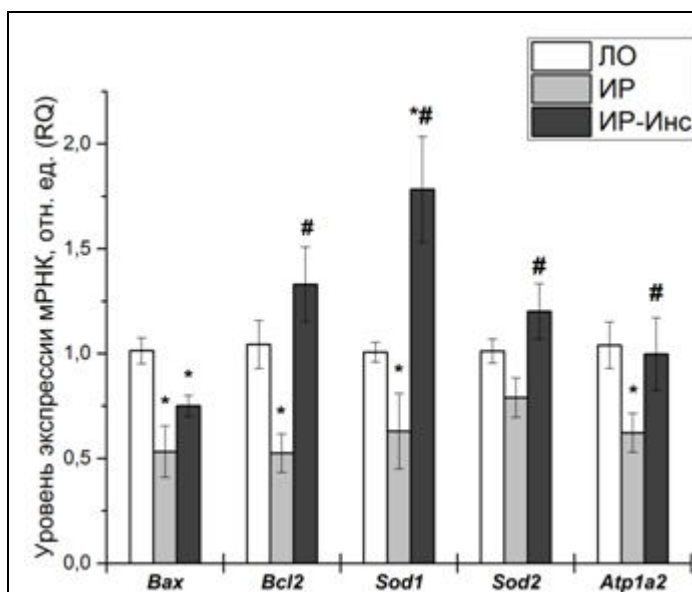


Рис. 10. Влияние интраназального введения инсулина на экспрессию генов супероксиддисмутазы 1 и 2 (*Sod1*, *Sod2*), каталитической субъединицы $\alpha 2$ Na^+ , K^+ -АТФазы (*Atp1a2*) и про- и антиапоптотических белков *Bax* и *Bcl-2* (*Bax*, *Bcl-2*) в коре мозга крыс в условиях двухсосудистой ишемии головного мозга и реперфузии.

ЛО – ложно-оперированные крысы, ИР – крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии и реперфузии, ИР-Инс – крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии и реперфузии и получавшие инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ из 7 опытов. Различия достоверны: * – по сравнению с группой ЛО, $p < 0.05$; # – по сравнению с группой ИР, $p < 0.05$.

Нами показано увеличение уровня *Bcl-2 in vitro* при действии инсулина на нейроны коры мозга крыс в условиях окислительного стресса (Рис. 6). *In vivo* мы оценивали экспрессию генов, кодирующих белки *Bax* и *Bcl-2*, при ишемии и реперфузии в условиях обработки животных инсулином. Показано, что в коре мозга крыс, подвергнутых ИР, наблюдали значительное уменьшение экспрессии генов *Bax* (в 1.9 раз) и *Bcl2* (в 2 раза) по сравнению с группой ЛО (Рис. 10). Интраназальное введение инсулина нормализовало экспрессию гена антиапоптотического белка *Bcl-2*,

но не влияло на экспрессию гена *Bax* в коре мозга крыс, подвергнутых ишемии и реперфузии (Рис. 10).

Выводы

1. Инсулин обладает защитным, в том числе антиапоптотическим, эффектом при его действии на культивируемые нейроны коры мозга крыс, подвергнутые воздействию перекиси водорода. Защитный эффект инсулина является дозозависимым в наномолярном диапазоне его концентраций ($1 \text{ нМ} < 10 \text{ нМ} < 100 \text{ нМ}$ и/или 1 мкМ). Антиапоптотическое действие инсулина включает снижение активности каспазы-3 и содержания расщепленного фрагмента каспазы-3, повышение которых обнаружено при действии на нейроны перекиси водорода.
2. Инсулин предотвращает как повышение образования активных форм кислорода, вызванное действием перекиси водорода на нейроны коры мозга крыс, так и падение мембранного потенциала митохондрий в этих клетках в условиях окислительного стресса.
3. Вызываемое инсулином повышение выживаемости нейронов коры мозга, подвергнутых действию перекиси водорода, обусловлено его способностью модулировать активность ряда протеинкиназ. Через посредство специфичных к нему рецепторов инсулин активирует протеинкиназу В (Akt), инактивирует киназу гликогенсинтазы-3 β (GSK3 β) и нормализует соотношение про- и антиапоптотического белков *Bax/Bcl-2*. В присутствии ингибитора тирозинкиназы рецептора инсулина и инсулинподобного фактора роста-1 и ингибитора сигнального пути PI-3-K/Akt антиоксидантное и защитное действие инсулина подавляется в нейронах коры мозга крыс в условиях окислительного стресса.
4. Инсулин активирует ERK1/2, киназу, регулируемую внеклеточными сигналами, и ингибирует AMPK, АМФ-активируемую протеинкиназу, что является одним из механизмов его защитного эффекта при действии на нейроны коры мозга крыс в динамике развития окислительного стресса. В присутствии ингибитора ERK1/2 и активатора AMPK защитный эффект инсулина блокируется.
5. Инсулин при однократном интраназальном введении крысам перед проведением двухсосудистой ишемии мозга и реперфузии снижает накопление продуктов перекисного окисления липидов (диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа), повышает экспрессию гена антиапоптотического белка *Bcl-2* и генов супероксиддисмутазы 1 и 2, а также нормализует экспрессию и активность Na^+ , K^+ -АТФазы в коре мозга животных.

Список публикаций по теме работы

Статьи:

1. **Зорина И. И.**, Баюнова Л. В., Захарова И. О., Аврова Н. Ф. Зависимость защитного эффекта инсулина от его концентрации и модуляции активности ERK1/2 в нейронах коры мозга при окислительном стрессе //Нейрохимия. – 2018. – Т. 35. – №. 2. – С. 101-106.

Zorina I. I., Bayunova L. V., Zakharova I. O., Avrova N. F. The Dependence of the protective effect of insulin on its concentration and modulation of ERK1/2 activity under the conditions of oxidative stress in cortical neurons //Neurochemical Journal. – 2018. – Т. 12. – №. 1. – С. 111-116. doi: 10.1134/S1819712417040110.

2. Баюнова Л. В., **Зорина И. И.**, Захарова И. О., Аврова Н. Ф. Инсулин повышает жизнеспособность нейронов коры мозга крыс и нормализует отношение Bax/Bcl-2 при окислительном стрессе //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165. – №. 1. – С. 20-24.

Bayunova L. V., **Zorina I. I.**, Zakharova I. O., Avrova N. F. Insulin increases viability of neurons in rat cerebral cortex and normalizes Bax/Bcl-2 ratio under conditions of oxidative stress //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Т. 65. – №. 1. – С. 14-17. doi: 10.1007/s10517-018-4088-8.

3. Захарова И. О., Соколова Т. В., **Зорина И. И.**, Баюнова Л. В., Рычкова М. П., Аврова Н. Ф. Защитный эффект инсулина на нейроны коры мозга крыс при окислительном стрессе, вклад активации протеинкиназы b (Akt) //Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2018. – Т. 54. – №. 3. – С. 169-179.

Zakharova I. O., Sokolova T. V., **Zorina I. I.**, Bayunova L. V., Rychkova M. P., Avrova N. F. Protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on modulation of protein kinase B (Akt) Activity //J. Evol. Biochem. Phys. – 2018. – Т. 54. – №. 3. – С. 192-204. doi: 10.1134/S0022093018030043.

4. **Зорина И. И.**, Захарова И. О., Баюнова Л. В., Аврова Н. Ф. Введение инсулина крысам предотвращает накопление диеновых и триеновых конъюгатов и инактивацию Na⁺, K⁺-АТФ-азы в коре мозга при двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии //Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2018. – Т. 54. – №. 3. – С. 215-217.

Zorina I. I., Zakharova I. O., Bayunova L. V., Avrova N. F. Insulin administration prevents accumulation of conjugated dienes and trienes and inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat cerebral cortex during two-vessel forebrain ischemia and reperfusion //J. Evol. Biochem Phys. – 2018. – Т. 54. – №. 3. – С. 246-249. doi: 10.1134/S0022093018030109.

5. **Зорина И. И.**, Галкина О.В., Баюнова Л. В., Захарова И. О. Влияние инсулина на уровень перекисного окисления липидов и содержание глутатиона при двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс и реперфузии //Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55. – №. 4. – С. 97-99.

6. Zakharova I. O., Sokolova T. V., Bayunova L. V., **Zorina I. I.**, Rychkova M. P., Shpakov A. O., Avrova N. F. The protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on the modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK activities //International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 15. – С. 3702. doi: 10.3390/ijms20153702.

Тезисы

1. **Зорина И. И.**, Захарова И. О., Баюнова Л. В., Власова Ю. А., Рычкова М. П., Аврова Н. Ф. Защитный и антиоксидантный эффекты инсулина на клетки коры мозга при действии перекиси водорода //XV Всероссийское Собрание с международным участием и восьмая Школа по эволюционной физиологии. Сборник материалов. Санкт-Петербург, 17–22 октября 2016 г. – С. 93.

2. **Зорина И. И.**, Захарова И. О., Баюнова Л. В., Аврова Н. Ф. Аддитивный защитный эффект инсулина и альфа-токоферола на нейроны коры мозга при окислительном стрессе //Всероссийская конференция с международным участием «Окислительный стресс в психиатрии и неврологии», 20-21 октября 2016. Сборник материалов. – С. 34.
3. **Зорина И. И.** Влияние инсулина на жизнеспособность нейронов коры мозга при окислительном стрессе, на образование активных форм кислорода и отношение Вах/Bcl2 в этих клетках //«Студенческая наука – 2017». Материалы Всероссийского научного форума студентов и молодых ученых с международным участием. Под ред. Багатурия Г. О. – Издание СПбГПМУ, 2017. – С. 310.
4. **Зорина И. И.**, Захарова И. О., Баюнова Л. В., Аврова Н. Ф. Зависимость защитного эффекта инсулина от его концентрации и модуляции активности ERK1/2 в нейронах коры мозга при окислительном стрессе //БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 21-я Международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых. 17-21 апреля 2017 г., Пушкино. Сборник тезисов. – 2017. – С. 130-131.
5. **Zorina I.**, Zakharova I., Bayunova L., Sokolova T., Avrova N. On the mechanism of protective and antioxidative effect of insulin on brain cortical neurons under conditions of oxidative stress //FENS Regional Meeting, Pecs, Hungary. – 2017. – С. 68.
6. Аврова Н. Ф., Захарова И. О., Соколова Т. В., Баюнова Л. В., **Зорина И. И.** Механизм защитного действия инсулина на нервные клетки при окислительном стрессе //XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова. – 2017. – С. 580-582.
7. Савельева Л. О., **Зорина И. И.**, Галкина О. В., Баюнова Л. В., Захарова И. О. Инсулин снижает активность супероксиддисмутазы при ишемии и реперфузии мозга крыс //Всероссийский конгресс «Боткинские чтения», Санкт-Петербург. – 21-22.05.2018. – С. 333-334.
8. **Зорина И. И.**, Бахтюков А.А., Галкина О.В., Баюнова Л.В., Захарова И.О. Инсулин способствует уменьшению развития окислительного стресса при ишемии и реперфузии мозга крыс //XIV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2018. – С. 220.
9. Сухов И. Б., Захарова И. О., Баюнова Л. В., **Зорина И. И.**, Шпаков А.О., Аврова Н.Ф. Изучение влияния интраназально вводимых ганглиозидов и их смеси с инсулином на пространственную память у крыс с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа //XIV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2018. – С. 445.
10. **Зорина И. И.**, Манина Ю. Г. Зависимость защитного эффекта инсулина на нейроны коры мозга в условиях окислительного стресса от модуляции активности протеинкиназы b (АКТ) и ERK 1/2 //Международная медико-биологическая научная конференция молодых учёных "Фундаментальная наука и клиническая медицина" (Ежегодная Всероссийская конференция "Человек и его здоровье", Санкт-Петербург. – 2018. – С. 153-154.
11. **Zorina I. I.**, Zakharova I. O., Bayunova L. V., Sokolova T. V., Avrova N. F. Protective effect of insulin on brain cortical cells of rats subjected to two-vessel forebrain ischemia and on cultured brain cortical neurons under oxidative stress conditions // 11th FENS. – 7-11.07.2018, Berlin. – Abstract: 2001.
12. Ryzhov J. R., **Zorina I. I.**, Bayunova L. V., Zakharova I. O. Insulin action on the expression level of pro- and apoptotic proteins Bax and Bcl2 under ischemia and reperfusion in the rat brain //Neurochemical Journal. – 2018. – Т. 12. – №. 4. – С. 80. doi: 10.1134/S1819712418040050.
13. Бахтюков А. А., Рыжов Ю. Р., **Зорина И. И.** Изучение влияния инсулина на уровень экспрессии генов SOD1 и SOD2 при двухсосудистой ишемии и реперфузии мозга крыс //Материалы Всероссийской молодежной конференции с международным

участием «Современные аспекты интегративной физиологии». – 9–11 октября 2018 г. Санкт-Петербург. – С. 23-24.

14. **Зорина И. И.**, Сухов И. Б., Захарова И. О., Баюнова Л. В., Шпаков А. О., Аврова Н. Ф. Влияние интраназального введения ганглиозидов и инсулина в сочетании с ганглиозидами на пространственную память у крыс с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа //Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. – 19-24 ноября 2018 г, Институт биомедицинских систем и технологий. – С. 76-78.

15. **Zorina I. I.**, Saveleva L. O., Bakhtyukov A. A., Shpakov A.O. Intranasal insulin administration normalizes the gene expression of antioxidant enzymes in the two-vessel ischemia and reperfusion in the rat brain //Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2018. – Т. 50. – №. 6. – С. 136(602-602). doi: 10.1007/s10863-018-9775-7.

16. Фокина Е. А., **Зорина И. И.**, Баюнова Л. В., Захарова И. О., Шпаков А. О. Интраназальный инсулин уменьшает повреждение головного мозга при двухсосудистой ишемии и реперфузии головного мозга крыс //Нейронаука для медицины и психологии: XV Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия. – 30 мая – 10 июня 2019 г.: Труды Конгресса. – С. 429-430. doi: 10.29003/m600.sudak.ns2019-15/429-430.

17. Перминова А. А., **Зорина И. И.** Защитное действие инсулина в модели депривации глюкозы и кислорода на культуре кортикальных нейронов крысы // Трансляционная медицина. – Т. 6. – №. S1. – С. 204.

Список цитируемой литературы

1. Путилина Ф.Е. и др. Практикум по свободнорадикальному окислению //Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета. – Санкт-Петербург. – 2006. – 108 с.
2. Auciello F.R., Ross F.A., Ikematsu N., Hardie D.G. Oxidative stress activates AMPK in cultured cells primarily by increasing cellular AMP and/or ADP //FEBS Lett. – 2014. – Т. 588. – С. 3361-3366.
3. Blázquez E., Velázquez E., Hurtado-Carneiro V., Ruiz-Albusac J.M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease //Front Endocrinol. – 2014. – Т. 5. – С. 1-21.
4. Collino M. *et al.* Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3 β //Diabetes. – 2009. – Т. 58. – №. 1. – С. 235-242.
5. Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats //Hormone and Metabolic Research. – 2015. – Т. 47. – №. 12. – С. 916-924.
6. Dodd G. T., Tiganis T. Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis //Journal of neuroendocrinology. – 2017. – Т. 29. – №. 10. – С. e12513.
7. Duarte A. I. *et al.* Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons—involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses //Free Radical Biology and Medicine. – 2005. – Т. 39. – №. 7. – С. 876-889.
8. Duarte A. I. *et al.* Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 β signaling pathways and changes in protein expression //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2008. – Т. 1783. – №. 6. – С. 994-1002.
9. Duarte A. I., Moreira P. I., Oliveira C. R. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone //Journal of aging research. – 2012. – Т. 2012. – С. 1-21.
10. Filippi B. M. *et al.* Insulin activates Erk1/2 signaling in the dorsal vagal complex to inhibit glucose production //Cell metabolism. – 2012. – Т. 16. – №. 4. – С. 500-510.

11. Huang T. J., Verkhatsky A., Fernyhough P. Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons //Molecular and Cellular Neuroscience. – 2005. – T. 28. – №. 1. – C. 42-54.
12. Hui L. *et al.* The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation //Brain research. – 2005. – T. 1052. – №. 1. – C. 1-9.
13. Leon A. *et al.* Activation of (Na⁺, K⁺)-ATPase by nanomolar concentrations of GM1 ganglioside //Journal of neurochemistry. – 1981. – T. 37. – №. 2. – C. 350-357.
14. Lioutas V. A., Novak V. Intranasal insulin neuroprotection in ischemic stroke //Neural regeneration research. – 2016. – T. 11. – №. 3. – C. 400.
15. Lochhead J. J. *et al.* Distribution of insulin in trigeminal nerve and brain after intranasal administration //Scientific reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 2621.
16. Luo Y., DeFranco D.B. Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress //J Biol Chem. – 2006. – T. 281. – №. 24. – C. 16436-16442.
17. Pugazhenti S. *et al.* Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein //J. Biol. Chem. – 2000. – T. 275. – C. 10761-10766.
18. Ramalingam M., Kim S.J. Insulin exerts neuroprotective effects via Akt/Bcl-2 signaling pathways in differentiated SH-SY5Y cells //J. Recept. Signal Transduct. Res. – 2015. – T. 35. – №. 1. – C. 1-7.
19. Raval A. P., Liu C., Hu B. R. Rat model of global cerebral ischemia: the two-vessel occlusion (2VO) model of forebrain ischemia //Animal Models of Acute Neurological Injuries. – Humana Press. – 2009. – C. 77-86.
20. Ryu B. R. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I //Journal of neurobiology. – 1999. – T. 39. – №. 4. – C. 536-546.
21. Sanderson T. H. *et al.* Molecular mechanisms of ischemia–reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation //Molecular neurobiology. – 2013. – T. 47. – №. 1. – C. 9-23.
22. Santiago J. C. P., Hallschmid M. Outcomes and clinical implications of intranasal insulin administration to the central nervous system // Exp Neurol. – 2019. – T. 317. – C. 180-190.
23. Shpakov A. O., Derkach K. V., Berstein L. M. Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases // Future science OA. – 2015. – T. 1. – №. 3.
24. Yang K. *et al.* The key roles of GSK-3 β in regulating mitochondrial activity //Cellular Physiology and Biochemistry. – 2017. – T. 44. – №. 4. – C. 1445-1459.
25. Zakharova I. O. *et al.* The protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on the modulation of Akt, GSK-3 β , ERK1/2, and AMPK activities //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 15. – C. 3702.