

ЗОРИНА ИННА ИГОРЕВНА

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА
НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO* И ЕГО ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03.01.04 – Биохимия

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научный руководитель:

Шпаков Александр Олегович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Дубинина Елена Ефимовна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения клинической и лабораторной диагностики, нейрофизиологии и нейровизуальных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Тарасова Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «21» апреля 2020 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу:

194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44), а также на сайте: <http://www.iephb.ru/sovet.htm>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,



доктор биологических наук

/Р.Г. Парнова/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Окислительный стресс в значительной степени ответственен за повреждение и гибель нервных клеток головного мозга при ишемических (включая инсульт) и нейродегенеративных патологиях, а также при диабетической энцефалопатии. Эти нарушения функций ЦНС 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 (Duarte *et al.*, 2012; Blazquez *et al.*, 2014; Shpakov *et al.*, 2015; Суркова и др., 2019а, 2019б). Инсулин оказывает нейропротекторное действие с помощью 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 (Duarte *et al.*, 2012; Blazquez *et al.*, 2014; Shpakov *et al.*, 2015; Lioutas, Novak, 2016). Нейропротекторный эффект инсулина реализуется через внутриклеточные сигнальные каскады, включающие инсулинрецепторные субстраты, фосфатидилинозитол-3-киназу (PI-3-К), протеинкиназу Akt, протеинкиназу mTOR, рибосомальную киназу p70-S6K, киназу-3 β гликогенсинтазы (GSK3 β) (Hui *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005, 2008, 2012; Ramalingam, Kim, 2015). В нервных клетках инсулин и родственный ему инсулиноподобный фактор роста-1 в условиях *in vivo* и *in vitro* активируют киназы ERK1/2, ключевой компонент каскада митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK) (Filippi *et al.*, 2012). Однако в условиях окислительного стресса влияние инсулина на активность Akt-киназы и ERK1/2 в нейронах коры мозга и в других типах нервных клеток изучалось, как правило, в одной-трех временных точках после начала его воздействия. Следствием этого стали весьма противоречивые результаты. Не определено, как в условиях окислительного стресса инсулин воздействует на активность GSK3 β – показано как ингибирование фермента инсулином, так и отсутствие влияния (Duarte *et al.*, 2008). Практически не изучено влияние инсулина на активность АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) при индукции окислительного стресса, хотя AMPK является основным энергетическим сенсором клетки и играет определяющую роль в обеспечении энергией компонентов антиоксидантной системы (Auciello *et al.*, 2014). В связи с этим актуальным является изучение влияния инсулина на эти показатели при развитии окислительного стресса, что и было проведено в данном исследовании.

Защитный эффект инсулина в значительной степени зависит от его влияния на окислительно-восстановительные процессы в клетке (Collino *et al.*, 2009; Ramalingam, Kim, 2015), что обусловлено, в том числе функциональной активностью про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2. В ряде работ показано, что антиапоптотический белок Bcl-2 способствует снижению уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках (Duarte *et al.*, 2012; Blazquez *et al.*, 2014). В то же время повышение уровня проапоптотического белка Вах, напротив, усиливает интенсивность образования АФК, что приводит к развитию окислительного повреждения молекул. Известно, что инсулин повышает уровень Bcl-2 в нейронах коры мозга (Duarte *et al.*, 2008; Ramalingam, Kim, 2014, 2015). При этом его влияние на экспрессию белка Вах и отношение Вах/Bcl-2 остаются малоизученными.

Острая ишемия мозга является комплексным патологическим процессом, при котором важнейшую роль играет окислительный стресс (Гусев, Чуканова, 2015). Ухудшение мозгового кровотока приводит к истощению запасов энергии, что запускает каскад нарушений. Ишемия мозга сопровождается образованием активных форм кислорода и азота, окислительным стрессом, нарушением функций митохондрий, эксайтотоксичностью, ингибированием синтеза белка и активацией процессов воспаления. Это приводит к нарушению функционирования сигнальных каскадов мозга, результатом чего является гибель нейронов путем апоптоза, некроза или аутофагии (Sanderson *et al.*, 2013). При реперфузии мозга, то есть при

восстановлении кровотока, отмечается дальнейшее усугубление запущенных в ходе аноксии процессов, в том числе интенсификация свободнорадикальных реакций, что ведет к накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной инаktivации транспортеров, в том числе Na^+/K^+ -АТФазы, важнейшего маркера функциональной активности нейронов. Состояние антиоксидантной системы также важно для выживания нейронов после ишемии (Sanderson *et al.*, 2013).

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 нейропатиях, вызываемых вирусом иммунодефицита человека (Дедов, 2013; Шпаков и др., 2013; Shpakov *et al.*, 2015; Чистякова и др., 2010, 2011, 2016; Сухов и др., 2013, 2016, 2019; Dodd, Tiganis, 2017; Santiago, Hallschmid, 2019; Суркова и др., 2019а, 2019б). Обстоятельно исследованы механизмы транспорта инсулина в ЦНС при интраназальном способе его доставки, при котором происходит проникновение инсулина в структуры мозга и его непосредственное воздействие на них без существенного влияния на уровень глюкозы в крови, что предотвращает развитие гипогликемических кризов (Lochhead *et al.*, 2019). Однако работы по изучению эффектов интраназально вводимого инсулина при ишемии головного мозга отсутствуют, несмотря на доказанные механизмы его нейропротекторного действия при нейродегенеративных заболеваниях (Lioutas, Novak, 2016).

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.

Цели и задачи исследования

Цель работы состояла в изучении нейропротекторного действия инсулина и в исследовании механизмов, лежащих в основе его защитного действия, при индукции окислительного стресса в моделях *in vitro* и *in vivo*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Исследовать защитное действие инсулина в условиях депривации глюкозы и кислорода (ДГК) и при воздействии H_2O_2 в первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс;
2. Изучить антиоксидантное действие инсулина на нейроны коры мозга крыс в условиях ДГК и при индукции окислительного стресса с помощью H_2O_2 ;
3. С целью выяснения молекулярных механизмов нейропротекторного действия инсулина исследовать его эффекты на активность протеинкиназы Akt, киназы- 3β гликогенсинтазы, ERK-1/2-киназ и АМФ-активируемой протеинкиназы в первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс в моделях окислительного стресса;
4. При двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс и реперфузии изучить способность инсулина при интраназальном введении влиять на накопление продуктов перекисного окисления липидов, экспрессию и активность Na^+/K^+ -АТФазы, состояние компонентов антиоксидантной системы и экспрессию про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2.

Положения, выносимые на защиту:

1. Инсулин в условиях окислительного стресса *in vitro* предотвращает гибель нейронов коры головного мозга крыс, оказывая на них антиапоптотический эффект.
2. Инсулин проявляет антиоксидантный эффект в условиях H_2O_2 -индуцируемого окислительного стресса и при депривации глюкозы и кислорода в первичной культуре нейронов коры мозга крыс.
3. Нейропротекторное действие инсулина обусловлено его воздействием на активность ряда протеинкиназ: Akt-киназы, киназы- 3β гликогенсинтазы, ERK-1/2-киназ и АМФ-активируемой протеинкиназы в динамике развития окислительного стресса.

4. Интраназальное введение инсулина крысам, подвергнутым затем двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии, ослабляет действие ряда негативных факторов, снижающих выживаемость нейронов.

Научная новизна. Впервые показано, что инсулин в наномолярных концентрациях оказывает нейропротекторное действие, снижая гибель нейронов коры мозга крыс в первичной культуре в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода. Показано, что стимулирующее влияние инсулина на активность Akt-киназы, которое сопровождается снижением активности GSK3 β в условиях окислительного стресса, может опосредовать антиоксидантное и антиапоптотическое действие инсулина, что было подтверждено с использованием ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы, вышележащей по отношению к Akt. Защитное действие инсулина опосредовано активацией ERK1/2 на ранних этапах развития окислительного стресса, как это показано нами. Впервые показано, что как нейропротекторный, так и антиоксидантный эффекты инсулина на нейроны коры мозга в значительной степени подавляются в присутствии SL327, ингибитора киназ MEK1/2, вышележащего по отношению к ERK1/2 компонента MAPK. Впервые показано, что инсулин снижает соотношение проапоптотического белка Bax к антиапоптотическому белку Bcl-2, которое увеличивается в условиях окислительного стресса, и это снижение опосредовано повышением уровня белка Bcl-2 при действии инсулина. Изучено функциональное состояние AMPK при действии инсулина в условиях окислительного стресса в первичной культуре нейронов коры мозга крыс, и впервые показано снижение ее активности при применении инсулина. Модуляция активности AMPK инсулином вносит вклад в проявляемый им нейропротекторный эффект при окислительном стрессе, поскольку использование активатора этой протеинкиназы, как показано нами, снижает защитное действие инсулина на нейроны первичной культуры коры мозга крыс, подвергнутые действию перекиси водорода. Впервые изучено влияние превентивного интраназального введения инсулина крысам, подвергнутым двухсосудистой ишемии переднего мозга с гипотензией и реперфузией, и показана его способность снижать процессы перекисного окисления липидов, предотвращать снижение активности Na⁺/K⁺-АТФазы и улучшать метаболическое состояние нервной ткани в условиях ишемии-реперфузии.

Теоретическая и практическая значимость работы. В настоящее время отмечается острый недостаток эффективных нейропротекторов, способных предотвращать или снижать интенсивность повреждения мозга при инсульте и прединсультных состояниях. Полученные данные о механизмах защитного действия инсулина, как на первичной культуре кортикальных нейронов крысы, так и в модели двухсосудистой ишемии головного 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 открывают новые перспективы для развития нейропротекторных и когнитивных технологий, основанных на применении интраназально вводимого инсулина. Впервые показанный защитный эффект интраназально вводимого инсулина, действующего непосредственно в головном мозге, позволяет рекомендовать его внедрение и применение в условиях клиники для лечения пациентов с ишемическими поражениями мозга, в том числе для лечения пациентов с нормо- и гипогликемией при ишемическом инсульте. Подобный подход может быть рекомендован для дальнейшего изучения защитного эффекта интраназально вводимого инсулина при глобальной ишемии головного мозга, которая может наблюдаться при черепно-мозговой травме, асфиксии, гипотензии, сердечном приступе и в ходе оперативного вмешательства. Результаты исследования могут быть использованы при подготовке курсов лекций по биохимии, нейрохимии, молекулярной эндокринологии, фармакологии для студентов и аспирантов медицинских и биологических вузов.

Степень достоверности и апробация работы. Результаты работы представлены и обсуждены на 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), FENS Regional Meeting (Печ, Венгрия, 2017), XXIII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), Всероссийский конгресс «Боткинские чтения» (Санкт-Петербург, 2018), 11th FENS (Берлин, Германия, 2018), XIV и XV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018, 2019), Алмазовский молодежный медицинский форум (Санкт-Петербург, 2019), Конференция молодых ученых «Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты» имени Н. М. Эмануэля (Москва, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 27 работ в печатных изданиях. Из них 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 19 тезисов конференций.

Личный вклад автора. Все представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 145 страницах, включая 40 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 280 ссылок.

Благодарности. Работа выполнялась при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00408а и № 18-315-00285мол_а («Мой первый грант»), гранта Правительства Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов, молодых ученых, молодых кандидатов наук в 2017 году.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы представлены сведения о функционировании инсулина и инсулиновой сигнальной системы в ЦНС. Рассмотрены роль свободнорадикального окисления биомолекул и особенности антиоксидантной системы в головном мозге. Описаны подходы, используемые для моделирования ишемического повреждения головного мозга. Освещены основные механизмы патогенеза ишемии и реперфузии нервной ткани и предпосылки для использования инсулина, вводимого интраназально, для терапии ишемии головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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».

Экспериментальные модели

1) **Индукция окислительного стресса добавлением H₂O₂.** Нейроны преинкубировали с инсулином в разных концентрациях в течение 1 ч, 5 ч или 20 ч. При изучении защитного эффекта инсулина к клеткам добавляли H₂O₂ (50 мкМ или 100 мкМ) и инкубировали в течение 6 ч в CO₂-инкубаторе. Для анализа содержания белков методом иммуноблоттинга клетки инкубировали с инсулином в течение 1 ч в концентрации 100 нМ и далее с 100 мкМ H₂O₂ в течение 5, 15, 30 и 45 мин и 1, 2, 4 и 6 ч. При исследовании защитного действия инсулина и его механизма клетки преинкубировали с ингибиторами/активаторами различных сигнальных протеинкиназ в течение 30 мин перед добавлением инсулина – с 30 мкМ LY294002 (ингибитор PI-3-K), 10 мкМ SL327 (ингибитор MEK1/MEK2), 1 мкМ BMS-754807 (ингибитор тирозинкиназы рецептора инсулина) и 100 мкМ AICAR (активатор АМПК). После этого

нейроны инкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч, и подвергали действию 100 мкМ H_2O_2 в течение 6 ч.

2) **Модель депривации глюкозы и кислорода *in vitro*.** Перед экспериментом проводили деаэрацию фосфатного буфера для промывки клеток и депривационной среды Neurobasal без глюкозы и пирувата газовой смесью, содержащей 95% N_2 и 5% CO_2 в течение 30 мин. Клетки промывали деаэрированным фосфатным буфером, переводили в деаэрированную депривационную среду и вносили инсулин. Для оценки выживаемости использовали инсулин в концентрациях 50 нМ-10 мкМ, а для изучения механизмов действия инсулина использовали концентрацию 10 мкМ. Затем клетки подвергали депривации кислорода в газовой среде состава 95% N_2 и 5% CO_2 в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе. Контрольные клетки не промывали деаэрированными растворами и переводили в среду, аналогичную депривационной среде по составу, но с добавлением глюкозы до концентрации, содержащейся в ростовой среде, и содержали в CO_2 -инкубаторе. Для окончания ДГК среду заменяли полной ростовой средой и вносили инсулин в исследуемых концентрациях. Через 24 ч оценивали выживаемость клеток с помощью МТТ-метода. Для анализа механизмов, лежащих в основе защитного эффекта инсулина, проводили отбор проб сразу после окончания ДГК и через 24 ч. Полученные пробы затем анализировали с помощью иммуноблоттинга.

3) Для **моделирования двухсосудистой ишемии мозга крыс с гипотензией и реперфузией** использовали самцов крыс линии Вистар, 300-400 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Изучали следующие группы животных: контрольные, ложнооперированные (ЛО, $n=7$); подвергнутые ишемии мозга и реперфузии (ИР, $n=7$); подвергнутые ишемии мозга и реперфузии, которым за 60 мин перед ишемией вводился инсулин в дозе 0.5 IU/крысу (ИР-Инс, $n=7$). Для минимизации стрессорного воздействия от интраназального введения животным предварительно в течение 5 дней вводили физиологический раствор. Бычий инсулин («Sigma-Aldrich», США) растворяли в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.5, и вводили в каждую ноздрю по 10 мкл раствора, содержащего 1 мг/мл инсулина. В качестве наркоза использовали хлоральгидрат (400 мг/кг, в/б). Ишемию переднего мозга вызывали с помощью окклюзии общих сонных артерий на 20 мин в сочетании с гипотензией (Raval *et al.*, 2009). Контроль артериального давления проводили с использованием системы для неинвазивного измерения давления «Систола» («Нейроботикс», Россия). Для достижения реперфузии переднего мозга разжимали общие сонные артерии и возобновляли подачу крови в мозг в течение 1 ч. Ложнооперированных животных анестезировали, осуществляли препарирование сосудов, но не проводили окклюзию артерий. По окончании реперфузии у крыс извлекали кору больших полушарий головного мозга и гиппокамп и использовали для определения активности Na^+/K^+ -АТФазы, продуктов ПОЛ (диеновые и триеновые конъюгаты (ДК, ТК), основания Шиффа (ОШ) и малоновый диальдегид (МДА)), для экстракции тотальной РНК, для определения уровня общего глутатиона, активности супероксиддисмутазы (СОД) и проведения иммуноблоттинга.

Выделение нейронов из коры мозга эмбрионов крыс линии Вистар проводили на 17-18-й дни развития с помощью модифицированного метода Дихтера (Dichter, 1978). Для минимизации влияния инсулина, который содержится в ростовой среде, и в целях предотвращения инактивации рецепторов инсулина за 12 ч перед экспериментом клеточную среду заменяли на среду Neurobasal с ростовой добавкой В-27, не содержащей инсулин.

Определение жизнеспособности нейронов оценивали с помощью колориметрического метода с использованием МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Результаты выражали в процентах от контроля, который принимали за 100 %. Наряду с этим, оценивали число клеток, гибель которых была предотвращена в результате преинкубации с инсулином (уровень “rescue rates”).

Активность каспазы-3 в клетках определяли с использованием набора «CASP3F-1КТ» («Sigma-Aldrich», США). Активность каспазы-3 выражали в усл. ед.

Изучение уровня образования АФК в нейронах проводили с использованием флуоресцентного красителя дихлородигидрофлуоресцеина диацетата. Содержание АФК

выражали в усл. ед., являющихся количественным показателем интенсивности флуоресценции дихлордигидрофлуоресцеина в клетках.

Определение уровня мембранного потенциала митохондрий $[\Delta\psi(m)]$ в нейронах проводили методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного красителя тетраметилродамина (TMRM). Интенсивность флуоресценции анализируемых проб рассчитывали в процентах от контроля, уровень флуоресценции в котором принимали за 100%.

Для изучения экспрессии белков использовали метод иммуноблоттинга (Zakharova *et al.*, 2019). Равное количество белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в ПААГ по методу Лэммли, затем осуществляли 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 фотопленке («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 фотопленки 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.

Активность Na^+/K^+ -АТФазы, выделенной из грубой синаптосомальной фракции коры мозга крыс, определяли по сопряженной реакции в присутствии избытка пируваткиназы, лактатдегидрогеназы и фосфоенолпирувата при регистрации убыли НАДН в среде инкубации (Leon *et al.*, 1981). Активность Na^+/K^+ -АТФазы определяли по разнице между суммарной активностью и активностью Mg^{2+} -АТФазы, измеряемой в присутствии строфантина G, и выражали в микромоль неорганического фосфата (Φ_n)/мг белка/час.

Для выделения цитозольной субклеточной фракции коры головного мозга крыс использовали метод дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы (Hajos, 1975). 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 (Nishikimi, 1972). Активность СОД рассчитывали в усл. ед. на 1 мг белка, выделенного 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 (Akerboom, Sies, 1981). Количество общего глутатиона определяли по калибровочной кривой. Результаты выражали в процентах от контроля, который принимали за 100 %.

Кору головного мозга крыс также использовали для выделения липидов из тканей животных по методу Фолча (Folch *et al.*, 1957). Полученный липидный экстракт использовали для определения количества общих липидов (определение по сухому остатку в навеске) и продуктов ПОЛ. **Метод количественного определения ДК и ТК** основан на способности сопряженных двойных связей интенсивно поглощать свет в УФ-области спектра (Галкина и др., 2009). Количество ДК оценивали с использованием молярного коэффициента экстинкции ($2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и выражали в усл. ед. на 1 мг общих липидов. Уровень ТК выражали в усл. ед. на 1 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 нм (Галкина и др., 2009). Количество ОШ выражали в усл. ед. на 1 мг общих липидов. **Определение содержания МДА** проводили с использованием тиобарбитуровой кислоты в гомогенате коры больших полушарий мозга крыс (Гаврилов и др., 1987). Содержание МДА определяли с использованием молярного коэффициента экстинкции ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и выражали в нмоль на 1 мг белка.

Для проведения **количественной ПЦР в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией**, выделяли тотальную РНК из коры больших полушарий 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 5 мкл 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 $\Delta\Delta\text{CT}$ (Schmittgen, Livak, 2008). 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 методов. Для сравнения двух независимых групп использовали U-критерий Манна-Уитни, для сравнения трех и более групп – тест Крускалла-Уоллиса с последующим попарным сравнением с применением U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения нейропротекторного действия инсулина *in vitro* в условиях окислительного стресса использовали первичную культуру нейронов коры мозга крыс. На первом этапе исследования применяли H_2O_2 в качестве прооксиданта. Затем использовали модель ишемии-реперфузии нейронов коры мозга крыс *in vitro*, которую вызывали депривацией глюкозы и кислорода. Далее исследовали нейропротекторное действие инсулина *in vivo* при его интраназальном введении крысам в условиях двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии.

1. Изучение защитного и антиоксидантного эффектов инсулина на нейроны первичной культуры коры головного мозга крыс, подвергнутые воздействию перекиси водорода *in vitro*

Нейроны первичной культуры коры мозга крыс в течение 1 ч преинкубировали с инсулином в широком диапазоне его концентраций – от 1 нМ до 1 мкМ, затем для индукции окислительного стресса добавляли 100 мкМ H_2O_2 и инкубировали в течение 6 ч (Рис. 1). Добавление H_2O_2 вызывало гибель 28% нейронов коры мозга крыс ($p < 0.01$). Инсулин в концентрации 1 нМ не оказывал защитного действия, в то время как инкубация нейронов с инсулином в концентрации 10 нМ повышала количество выживших клеток до $88.0 \pm 1.1\%$, а в

концентрации 100 нМ – до $96.2 \pm 1.2\%$ (в обоих случаях $p < 0.01$ по сравнению с воздействием одной H_2O_2). Защитные эффекты 100 нМ и 1 мкМ инсулина достоверно не различались. В дальнейшем в экспериментах использовались концентрации 100 нМ и 1 мкМ инсулина.

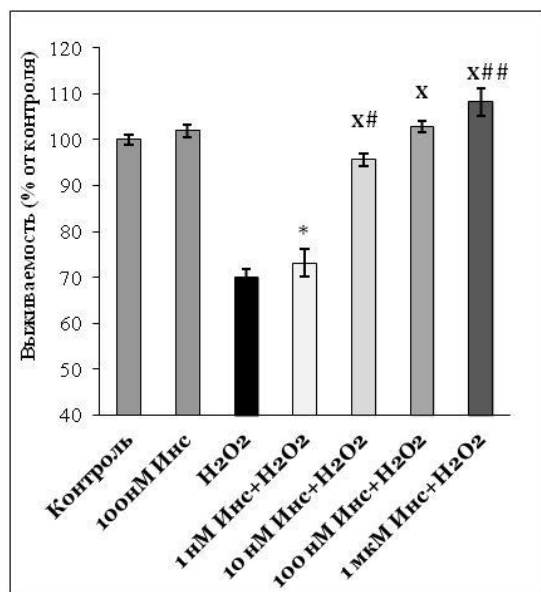


Рисунок 1. Влияние инсулина на выживаемость нейронов коры мозга крыс в условиях воздействия на них H_2O_2 .

Инс – инсулин. Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – с контролем; x – с H_2O_2 ; # – с 1 нМ инсулином и H_2O_2 ; ## – с 10 нМ инсулином и H_2O_2 , $p < 0.01$ во всех случаях.

Нами впервые показано, что инсулин в нейронах коры мозга, необработанных H_2O_2 , достоверно уменьшал соотношение проапоптотического белка Вах к антиапоптотическому белку Bcl-2 (на 26%, $p < 0.01$ в сравнении с контролем) (Рис. 2, точка 0). Соотношение Вах/Bcl-2 достоверно увеличивалось (на 41%) в клетках уже через 30 мин после добавления H_2O_2 и сохранялось на высоком уровне на всем протяжении эксперимента (Рис. 2).

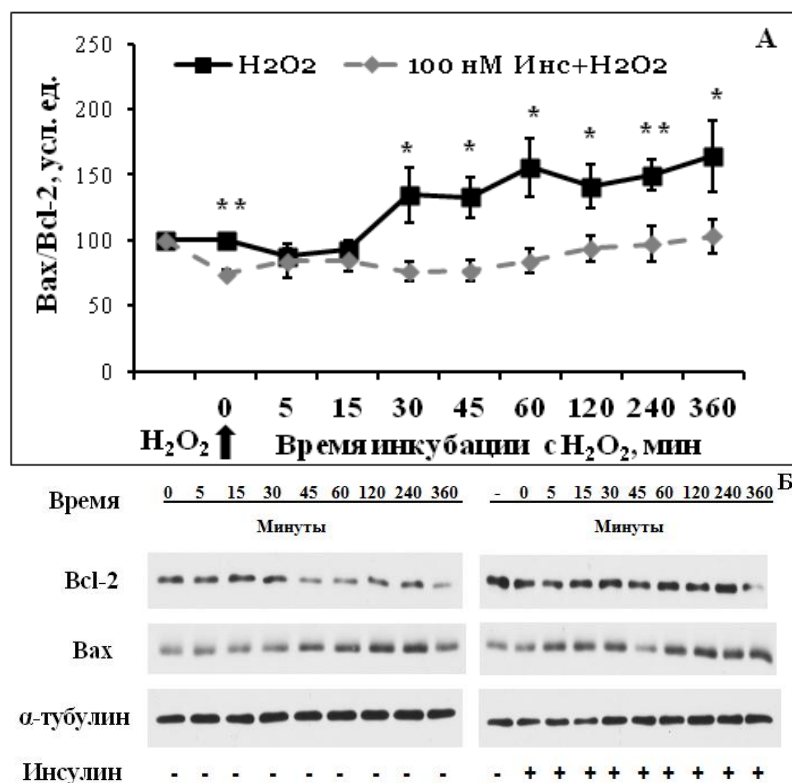


Рисунок 2. Влияние инсулина на соотношение Вах/Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс при H_2O_2 -индуцируемом окислительном стрессе.

А – Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=9$). Нейроны коры мозга подвергали воздействию 100 мкМ H_2O_2 (квадраты) или преинкубировали с 100 нМ инсулина в течение 1 ч, а затем добавляли 100 мкМ H_2O_2 и инкубировали в течение 6 ч (ромбы). Различия достоверны: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$. Б – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие воздействие H_2O_2 и инсулина на уровень экспрессии белков Вах и Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс.

Увеличение экспрессии Вах может приводить к активации апоптоза вследствие повышения проницаемости митохондрий для проапоптотических факторов путем встраивания Вах во внешнюю мембрану митохондрий. В то же время увеличение уровня белка Bcl-2,

напротив, снижает проапоптотическое действие Вах (Zhao *et al.*, 2006). Преинкубация с 100 нМ инсулина нормализовала отношение Вах/Vcl-2, и его эффект в условиях окислительного стресса был статистически значим, начиная с 30 мин и до 6 ч после добавления прооксиданта ($p < 0.05$) (Рис. 2).

Появление расщепленного фрагмента каспазы-3, определенного методом иммуноблоттинга, и повышение активности фермента могут свидетельствовать об активации апоптоза в клетках. Через 6 ч после добавления H_2O_2 отмечалось повышение уровня расщепленного фрагмента каспазы-3, и оно сопровождалось увеличением активности фермента (Табл. 1). Преинкубация нейронов с 100 нМ и 1 мкМ инсулином снижала оба этих показателя, приближая их к контрольным значениям.

Впервые обнаруженная нами в условиях H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса нормализация отношения Вах/Vcl-2 в присутствии инсулина может указывать на связанный с изменением экспрессии белков Vcl-2 и Вах механизм его антиапоптотического действия.

Таблица 1. Влияние 1 мкМ инсулина на уровень расщепленного фрагмента каспазы-3 и на активность каспазы-3 при действии H_2O_2 на нейроны коры мозга крыс.

Показатель	Контроль	H_2O_2	Инсулин+ H_2O_2
Расщепленный фрагмент каспазы-3, усл. ед.	1.0 ± 0.2	$3.1 \pm 0.6 *$	$1.1 \pm 0.2 \#$
Активность каспазы-3, усл. ед.	100.0 ± 10.1	$213.5 \pm 20.5 *$	$153.6 \pm 11.7 \#$

Примечание: Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – с контролем; # – с H_2O_2 , $p < 0.05$.

Следующей задачей исследования стало изучение антиоксидантного действия инсулина. Для этого проводили преинкубацию нейронов коры мозга крыс с 1 мкМ инсулина в течение 1, 5 и 20 ч с последующим добавлением H_2O_2 и инкубацией в течение 1 ч (Табл. 2). Добавление 100 мкМ H_2O_2 приводило к значительному повышению уровня АФК по сравнению с контролем. Выраженный антиоксидантный эффект 1 мкМ инсулина наблюдался уже после 1 ч преинкубации с ним нейронов. После 20 ч преинкубации инсулин в еще большей степени снижал образование АФК, индуцированное H_2O_2 , приближая его к контрольным значениям.

Таблица 2. Влияние 1 мкМ инсулина при преинкубации с ним нейронов коры мозга крыс в течение 1, 5 и 20 ч на накопление активных форм кислорода, индуцированное H_2O_2 .

	Флуоресценция дихлорофлуоресцеина, % от контроля		
	1 ч	5 ч	20 ч
Контроль	100.0 ± 1.9	100.0 ± 5.6	100.0 ± 1.7
Контроль + Инсулин	94.9 ± 1.4	96.9 ± 1.2	90.8 ± 1.7
H_2O_2	$175.3 \pm 1.8 *$	$181.7 \pm 3.8 *$	$190.3 \pm 8.6 *$
H_2O_2 + Инсулин	$146.8 \pm 5.7 * \#$	$157.5 \pm 3.1 * \#$	$118.8 \pm 5.9 * \#$

Примечание: Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – с контролем, $p < 0.01$; # – с H_2O_2 , $p < 0.05$.

Генерация АФК в наибольшей степени зависит от состояния митохондрий (Ly *et al.*, 2003). Добавление H_2O_2 значительно снижало величину мембранного потенциала митохондрий $[\Delta\psi(m)]$ в нейронах ($p < 0.01$), что показано нами с использованием методом проточной цитометрии (Рис. 3 (А)). Преинкубация клеток с 1 мкМ и 100 нМ инсулина в течение 1 ч восстанавливала этот показатель практически до его уровня в контроле. На рисунке 3 (Б) представлены гистограммы, иллюстрирующие результаты типичного опыта. При действии H_2O_2 основной пик смещается в область клеток с меньшей величиной $[\Delta\psi(m)]$, чем в контроле. Преинкубация с 1 мкМ инсулина повышает уровень $[\Delta\psi(m)]$, что приводит к смещению

основного пика в область, характерную для контрольных клеток. Таким образом, инсулин значительно уменьшает вызванную прооксидантом генерацию АФК и препятствует снижению $[\Delta\psi(m)]$ в нейронах коры мозга крыс.

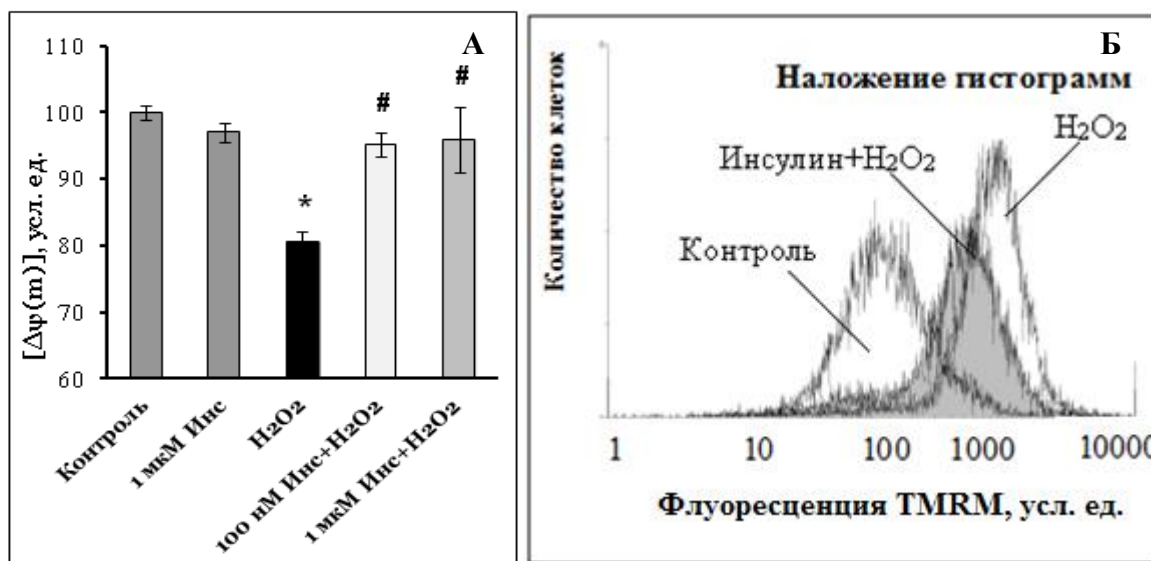


Рисунок 3. Воздействие H₂O₂ и инсулина на мембранный потенциал митохондрий $[\Delta\psi(m)]$ в нейронах первичной культуры коры мозга крыс.

А – Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – с контролем, $p < 0.01$; # – с H₂O₂, $p < 0.05$. **Б** – Гистограммы, полученные методом проточной цитометрии и иллюстрирующие влияние H₂O₂ и инсулина на $[\Delta\psi(m)]$ в нейронах. TMRM – тетраметилродамин.

2. Изучение механизмов, лежащих в основе защитного действия инсулина, при H₂O₂-индуцируемом окислительном стрессе в нейронах коры мозга крыс *in vitro*

Активацию PI-3-K/Akt-сигнального пути при действии инсулина рассматривают как основной механизм его действия. Одной из мишеней Akt-киназы является киназа GSK3 β , Akt-опосредуемое фосфорилирование которой по Ser⁹ приводит к ее инактивации и ингибированию проапоптотического действия GSK3 β , что и определяет антиоксидантный эффект инсулина (Förster *et al.*, 2010; Ramalingam, Kim, 2015). Под активностью сигнальных протеинкиназ понимается изменение отношения уровня фосфорилирования по определенным сайтам фермента, которые связаны с регуляцией активности, вычисленному к общему количеству фермента.

Нами показано, что инсулин в концентрации 100 нМ в среднем в 5 раз увеличивал базальную активность Akt-киназы, оцениваемую по отношению фосфорилированной по Ser⁴⁷³ форме фермента к нефосфорилированной (pAkt(Ser⁴⁷³)/Akt), при его добавлении за 60 мин до индукции окислительного стресса ($p < 0.01$) (Рис. 4, точка 0). Перекись водорода в наибольшей степени увеличивала отношение pAkt(Ser⁴⁷³)/Akt через 15-30 мин после начала ее воздействия (Рис. 4). Участие H₂O₂ в активации различных сигнальных путей подробно изучено, как в нашей лаборатории (Аврова и др., 2008; Соколова и др., 2011; Захарова и др., 2013; Zakharova *et al.*, 2012, 2014, 2017), так и другими исследовательскими группами (Son *et al.*, 2013; Moldogazieva *et al.*, 2018). Преинкубация с 100 нМ инсулина в значительной степени повышала уровень pAkt(Ser⁴⁷³)/Akt на разных этапах воздействия H₂O₂, и этот эффект сохранялся на всем протяжении эксперимента ($p < 0.05$) (Рис. 4).

В присутствии LY294002, ингибитора PI-3-K, регулирующей активацию Akt-киназы, защитный эффект инсулина на нейроны коры мозга достоверно снижался (Табл. 3), что оценивали по уровню «rescue rates», отражающему процент клеток, гибель которых была предотвращена при инкубации с инсулином. Антиоксидантный эффект инсулина также

снижался в присутствии LY294002 (Табл. 4). Таким образом, нейропротекторный и антиоксидантный эффекты инсулина в значительной степени зависят от его способности активировать Akt-киназу, являющуюся негативным регулятором киназы GSK3 β , инактивация которой, в свою очередь, влияет на соотношение Вах/Vcl-2 (Zhao *et al.*, 2006; Veurel *et al.*, 2015).

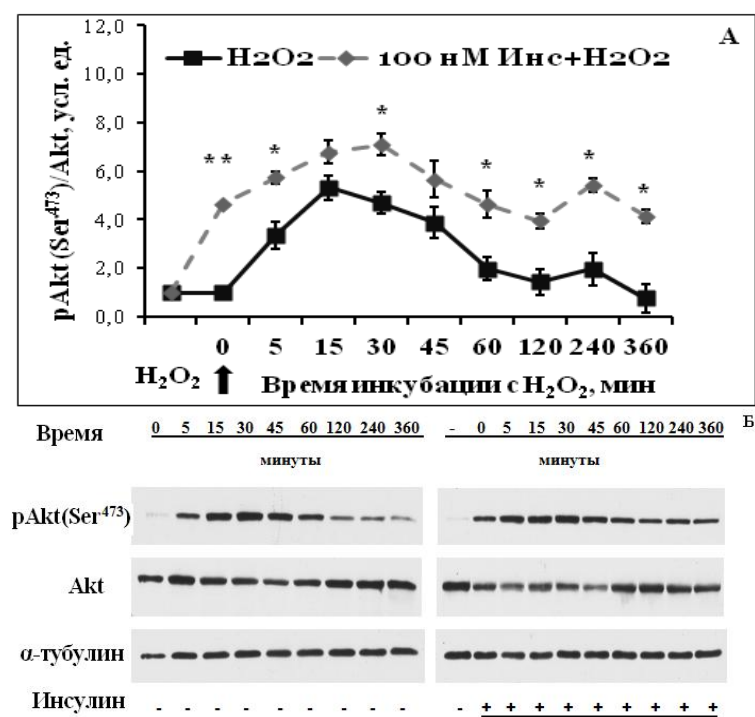


Таблица 3. Эффект инсулина на показатель «rescue rates», рассчитанный в условиях окислительного стресса в присутствии ингибиторов/активаторов, регулируемых инсулином сигнальных путей.

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

Примечание: BMS-754807 – ингибитор тирозинкиназы рецептора инсулина, LY294002 – ингибитор PI-3-K, которая активирует Akt-киназу, SL327 – ингибитор MEK1/2-киназ, активирующих протеинкиназы ERK1/2, 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, $p < 0.05$.

Достоверное повышение уровня GSK3 β , фосфорилированной по Ser⁹ (pGSK3 β (Ser⁹)/GSK3 β), при добавлении инсулина наблюдали через 30 мин после внесения H₂O₂, и оно сохранялось в течение 6 ч практически во всех изученных временных точках по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию только одной H₂O₂ (Рис. 5). Эти данные свидетельствуют об «ингибирующем» фосфорилировании GSK3 β и, как следствие, инактивации этого фермента в условиях воздействия на клетки инсулина.

Таблица 4. Влияние инсулина на образование АФК в условиях окислительного стресса в присутствии LY294002, ингибитора PI-3-К, и SL327, ингибитора MEK1/2-киназ.

Ингибитор	Контроль	H ₂ O ₂	Инсулин+H ₂ O ₂	Инг+H ₂ O ₂	Инг+Инсулин+H ₂ O ₂
LY294002	37.3 ± 0.1	116.3 ± 3.7 *	60.1 ± 2.3 * х	101.7 ± 2.7	72.3 ± 4.4 #
SL327	41.3 ± 1.0	81.3 ± 1.3 *	57.1 ± 2.2 * х	79.8 ± 1.4 *	72.8 ± 2.4 * #

Примечание: Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Инг – ингибитор. Различия достоверны: * – с контролем, $p < 0.01$; х – с H₂O₂, $p < 0.01$; # – с Инг+H₂O₂, $p < 0.05$.

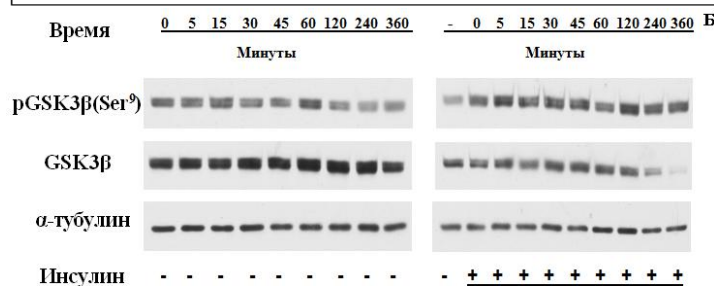
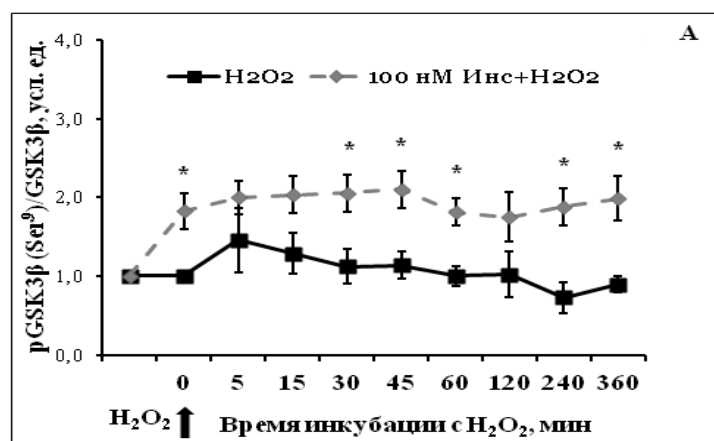


Рисунок 5. Влияние инсулина на уровень pGSK3β(Ser⁹)/GSK3β в нейронах коры мозга крыс при H₂O₂-индуцируемом окислительном стрессе.

А – Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Нейроны коры мозга подвергали воздействию 100 мкМ H₂O₂ (квадраты) или преинкубировали с 100 нМ инсулина в течение 1 ч, а затем добавляли 100 мкМ H₂O₂ и инкубировали в течение 6 ч (ромбы). Различия достоверны: * – $p < 0.05$. Б – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие воздействие H₂O₂ и инсулина на уровень pGSK3β(Ser⁹) и GSK3β в нейронах коры мозга крыс.

Защитное действие инсулина на нейроны может быть опосредовано активацией каскада MAPK – MEK/ERK1/2-сигнального пути (Filippi *et al.*, 2012). Добавление H₂O₂ приводило к длительной активации ERK1/2-киназ, на что указывает повышение отношения pERK1/2/ERK1/2 практически во всех временных точках (Рис. 6), и это может опосредовать гибель клеток (Martin, Rognonces, 2010). Участие H₂O₂ и других АФК в активации MAPK-каскада показано в других работах, и что нашло подтверждение и в нашем исследовании (Valko *et al.*, 2007; Moldogazieva *et al.*, 2018). На ранних временных точках после добавления H₂O₂ преинкубация нейронов с 100 нМ инсулина увеличивала отношение pERK1/2/ERK1/2, которое через 60 мин снижалось (Рис. 6). Краткая активация ERK1/2 нейротрофинами, флавоноидами, ганглиозидами и другими соединениями повышает жизнеспособность нервных клеток, но длительная активация ERK1/2 при окислительном стрессе, напротив, приводит к гибели нейронов (Ziegler *et al.*, 2006; Zakharova *et al.*, 2014).

Для изучения 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 действие инсулина на нейроны, которые инкубировали с H₂O₂, существенно снижалось (Табл. 3). Сходный эффект был выявлен и при изучении накопления АФК при инкубации с инсулином и соединением SL327 (Табл. 4).

При окислительном стрессе и других неблагоприятных воздействиях в нейронах показана активация АМПК, основного энергетического сенсора клетки (Auciello *et al.*, 2014). Нами установлено, что добавление H₂O₂ стимулировало активность АМПК, на что указывает повышение отношения фосфорилированной АМПКα по Thr¹⁷² к АМПКα

(pAMPK α (Thr¹⁷²)/AMPK) (Рис. 7). Так в нейронах, обработанных H₂O₂, уровень pAMPK α (Thr¹⁷²)/AMPK уже через 15 мин после воздействия H₂O₂ был в 3.1 раза выше в сравнении с контролем ($p < 0.05$). Повышенный уровень pAMPK α (Thr¹⁷²)/AMPK сохранялся в течение 2 ч после добавления H₂O₂. Нами впервые установлено, что преинкубация нейронов с инсулином снижает уровень pAMPK α (Thr¹⁷²)/AMPK, и этот эффект сохранялся в течение 2 ч после индукции окислительного стресса H₂O₂ (Рис. 7). В присутствии AICAR, активатора AMPK, защитный эффект инсулина снижался, что указывает на негативную роль AMPK в реализации этого эффекта (Табл. 3).

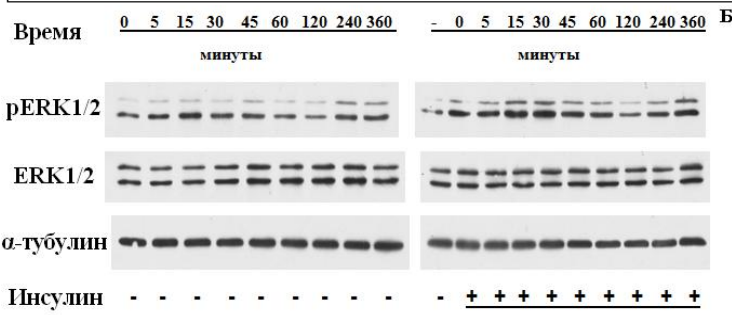
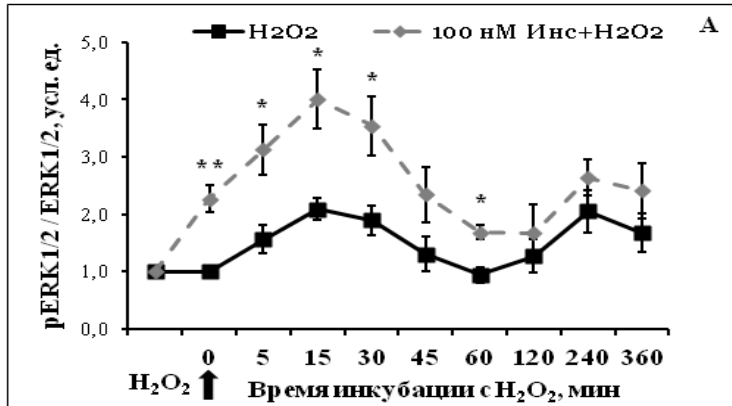


Рисунок 6. Влияние инсулина на уровень pERK1/2/ERK1/2 в нейронах коры мозга крыс при H₂O₂-индуцируемом окислительном стрессе.

А – Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Нейроны коры мозга подвергали воздействию 100 мкМ H₂O₂ (квадраты) или преинкубировали с 100 нМ инсулина в течение 1 ч, а затем добавляли 100 мкМ H₂O₂ и инкубировали в течение 6 ч (ромбы). Различия достоверны: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$. **Б** – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие воздействие H₂O₂ и инсулина на уровень pERK1/2 и ERK1/2 в нейронах коры мозга крыс.

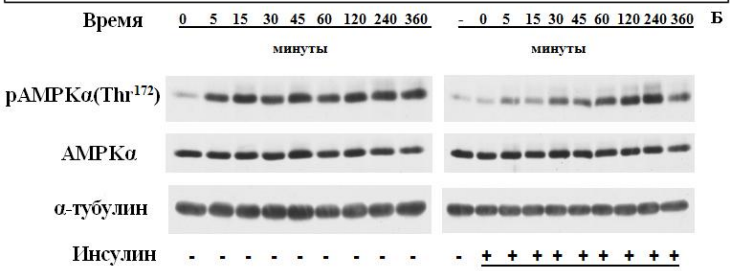
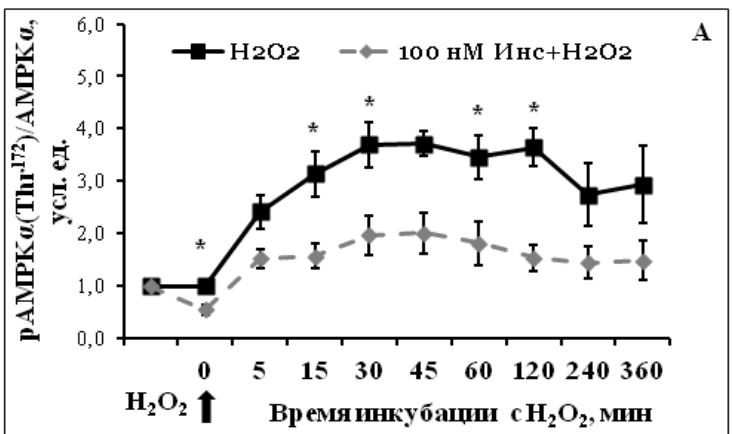


Рисунок 7. Влияние инсулина на уровень pAMPK α (Thr¹⁷²)/AMPK α в нейронах коры мозга крыс при H₂O₂-индуцируемом окислительном стрессе.

А – Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Нейроны коры мозга подвергали воздействию 100 мкМ H₂O₂ (квадраты) или преинкубировали с 100 нМ инсулина в течение 1 ч, а затем добавляли 100 мкМ H₂O₂ и инкубировали в течение 6 ч (ромбы). Различия достоверны: * – $p < 0.05$. **Б** – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие воздействие H₂O₂ и инсулина на уровень pAMPK α (Thr¹⁷²) и AMPK α в нейронах коры мозга крыс.

3. Исследование защитного действия инсулина и его механизмов на нейроны первичной культуры коры головного мозга крыс в модели депривации глюкозы и кислорода *in vitro*

Подход, основанный на изучении воздействия ДГК на культуру нейронов коры мозга крыс *in vitro*, позволяет смоделировать ограничение кровоснабжения, которое наблюдается при ишемии нервной ткани. Восстановление уровня глюкозы и кислорода в клетках соответствует восстановлению кровотока, что хорошо соотносится с реперфузионным повреждением.

ДГК приводила к гибели около 40% нейронов через 24 ч после воздействия ($p < 0.01$) (Табл. 5). Инкубация культуры нейронов коры мозга крыс с инсулином, взятым в микромолярных концентрациях, снижала гибель клеток, подвергнутых воздействию ДГК в течение 1 ч, при этом максимальный эффект достигался при действии 10 мкМ инсулина.

Далее изучали антиоксидантный эффект инсулина при ДГК (Табл. 5). ДГК приводила к увеличению образования АФК в клетках на 66% ($p < 0.01$). Снижение генерации АФК в нейронах в условиях ДГК отмечалось только при инкубации с 10 мкМ инсулина ($p < 0.05$). Несмотря на выявленное нами уменьшение образования АФК при действии инсулина, их уровень оставался достоверно повышенным по сравнению с контрольными клетками.

Таблица 5. Влияние инсулина на выживаемость нейронов коры мозга крыс и образование АФК в них в условиях депривации глюкозы и кислорода.

	Контроль	ДГК	ДГК-1 мкМ Инс	ДГК-10 мкМ Инс
Выживаемость, % от контроля	100 ± 1.1	56.1 ± 3.5 *	70.13 ± 3.9 *#	75.1 ± 4.7 *#
Образование АФК, усл. ед.	0.107 ± 0.001	0.178 ± 0.004 *	0.169 ± 0.004 *	0.164 ± 0.006 *#

Примечание: ДГК – депривация глюкозы и кислорода. Инс – инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия достоверны: * – по сравнению с контролем, $p < 0.01$; # – по сравнению с ДГК, $p < 0.05$.

Инкубация нейронов коры мозга с 10 мкМ инсулина в отсутствие ДГК приводила к повышению уровня $pAkt(Ser^{473})/Akt$ на 48% по сравнению с контролем. При этом увеличение отношения $pAkt(Ser^{473})/Akt$ сохранялось и через 24 ч после обработки инсулином ($p < 0.01$) (Рис. 8 (А, Б)). ДГК сопровождалась снижением уровня $pAkt(Ser^{473})/Akt$ на 34% ($p < 0.01$), что свидетельствует о частичной потере активности фермента (Рис. 8 (А, Б)). Через 24 ч после ДГК, т.е. в условиях «реперфузии», при действии 10 мкМ инсулина показано увеличение отношения $pAkt(Ser^{473})/Akt$ в 4.4 раза по сравнению с группой «ДГК» ($p < 0.05$).

Необходимо подчеркнуть, что в модели H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса в кортикальных нейронах активация Akt-киназы показана на ранних его сроках (Рис. 4, 5 мин), в то время как в модели ДГК мы обнаружили ее активацию при действии инсулина только через сутки. В соответствии с показанным нами увеличением уровня $pAkt(Ser^{473})/Akt$ при действии 10 мкМ инсулина в отсутствие ДГК происходит достоверное повышение уровня фосфорилированной формы $pGSK3\beta(Ser^9)$ ($p < 0.05$), которое сохраняется в течение 24 ч ($p < 0.05$) (Рис. 8 (В, Г)). В условиях ДГК показано достоверное снижение отношения $pGSK3\beta(Ser^9)/GSK3\beta$ по сравнению с контрольными клетками, как сразу после воздействия, так и через 24 ч после него ($p < 0.05$). Однако, несмотря на обнаруженное повышение уровня $pAkt(Ser^{473})/Akt$ при действии инсулина через 24 ч после ДГК, мы не обнаружили достоверного изменения в уровне $pGSK3\beta(Ser^9)/GSK3\beta$ в той же временной точке ($p=0.074$) (Рис. 8 (В, Г)). Полученные результаты могут быть следствием активации некроза клеток, а не апоптоза, что согласуется с данными других авторов (Kalda *et al.*, 1998).

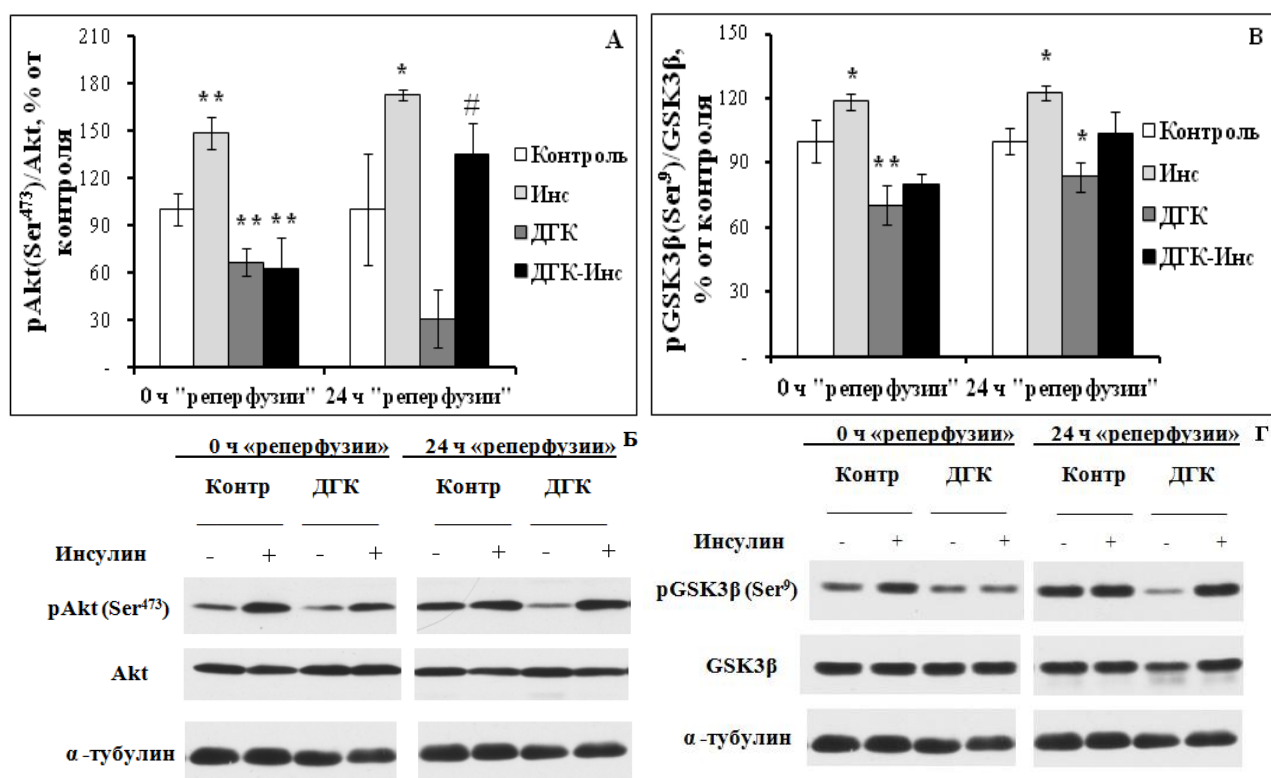


Рисунок 8. Влияние 10 мкМ инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) на уровни рAkt(Ser⁴⁷³)/Akt (А) и рGSK3β(Ser⁹)/GSK3β (В) в нейронах коры мозга крыс.

Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$). Различия статистически значимы: * – по сравнению с контролем, $p < 0.05$; ** – по сравнению с контролем, $p < 0.01$; # – по сравнению с ДГК, $p < 0.05$. Б – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие действие инсулина и ДГК на уровень рAkt(Ser⁴⁷³) и Akt в нейронах коры мозга крыс. Г – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие воздействие инсулина и ДГК на уровень рGSK3β(Ser⁹) и GSK3β в нейронах коры мозга крыс.

4. Анализ механизмов действия инсулина, вводимого интраназально, при двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс с гипотензией и реперфузией

Мы впервые изучили защитные эффекты инсулина при его предварительном интраназальном введении крысам, перенесшим двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию (ИР). Показано, что в коре больших полушарий мозга крыс, подвергнутых ИР, достоверно повышался уровень всех изученных продуктов ПОЛ ($p < 0.05$), за исключением МДА (Табл. 6). Инсулин в дозе 0.5 IU/животное оказывал выраженное антиоксидантное действие и нормализовал уровень всех изученных продуктов ПОЛ, кроме МДА (Табл. 6).

Окислительный стресс, развивающийся при ИР мозга, приводит к окислительной инактивации транспортеров, в том числе Na⁺/K⁺-АТФазы (Dobrota *et al.*, 1999). Изменения функциональной активности Na⁺/K⁺-АТФазы при двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии были обнаружены нами на уровне экспрессии генов, содержания каталитических α2- и α3-субъединиц Na⁺/K⁺-АТФазы и активности фермента (Табл. 6, Рис. 9).

ИР переднего мозга приводила к снижению активности Na⁺/K⁺-АТФазы в коре больших полушарий мозга крыс на 31% по сравнению с ЛО животными (Табл. 6). С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что ИР вызывала уменьшение экспрессии генов обеих исследованных каталитических субъединиц Na⁺/K⁺-АТФазы в коре мозга крыс ($p < 0.01$) (Рис. 9 (А)). ИР мозга также приводила к снижению содержания α3-субъединицы ($p < 0.05$) (Рис. 9 (Б, В)).

Таблица 6. Эффекты инсулина, вводимого интраназально в дозе 0.5 IU/животное, на уровень продуктов ПОЛ, на активность Na^+/K^+ -АТФазы, супероксиддисмутазы и на уровень общего глутатиона в коре больших полушарий мозга крыс, перенесших ишемию переднего мозга и реперфузию.

Крысы	ЛО	ИР	ИР-Инс
Показатель			
Диеновые конъюгаты, усл. ед./мг липидов	58.8 ± 2.7	76.0 ± 6.2 *	59.8 ± 5.5 #
Триеновые конъюгаты, усл. ед./мг липидов	14.1 ± 0.6	17.9 ± 1.6 *	13.6 ± 1.1 #
Основания Шиффа, усл. ед./мг липидов	0.346 ± 0.062	0.595 ± 0.070 *	0.368 ± 0.037 #
МДА, нмоль/мг белка	0.153 ± 0.007	0.173 ± 0.014	0.164 ± 0.012
Глутатион общий, % от контроля	0.144 ± 0.004	0.166 ± 0.015	0.354 ± 0.021 #
Активность СОД, усл. ед./мг белка	0.454 ± 0.060	0.497 ± 0.081	0.438 ± 0.053
Na^+/K^+ -АТФаза, мкмоль Фн/мг белка/ч	22.4 ± 1.0	15.9 ± 0.8 *	22.5 ± 2.8 #

Примечание: ЛО – ложнооперированные крысы, ИР – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии, ИР-Инс – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии и получавшие инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Различия достоверны: * – по сравнению с ЛО; # – по сравнению с ИР, $p < 0.05$.

Интраназальное введение крысам инсулина в дозе 0.5 IU/животное предотвращало снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в коре мозга под влиянием ИР ($p < 0.05$) (Табл. 6). Мы предположили, что инсулин также способен осуществлять свое влияние на функционирование Na^+/K^+ -АТФазы через изменение экспрессии генов, кодирующих ее каталитические субъединицы, компенсируя снижение активности фермента при окислительном стрессе. Действительно, введение инсулина достоверно повышало экспрессию генов *Atp1a2* и *Atp1a3*, кодирующих $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, соответственно, по сравнению с таковой в коре мозга крыс, перенесших ИР ($p < 0.05$), хотя и не до уровня у контрольных животных (Рис. 9 (А)).

Нами также продемонстрирована нормализация уровня $\alpha 3$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в коре мозга животных, подвергнутых ИР и получавших инсулин ($p < 0.05$) (Рис. 9 (Б, В)). Это может быть связано с тем, что промотор гена *Atp1a3*, кодирующего $\alpha 3$ -субъединицу, имеет сайты для связывания транскрипционного фактора CREB, активность которого контролируется, в том числе, и инсулином (Benfante *et al.*, 2005).

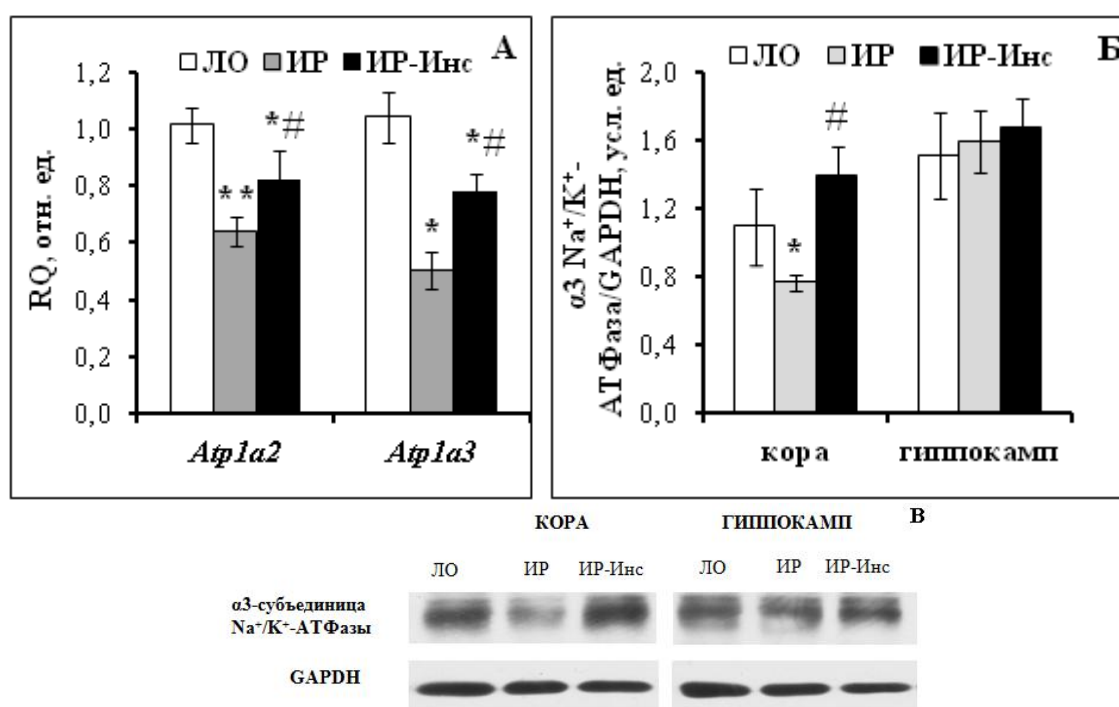


Рисунок 9. Влияние инсулина при его интраназальном введении в дозе 0.5 IU/животное на экспрессию генов каталитических $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы (*Atp1a2*, *Atp1a3*) (А) в коре мозга и на содержание $\alpha 3$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы (Б) в коре больших полушарий мозга и гиппокампе крыс, подвергнутых ишемии переднего мозга и реперфузии.

ЛО – ложнооперированные крысы, ИР – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии, ИР-Инс – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии и получавшие инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Различия достоверны: * и ** – по сравнению с ЛО, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; # – по сравнению с ИР, $p < 0.05$. В – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие действие инсулина и ИР на уровень $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы в коре мозга и гиппокампе крыс.

Введение инсулина может способствовать активации отдельных компонентов антиоксидантной системы при ИР. В связи с этим мы исследовали влияние инсулина на содержание общего глутатиона и активность СОД в цитоплазматической фракции, выделенной из коры больших полушарий мозга животных. Как ИР, так и интраназальное введение инсулина животным, которые были впоследствии подвергнуты ИР, не оказывали влияния на активность СОД (Табл. 6). Мы также не обнаружили достоверных изменений при ИР в содержании общего глутатиона. Однако при введении инсулина крысам, перенесшим ИР, содержание общего глутатиона повышалось в цитоплазматической фракции коры мозга крыс ($p < 0.05$) (Табл. 6).

Мы предположили, что инсулин может влиять на экспрессию генов, кодирующих ферменты антиоксидантной системы в условиях окислительного стресса, который развивается при ИР мозга. Подтверждением этого стали наши данные о том, что в группе «ИР» достоверно снижалась экспрессия гена *Sod1*, кодирующего цитоплазматическую форму СОД, и наблюдалась тенденция к снижению экспрессии гена митохондриальной формы СОД ($p = 0.082$) (Рис. 10). Интраназальное введение инсулина в дозе 0.5 IU/животное препятствовало снижению экспрессии исследуемых генов и повышало уровень мРНК для *Sod1* в 1.3 раза по сравнению с ЛО животными и в 2 раза по сравнению с группой «ИР». Наряду с этим, при предварительном интраназальном введении инсулина выявлено повышение экспрессии гена *Sod2* в коре мозга животных, подвергнутых ИР, до ее уровня у ЛО животных.

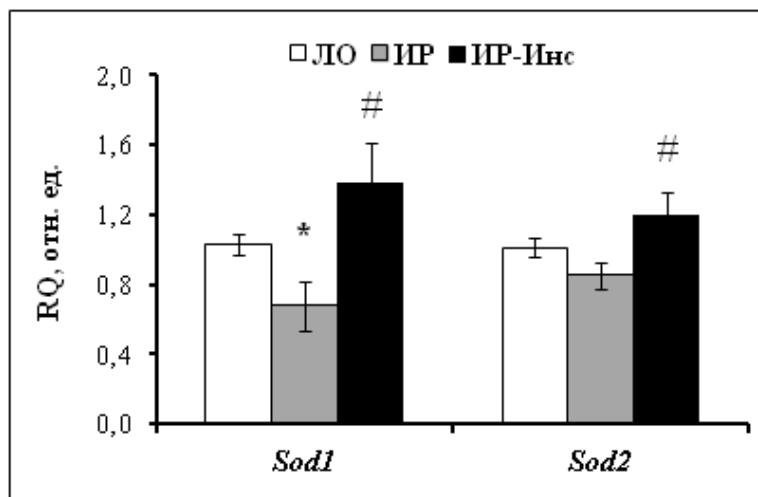


Рисунок 10. Действие инсулина при его интраназальном введении в дозе 0.5 IU/животное на экспрессию генов цитоплазматической и митохондриальной форм супероксиддисмутазы (*Sod1*, *Sod2*) в коре больших полушарий мозга крыс в условиях двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии.

ЛО – ложнооперированные крысы, ИР – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии, ИР-Инс – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии и получавшие инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Различия достоверны: * – по сравнению с ЛО, $p < 0.05$; # – по сравнению с ИР, $p < 0.05$.

На следующем этапе проводилось изучение изменения экспрессии генов и содержания проапоптотического белка *Bax* и антиапоптотического белка *Bcl-2* при интраназальном введении инсулина крысам, подвергнутым ИР. В коре мозга крыс, подвергнутых ИР, наблюдали значительное уменьшение экспрессии генов *Bax* (в 1.8 раз) и *Bcl2* (в 1.9 раза) по сравнению с группой «ЛО» ($p < 0.01$) (Рис. 11 (А)). Интраназальное введение инсулина нормализовало экспрессию гена антиапоптотического белка *Bcl-2*, не влияя при этом на экспрессию гена *Bax* в коре мозга крыс, подвергнутых ИР (Рис. 11 (А)).

Методом иммуноблоттинга мы обнаружили повышение соотношения *Bax/Bcl-2* в коре больших полушарий мозга крыс в 2.1 раза и в гиппокампе в 1.5 раза при ИР по сравнению с группой «ЛО» ($p < 0.01$) (Рис. 11 (Б, В)). При этом интраназальное введение инсулина в дозе 0.5 IU/животное нормализовало отношение *Bax/Bcl-2* в обеих исследованных структурах мозга ($p < 0.01$) (Рис. 11 (Б, В)), что может указывать на антиапоптотическое действие инсулина при ИР. Полученные данные *in vivo* сходны с описанным нами ранее антиапоптотическим эффектом инсулина *in vitro* при индукции окислительного стресса добавлением H_2O_2 на культуре нейронов коры мозга крыс.

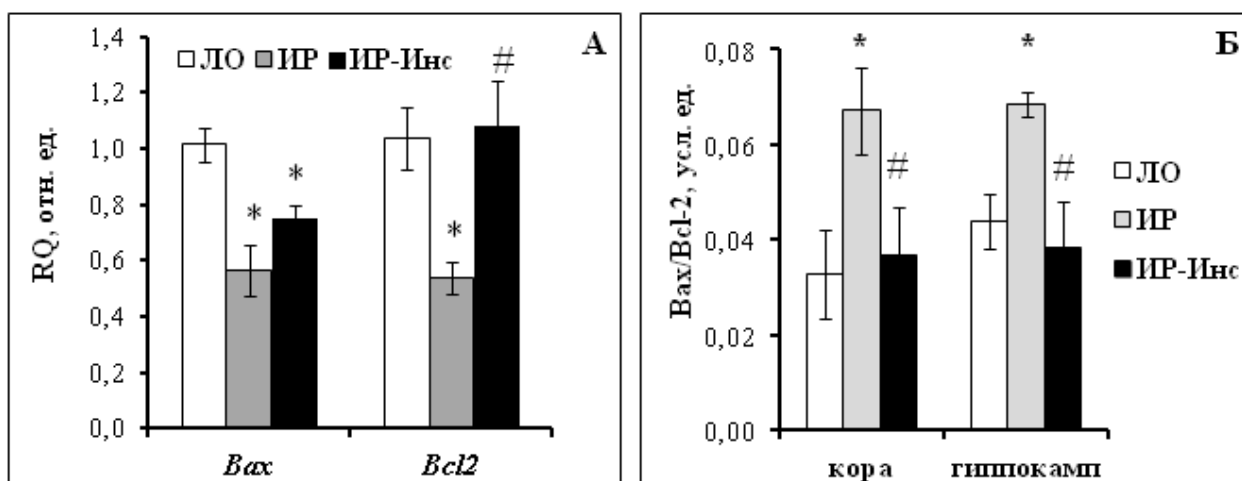
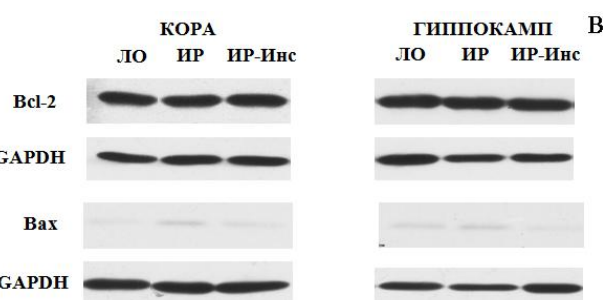


Рисунок. 11. Влияние инсулина при его интраназальном введении в дозе 0.5 IU/животное на экспрессию генов про- и антиапоптотических белков Bax и Bcl-2 (Bax и Bcl2) в коре больших полушарий мозга (А) и их содержание (Б) в коре больших полушарий и гиппокампе крыс, подвергнутых ишемии переднего мозга и реперфузии.

ЛО – ложнооперированные крысы, ИР – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии, ИР-Инс – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии и получавшие инсулин. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=7$). Различия достоверны: * – по сравнению с ЛО, $p < 0.01$; # – по сравнению с ИР, $p < 0.01$. В – репрезентативные иммуноблоты, иллюстрирующие действие инсулина и ишемии-реперфузии на уровень Bax и Bcl-2 в коре мозга и гиппокампе крыс.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История изучения инсулина и его эффектов насчитывает практически 100 лет со времени его выделения Маклеодом и Бантингом, которые были удостоены за эти работы Нобелевской премии в 1923 г. Однако до сих пор спектр действия этого гормона вызывает неподдельный интерес у исследователей – только в 2019 году в базе данных PubMed зарегистрировано более 14000 статей с упоминанием инсулина. Открытие Хавранковой и соавторами инсулина и его рецепторов в ЦНС положило начало исследованию его центральных эффектов (Navrankova *et al.*, 1979; Navrankova *et al.*, 1981). Однако и сейчас регуляторное воздействие инсулина на структуры головного мозга и механизмы, лежащие в его основе, оказываются менее изученными, чем таковые в экстрацеллюлярных органах.

Полученные нами данные о механизмах нейропротекторного действия инсулина, как на первичной культуре нейронов коры головного мозга в условиях H_2O_2 -индуцируемого окислительного стресса, так и при интраназальном введении инсулина крысам с экспериментальной двухсосудистой ишемией переднего мозга, имеют не только фундаментальное, но и важное практическое значение. Изучение механизмов защитного действия инсулина при интраназальном введении открывает новые перспективы для его широкого использования в клинике для ослабления или предотвращения последствий глобальной ишемии головного мозга, которая может наблюдаться при черепно-мозговой травме, асфиксии, гипотензии, сердечном приступе или в ходе оперативного вмешательства.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что инсулин обладает защитным эффектом при его действии в широком диапазоне концентраций на культивируемые нейроны коры мозга крыс в модели депривации глюкозы и кислорода и в условиях H_2O_2 -индуцируемого окислительного стресса. Инсулин предотвращает гибель нейронов, вызванную активацией апоптоза, причем его антиапоптотическое действие включает нормализацию соотношения про- и антиапоптотических белков Bax/Bcl-2 и снижение активности каспазы-3 и содержания ее расщепленного фрагмента, как маркеров апоптоза, повышенных в условиях H_2O_2 -индуцируемого окислительного стресса.
2. Впервые установлено, что инсулин подавляет продукцию активных форм кислорода в нейронах первичной культуры коры мозга крыс, как при депривации глюкозы и кислорода, так и при действии H_2O_2 , причем в условиях H_2O_2 -индуцируемого окислительного стресса инсулин предотвращает падение мембранного потенциала митохондрий в нейронах.
3. Нейропротекторный эффект инсулина обусловлен его воздействием на активность ряда протеинкиназ в нейронах коры мозга крыс. Инсулин активирует Akt-киназу и, тем самым, ингибирует киназу-3 β гликогенсинтазы (GSK3 β). В присутствии ингибитора тирозинкиназы рецептора инсулина и ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы антиоксидантный и защитный эффекты инсулина подавляются. Инсулин активирует ERK1/2-киназы и снижает активность АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК), что также вносит вклад в повышение выживаемости нейронов. В присутствии ингибитора ERK1/2 или активатора АМПК защитный эффект инсулина ослабляется.
4. Впервые показано, что интраназальное введение инсулина крысам, подвергнутым затем двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии, снижает накопление продуктов перекисного окисления липидов (диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа), предотвращает снижение экспрессии генов супероксиддисмутаза 1 и 2, повышает экспрессию гена антиапоптотического белка Bcl-2 и нормализует соотношение Bax/Bcl-2, препятствует снижению как активности Na^+/K^+ -АТФазы, так и экспрессии ее каталитических субъединиц $\alpha 2$ и $\alpha 3$ в коре мозга, что свидетельствует в пользу антиоксидантного и нейропротекторного эффектов инсулина *in vivo*.
5. Совокупность полученных данных *in vitro* и *in vivo* указывает на то, что инсулин в условиях окислительного стресса нормализует функциональное состояние нервных клеток, что обусловлено восстановлением инсулин-регулируемых сигнальных систем в нейронах, и приводит к повышению их выживаемости.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

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.
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.
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.
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.

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. Сухов И.Б., Лебедева М.Ф., Захарова И.О., Деркач К.В., Баюнова Л.В., **Зорина И.И.**, Аврова Н.Ф., Шпаков А.О. Улучшение пространственной памяти у крыс с неонатальным сахарным диабетом 2-го типа при интраназальном введении инсулина и ганглиозидов //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168. – №. 9. – С. 282-286.

7. **Зорина И.И.**, Фокина Е.А., Захарова И.О., Баюнова Л.В., Шпаков А.О. Особенности изменений перекисного окисления липидов и активности Na^+/K^+ -АТФазы в коре мозга у старых крыс в условиях двухсосудистой церебральной ишемии/реперфузии //Успехи геронтологии. – 2019. – Т. 32. – №. 6. – С. 941-947.

8. 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.

Тезисы докладов

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 Bax/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 Пушкинская 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.

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).

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.

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.

18. **Зорина И.И.**, Захарова И.О., Баюнова Л.В., Шпаков А.О. Механизмы защитного действия инсулина при глобальной ишемии и реперфузии головного мозга //Интегративная физиология. Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. Санкт-Петербург (24-26 сентября 2019 г.). – С. 109-110.

19. Рыжов Ю.Р., Фокина Е.А., **Зорина И.И.** Влияние реперфузии различной длительности на содержание продуктов перекисного окисления липидов в коре мозга старых крыс после двухсосудистой ишемии переднего мозга //Конференция молодых ученых и VIII школа «Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты» имени Н.М. Эмануэля. Москва (28-30 октября 2019 г.). – С. 232-233.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система;

АФК – активные формы кислорода;

ДГК – депривация глюкозы и кислорода;

ДК – диеновые конъюгаты;

ИР – ишемия и реперфузия;

ЛО – ложнооперированные животные;

МДА – малоновый диальдегид;

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид;

ОШ – основания Шиффа;

ПОЛ – перекисное окисление липидов;

СОД – супероксиддисмутаза;

ТК – триеновые конъюгаты;

АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа;

GSK3 β – киназа-3 β гликогенсинтазы;

МАРК – митогенактивируемые протеинкиназы;

PI-3-K – фосфатидилинозитол-3-киназа;

TMRM – тетраметилродамин.