

На правах рукописи



ПОМЫТКИН ИГОРЬ АНАТОЛЬЕВИЧ

**МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО
РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОНАХ**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в ФГБУН Научном центре биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства.

Научный консультант: **Каркищенко Владислав Николаевич**,
доктор медицинских наук, профессор, директор
ФГБУН Научного центра биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства,
г. Красногорск

Официальные оппоненты: **Антохин Александр Иванович**,
доктор биологических наук, профессор, профессор
кафедры общей и клеточной биологии ФГАОУ ВО
Российского национального исследовательского
медицинского университета им. Н.И. Пирогова, г. Москва
Бокша Ирина Сергеевна,
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный
сотрудник лаборатории биологически активных
наноструктур ФГБУ Национального исследовательского
центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи, г. Москва
Кост Наталия Всеволодовна,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник
лаборатории патофизиологии ФГБУН Научного центра
психического здоровья, г. Москва

Ведущая организация: **ФГБУН Федеральный научно-клинический центр
реаниматологии и реабилитологии**, г. Москва

Защита диссертации состоится «31» октября 2024 г. в 14.00 часов на заседании
Диссертационного совета 24.1.108.03 при ФГБУН Федеральном исследовательском
центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии
наук (ФИЦ ПХФ и МХ РАН) по адресу: 142432, Московская обл., г. Черноголовка,
Северный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте
ФИЦ ПХФ и МХ РАН <https://icp-ras.ru/>. Текст автореферата размещен на
официальном сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу
<http://vak3.minobrnauki.gov.ru/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета 24.1.108.03
канд. биол. наук

 Аникина Лада Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сигнальная система инсулинового рецептора (ИР) широко распространена в мозге, где имеет некоторые отличия от классических инсулин-чувствительных тканей, таких как печень, мышцы, сердце и жировая ткань. Нейроны мозга экспрессируют исключительно короткую изоформу А рецептора, которая активируется как инсулином, так и инсулиноподобным фактором роста 2 (IGF2), в физиологически релевантном диапазоне их концентраций, в отличие от периферических тканей взрослых млекопитающих, где преимущественно распространена изоформа В, активируемая только инсулином. Инсулиновая сигнализация повышает утилизацию глюкозы в активно работающем мозге, а также регулирует множество процессов, таких как взрослый нейрогенез, рост аксонов и дендритов, синаптогенез, долговременную потенциацию возбуждающей нейротрансмиссии и ряд высших функций, таких как формирование памяти и регуляция пищевого поведения.

Нарушение биологического ответа на инсулин (инсулиновая резистентность) в мозге наблюдается при диабете 2 типа, нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, а также в острых состояниях, таких как черепно-мозговая травма и ишемический инсульт, где ключевую роль повреждающего фактора играет глутаматная эксайтотоксичность. Среди причин инсулиновой резистентности важную роль играют нарушения фосфорилирования в системе передачи сигнала рецептора инсулина, проявляющиеся как патологическое снижение доли активных фосфорилированных форм (гипофосфорилирование) самого рецептора и нижележащих сигнальных молекул IRS1, Akt и mTOR в ответ на инсулин, что было показано, в частности, в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера (Talbot et al. 2012). С учетом того, что фосфорилирование ИР по трем тирозинам Y1146, 1150 и 1151 (нумерация изоформы А рецептора) является решающим условием активации рецепторной тирозинкиназы ИР (Wei et al. 1995) и первым шагом в каскаде передачи сигнала инсулина, опосредующем все биологические ответы инсулина (Chen et al. 2022),

гипофосфорилирование ИР является первой и может быть главной причиной нейрональной инсулиновой резистентности. Молекулярные механизмы, приводящие к гипофосфорилированию ИР в нейронах мозга, неизвестны.

Ишемический инсульт – одно из заболеваний, при котором инсулиновая резистентность играет роль фактора, препятствующего восстановлению функций мозга. Инсульт является основной причиной инвалидизации населения в России, причем согласно статистике 31% пациентов, перенесших инсульт, зависит от посторонней помощи для ухода за собой, 20% не могут самостоятельно ходить и только 8% могут вернуться к прежней работе. В мире инсульт остается третьей причиной смерти и инвалидности вместе взятых, а связанные с инсультом затраты глобальной экономики составляют 0,66% от мирового валового продукта (Feigin et al. 2022). Возможности фармакотерапии ишемического инсульта крайне ограничены. В первые часы острейшей фазы инсульта ($\leq 4,5$ часа) рекомендуется прием тромболитических препаратов (Wardlaw et al. 2014). Разработка нейропротекторов, снижающих гибель нейронов, не имела успеха несмотря на многолетние усилия и успешные доклинические испытания более чем 1000 экспериментальных кандидатов (O'Collins et al. 2006; Lourbopoulos et al. 2021). Поэтому существует необходимость в новых подходах к лечению инсульта. Постинсультная инсулиновая резистентность была обнаружена как патологический фактор, возникающий в острейшей фазе ишемического инсульта и влияющий на будущий клинический результат, причем пациенты с более высокими значениями индекса инсулиновой резистентности НОМА-IR, имеют повышенный неврологический дефицит и повышенный риск инвалидизации, повторного инсульта и смерти в первый год после инсульта (Jing et al. 2017; Li et al. 2018; Ago et al. 2018; Åberg et al. 2019). Постинсультная инсулиновая резистентность по времени совпадает с периодом максимальной спонтанной нейропластичности мозга, когда в мозге с максимальной интенсивностью идут спонтанные процессы реорганизации структуры, функций и связей, и представляет собой барьер, препятствующих восстановлению функций мозга в раннем восстановительном периоде инсульта.

С учетом широкого распространения заболеваний, в которых нарушение биологического ответа на инсулин является одним из факторов патогенеза, и которые представляют большую социальную и экономическую проблему, требующую решения, исследования в области инсулиновой сигнализации имеют высокую актуальность и могут обеспечить появление новых подходов к лечению широкого спектра заболеваний, в том числе ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде.

Степень разработанности проблемы

Феномен инсулиновой резистентности мозга установлен, однако, механизмы ее возникновения изучены недостаточно и отсутствуют подходы к ее лечению. Механизмы регуляции чувствительности ИР в нейронах, а также причины, приводящие к патологическому гипофосфорилированию инсулинового рецептора в ответ на инсулин неизвестны. Поэтому необходимы исследования, направленные на изучение фундаментальных механизмов регуляции чувствительности инсулиновых рецепторов в нейронах для выявления новых подходов к лечению заболеваний, связанных с нарушением биологического ответа на инсулин, в том числе при острых состояниях, таких как ишемический инсульт, где роль повреждающего фактора играет глутаматная эксайтотоксичность.

Цели исследования

Цель исследования – изучить молекулярные механизмы регуляции чувствительности инсулиновых рецепторов в нейронах для создания на этой основе новых подходов к лечению нейрональной инсулиновой резистентности.

Задачи исследования

1. Изучить роль митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и ингибировании протеинтирозинфосфатаз, известных негативных регуляторов фосфорилирования инсулиновых рецепторов.
2. Изучить молекулярные механизмы регуляции фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах окислительным сигналом инсулина.
3. Исследовать роль глутаматной эксайтотоксичности, ключевого повреждающего фактора ишемии, в развитии инсулиновой резистентности в нейронах.

4. Создать средство, повышающее чувствительность рецепторов инсулина в нейронах (нейрональный инсулин-сенситайзер), и исследовать его эффективность на биомоделях церебральной ишемии, старения и токсичности β -амилоида.

Научная новизна исследования

В настоящем исследовании впервые показано, что митохондрия вовлечена в инсулиновую сигнализацию в качестве источника окислительного сигнала (H_2O_2), генерируемого в ответ на инсулин, причем скорость генерации сигнальной H_2O_2 имеет гиперболическую зависимость Михаэлиса-Ментен от концентрации сукцината в интервале его физиологически релевантных концентраций, и эта сигнальная H_2O_2 вовлечена в ингибирование активности протеинтирозинфосфатаз, известных негативных регуляторов фосфорилирования инсулинового рецептора. Впервые показано существование неизвестного ранее сигнального пути в нейронах, функция которого состоит в регуляции чувствительности инсулинового рецептора, причем роль регулятора играет окислительный сигнал инсулина, а объектом регуляции является фосфорилирование инсулинового рецептора по критическим остаткам тирозина, которые регулируют активность рецепторной тирозинкиназы. Впервые показано, что сукцинатдегидрогеназа (СДГ) митохондрий вовлечена в генерацию окислительного сигнала инсулина в нейронах, а сам сигнал представляет собой кратковременный однократный выброс H_2O_2 , предшествующий фосфорилированию и необходимый для фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах. Впервые показано, что фосфорилирование инсулинового рецептора сверхчувствительно к ингибированию окислительного сигнала, что выражается в резком сигмоидальном падении способности рецептора к фосфорилированию в ответ на инсулин при подавлении окислительного сигнала. Впервые показано, что деполяризация митохондрий является фактором, вызывающим гипофосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах через воздействие на окислительный сигнал инсулина в нейронах. Впервые показано, что глутаматная эксайтотоксичность через деполяризацию митохондрий вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих киназ сигнального каскада инсулина, что является прямым механизмом развития

нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, где глутаматная эксайтотоксичность является поражающим фактором, в частности при ишемическом инсульте. На основе выявленных механизмов создан первый нейрональный инсулин-сенситайзер (дихолинсукцинат) – средство, повышающее чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к инсулину и показана его эффективность на биомоделях заболеваний, для которых инсулиновая резистентность является известным патогенетическим фактором.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость настоящего исследования состоит в том, что выявлена роль митохондрии как источника сигнала и участника инсулиновой сигнализации на стадии фосфорилирования ИР, посттрансляционной модификации, определяющей активность рецепторной тирозинкиназы, что дает обоснование причинно-следственной связи между митохондриальной дисфункцией и нарушениями биологического ответа на инсулин в таких состояниях, как диабет 2 типа и болезнь Альцгеймера. Открыт сигнальный путь, регулирующий чувствительность инсулинового рецептора к инсулину в нейронах. Исследование раскрывает неизвестную ранее роль окислительного сигнала инсулина как необходимой составной части механизма фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах и роль митохондрий как источника этого сигнала в нейронах. Выявленная сверхчувствительность фосфорилирования рецептора инсулина к ингибированию окислительного сигнала дает теоретическое объяснение патологическому гипофосфорилированию инсулинового рецептора в нейронах как явлению, возникающему, когда окислительный сигнал инсулина по какой-либо причине не достигает определенного порогового значения, в частности при деполяризации митохондрий. Связанное с деполяризацией митохондрий в условиях глутаматной эксайтотоксичности гипофосфорилирование рецептора инсулина и нижележащих киназ Akt, mTOR, и GSK3 β дает представление о природе нейрональной инсулиновой резистентности и создает теоретические предпосылки для разработки новых подходов к лечению заболеваний, связанных с глутаматной эксайтотоксичностью, включая ишемический инсульт.

Практическая значимость исследования заключается в том, что на основе выявленных механизмов регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах разработан нейрональный инсулин-сенситайзер (дихолинсукцинат), повышающий фосфорилирование ИР в ответ на физиологически релевантные концентрации инсулина, эффективность и безопасность которого установлена в доклинических исследованиях и клинических исследованиях I, II и III фазы, по результатам которых дихолинсукцинат показал эффективность в лечении ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде.

Методология и методы исследования

Объектами исследований *in vitro* являются первичные культуры нейронов мозжечка и коры мозга крыс, а также клеточные органеллы – митохондрии. Методология исследований построена на измерениях фосфорилирования инсулинового рецептора и нижележащих киназ, а также измерениях H_2O_2 , потенциала внутренней мембраны митохондрий и внутриклеточного кальция в различных экспериментальных условиях. Для подтверждения основных результатов используется широкий спектр методов, в том числе биохимические методы анализа, ELISA, мультиплексный анализ фосфопротеинов и флуоресцентная микроскопия с использованием зондов. Объектами исследования *in vivo* являются мелкие лабораторные животные – мыши линии C57Bl/6 и крысы линии Вистар. Методология исследования *in vivo* построена на измерениях магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах 1H и ^{31}P , позволяющей неинвазивно прижизненно измерять содержание нейронального маркера N-ацетиласпартата и макроэргов АТФ и фосфокреатина в мозге животных в сопоставлении с тестами когнитивной функции в биомоделях ишемии, старения и токсичности β -амилоида.

Личный вклад

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке планов и протоколов исследований. Автор выдвинул идею, разработал план исследований и координировал исследования механизмов регуляции чувствительности инсулиновых рецепторов в нейронах, а также впервые синтезировал

дихолинсукцинат, нейрональный инсулин-сенситайзер, и координировал его исследования на биомоделях. Автором проведены анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на все-российских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту научной специальности

Положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.4. «Биохимия» (отрасли науки – биологические, медицинские, сельскохозяйственные, ветеринарные) и направлениям исследований п.7 «Гормоны. Механизмы передачи гормональных сигналов. Биохимическая эндокринология в норме и при патологии» и п.11 «Биохимические/метаболические/энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологии. Функциональная и клиническая метаболомика в норме и при патологии.».

Положения, выносимые на защиту

1. Митохондрия участвует в инсулиновой сигнализации в качестве источника окислительного сигнала (H_2O_2), генерируемого в ответ на инсулин, причем скорость генерации сигнальной H_2O_2 имеет гиперболическую зависимость Михаэлиса-Ментен от концентрации сукцината в интервале его физиологически релевантных концентраций, и эта сигнальная H_2O_2 вовлечена в ингибирование активности протеинтирозинфосфатаз, известных негативных регуляторов фосфорилирования инсулинового рецептора.

2. В нейронах обнаружен сигнальный путь, регулирующий чувствительность инсулинового рецептора, где объектом регуляции является фосфорилирование инсулинового рецептора, а роль регулятора играет окислительный сигнал инсулина, ключевую роль в генерации которого играет сукцинатдегидрогеназа комплекса II митохондрий.

3. Окислительный сигнал инсулина в нейронах представляет собой кратковременное повышение скорости образования H_2O_2 в ответ на инсулин, предшествующее фосфорилированию инсулинового рецептора и играющее ключевую

роль в регуляции степени фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах.

4. Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах проявляет сверхчувствительность к ингибированию окислительного сигнала, что выражается в резком сигмоидальном падении способности рецептора к фосфорилированию в ответ на инсулин при подавлении окислительного сигнала, что дает теоретическое обоснование явления патологического гипофосфорилирования инсулинового рецептора в условиях, когда нет недостатка в инсулине.

5. Глутаматная эксайтотоксичность вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих киназ сигнального каскада инсулина Akt, mTOR и GSK3 β , что объясняет развитие нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, где глутаматная эксайтотоксичность является известным поражающим фактором, в частности при ишемическом инсульте.

6. На основе выявленных механизмов создан нейрональный инсулин-сенситайзер (дихолинсукцинат), повышающий фосфорилирование ИР в ответ на физиологически релевантные концентрации инсулина, и исследована его эффективность на биомоделях церебральной ишемии, старения и токсичности β -амилоида, где инсулиновая резистентность является одним из известных патогенетических факторов.

Внедрение результатов исследования

Препарат Дирекорд, содержащий дихолинсукцинат в качестве активной фармацевтической субстанции, находится на регистрации в Минздраве РФ после завершения клинических исследований I, II и III фазы.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность полученных результатов основана на выборе методов исследования, которые соответствуют цели, объекту и задачам исследования; выборе нескольких объектов исследования и нескольких методов исследования для решения каждой из задач; использовании достаточного количества объектов в группах сравнения и адекватных методов статистического анализа данных исследования; и высокой степени согласованности результатов исследования.

Апробация результатов исследования

Результаты исследования были представлены на конференциях: шестой международный конгресс «Наука и технология открытия лекарств» (18-22 октября 2008 г., Пекин, Китай), международная конференция по болезни Альцгеймера (26-31 июля 2008 г., Чикаго, США), четвертый европейский конгресс международной ассоциации геронтологии и гериатрики (5-8 июля 2007 г., С.-Петербург, Россия), третий национальный конгресс по регенеративной медицине (15-18 ноября 2017 г., Москва, Россия), двадцатая научно-практическая межрегиональная конференции «Биомедицина и биомоделирование» (22-23 мая 2024 г., Московская область – Санкт-Петербург – Ростов-на-Дону).

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 25 статей в зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК, в том числе 8 из них входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору The SCImago Journal Rank (SJR) of Scopus в год публикации. По результатам диссертации получено 13 патентов на изобретение, в том числе из них 3 патента Российской Федерации, 3 патента Евразии, 1 Европейский патент, 3 патента США, 1 патент Японии и 3 патента КНР.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа оформлена в соответствие с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011, изложена на 255 листах машинописного текста, состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и 4 приложений (справочных). Список литературы включает 433 источника. Текст иллюстрирован 24 таблицами и 53 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Инсулиновый рецептор (ИР) представляет собой трансмембранный гетеротетрамерный белок с тирозинкиназной активностью, которая регулируется связыванием инсулина с α -цепью рецептора. После открытия ИР в мозге крыс (Navrankova J et al. 1978), а затем и человека (Rosenzweig et al. 1980), изучению инсулиновой сигнализации в мозге были посвящены многочисленные исследования. Инсулин поступает из кровотока в мозг через гематоэнцефалический барьер рецепторным трансцитозом, а также синтезируется *de novo* в нейронах (Wei et al. 1990). Нейроны экспрессируют исключительно короткую изоформу А рецептора, которая активируется инсулином и инсулиноподобным фактором роста 2 (IGF2) в интервале их физиологически релевантных концентраций. Максимальная плотность ИР в нейронах обнаруживается в постсинаптической плотности дендритных шипиков в составе возбуждающих синапсов, где ИР локализуется вместе с NMDA рецепторами (Abbott et al. 1999). В мозге ИР регулирует энергетический метаболизм, пищевое поведение и процессы нейропластичности, такие как взрослый нейрогенез, рост аксонов и дендритов, синаптогенез и синаптическую пластичность. ИР фосфорилирует субъединицы NMDA рецептора, увеличивая плотность NMDA рецепторов в постсинаптической мембране и ионные токи через эти рецепторы, вызывая этим долговременную потенциацию возбуждающей нейротрансмиссии.

Активность ИР регулируется фосфорилированием β -цепи рецептора (IR β), причем фосфорилирование тирозинов Y1146, 1150 и 1151 (нумерация изоформы А рецептора) ведет к полной активации рецепторной тирозинкиназы и началу передачи сигнала инсулина (Hubbard et al. 1994, 1997; Wei et al. 1995), а обратная реакция дефосфорилирования с участием редокс-чувствительных протеинтирозинфосфатаз (ПТФ) ведет к инактивации рецептора (Wälchli et al. 2000). Было обнаружено, что патологическое снижение фосфорилирования Y1146, 1150 и 1151 в составе IR β (гипофосфорилирование) является одной из причин центральной инсулиновой резистентности (Talbot et al. 2012).

В адипоцитах инсулин вызывает выброс перекиси водорода (H_2O_2), причем роль источника H_2O_2 играет никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) оксидаза 4 (Nox4), роль посредника между ИР и Nox4 играет G-белок $G\alpha_{i2}$, а сама H_2O_2 ингибирует ПТФ и так влияет на фосфорилирование ИР (Mukherjee et al. 1978; Krieger-Brauer et al. 1997; Mahadev et al. 2004).

Таким образом, эндогенный окислительный сигнал инсулина (H_2O_2) влияет на уровни фосфорилирования ИР, и хотя эти сведения относятся исключительно к жировой ткани, подобный тип сигнализации гипотетически может иметь место и в других тканях, поэтому расширенное исследование окислительного сигнала инсулина может создать предпосылки для появления новых подходов в лечении инсулиновой резистентности.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты на животных выполнялись в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных целях, и были одобрены локальными этическими комитетами. Изолированные митохондрии печени и сердца крыс Вистар получали методом дифференциального центрифугирования. Культуры гранулярных нейронов мозжечка и коры получали из мозга крыс Вистар. Концентрацию H_2O_2 оценивали по окислению фенолового красного или флуориметрически с использованием красителя Amplex Red в присутствии пероксидазы хрена. Общую активность протенирозинфосфатаз (ПТФ) оценивали по высвобождению неорганического фосфата из фосфотирозина. Уровень фосфорилирования ИР оценивали с помощью ELISA (Calbiochem), и представляя результат в виде отношения $pYpY-IR/IR$, где $pYpY-IR$ – количество фосфорилированного ИР по остаткам Y1150/1151 (нумерация изоформы А рецептора); IR – общее количество ИР. Потенциал внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) оценивали по флуоресценции родамина 123 (Rh123). Аппроксимацию экспериментальных значений функцией Хилла (1) выполняли с помощью нелинейной регрессии:

$$Y = Start + (End - Start) \times \frac{X^n}{K^n + X^n} \quad (1)$$

где Y — значение параметра, X — концентрация, K — концентрация, при которой достигается половина эффекта и n — коэффициент Хилла.

Уровни аденозинтрифосфата (АТФ) и фосфокреатина (ФК) в мозге животных оценивали методом ^{31}P магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) *in vivo*. Уровни N-ацетиласпартата (NAA/Cr) в мозге оценивали методом ^1H МРС *in vivo*. Когнитивные функции оценивали в тестах открытого поля, условного рефлекса пассивного избегания и водного лабиринта Морриса.

Статистический анализ данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента, однофакторного ANOVA, однофакторного ANOVA с повторными измерениями, или двухфакторного ANOVA в зависимости от дизайна эксперимента. Следующие обозначения были использованы: M – среднее, s – стандартное отклонение, m – стандартная ошибка, n – объем выборки, p – достигнутый уровень значимости. Критерии Шапиро – Уилка или Колмогорова – Смирнова применялись для выбора параметрических или непараметрических методов статистического анализа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МИТОХОНДРИЙ В ГЕНЕРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СИГНАЛА ИНСУЛИНА И РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗ

3.1 Роль митохондрии в генерации окислительного сигнала инсулина

В настоящем исследовании впервые показано, что окислительная сигнализация инсулина не является тканеспецифичным явлением для адипоцитов, но имеет место и в других тканях с тем отличием, что источником окислительного сигнала в сердце и печени является митохондрия, а не НАДФН-оксидаза, как это было показано ранее для адипоцитов.

Стимуляция инсулином препаратов печени ведет к немедленному выбросу H_2O_2 и снижению общей активности протеинтирозинфосфатаз по сравнению с контролем, причем малонат, ингибитор сукцинатдегидрогеназы (СДГ), подавляет

эффекты инсулина, а сукцинат, субстрат СДГ, наоборот, повышает образование H_2O_2 и подавляет активность ПТФ (Табл. 1).

Таблица 1. Влияние инсулина на скорость выделения H_2O_2 и активность ПТФ.

Добавки	H_2O_2 , усл.ед. ($M \pm m$)	ПТФ, % ($M \pm m$)
Нет (контроль)	$1,0 \pm 0,1$	100 ± 4
Инсулин 1 мкЕд/мл	$10,8 \pm 3,4^*$	$27 \pm 4^*$
Инсулин 1 мкЕд/мл + Малонат 2 мМ	$3,9 \pm 1,5^\#$	$65 \pm 3^\#$
Сукцинат 2 мМ	$7,6 \pm 0,5^*$	$28 \pm 3^*$

* $p < 0,001$ по сравнению с контролем ($n=10$); $^\#p < 0,001$ по сравнению с инсулином ($n=10$).

Снижение активности ПТФ в ответ на стимуляцию 1 мкЕд/мл инсулина является кратковременным с минимумом активности на 5–10 мин (Рис. 1А).

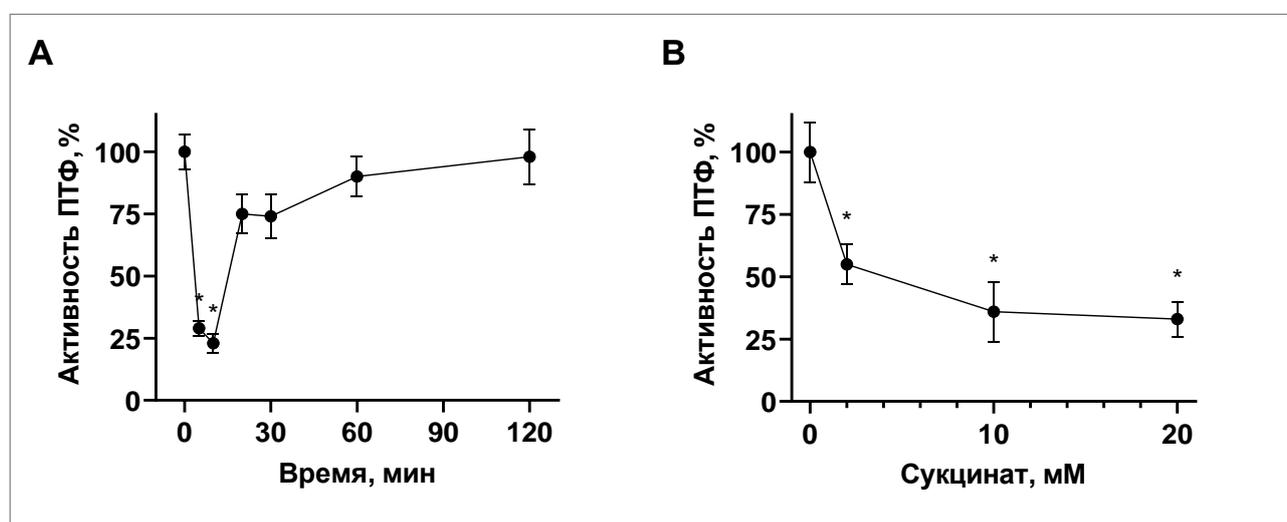


Рисунок 1. Зависимость общей активности ПТФ в препаратах печени крыс от продолжительности инкубации с инсулином (А) и концентрации сукцината (В). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=10$). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Сукцинат дозозависимо снижал активность ПТФ (Рис. 1В), причем каталаза полностью подавляла этот эффект сукцината (Табл. 2), из чего следует, что ингибирующий эффект сукцината на активность ПТФ опосредуется H_2O_2 .

Таблица 2. Влияние 10-минутной инкубации сукцината в присутствии каталазы на активность ПТФ в гомогенатах печени крыс.

Добавки	Активность ПТФ, %
Нет (контроль)	100 ± 12
Сукцинат	$55 \pm 8^*$
Сукцинат + Каталаза	$92 \pm 15^\#$

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем ($n=10$), $^\#p < 0,05$ по сравнению с сукцинатом ($n=10$).

В целом, эти результаты указывают на роль сукцината как возможного субстрата в генерации окислительного сигнала инсулина, где функция последнего состоит во временном ингибировании активности ПТФ.

3.2 Влияние инсулина на скорость генерации H_2O_2 в печени и сердце

Для выявления зависимости окислительного сигнала инсулина от концентрации сукцината митохондрии, выделенные после инкубации печени, сердца или жировой ткани 1 мин с 1 мкЕд/мл инсулина или без (контроль), инкубировали с 1–80 мкМ сукцината и определяли скорость генерации H_2O_2 (Рис. 2).

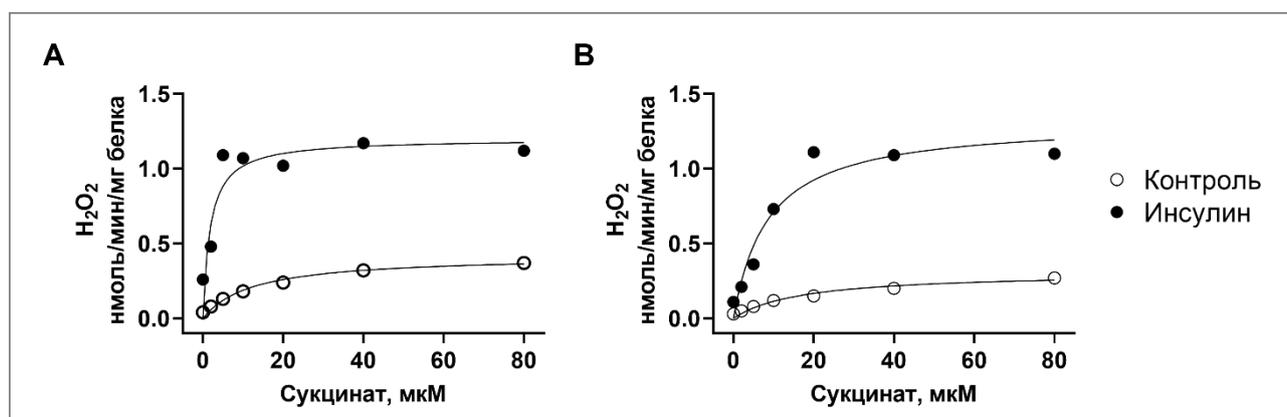


Рисунок 2. Эффект инсулина на скорость генерации H_2O_2 митохондриями печени (А) и сердца (В) крыс. Символы – среднее ($n = 3$); линии - аппроксимация экспериментальных данных к уравнению Михаэлиса-Ментен.

Кратковременная стимуляция инсулином вызывала многократное повышение скорости генерации H_2O_2 митохондриях печени и сердца, но не жировой ткани, наиболее выраженное в интервале концентраций сукцината 1–10 мкМ. Скорость образования инсулин-индуцированной H_2O_2 в сердце и печени от концентрации сукцината в интервале 1–80 мкМ подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен $V = V_{max} \times S / (K_m + S)$, где V – скорость генерации H_2O_2 ; S – концентрация сукцината; V_{max} – максимальная скорость; K_m – константа Михаэлиса (Табл. 3).

Таблица 3. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен.

Митохондрии	Предобработка ткани	V_{max} , нМ×мин ⁻¹ ×мг ⁻¹	K_m , мкМ	Коэффициент корреляции r
Сердце	Контроль	0,22	7,0	0,986
	Инсулин	1,41	11,7	0,989
Печень	Контроль	0,33	6,4	0,989
	Инсулин	1,32	3,2	0,934
Жир	Контроль	0,054	7,8	0,973
	Инсулин	0,071	3,5	0,876

Таким образом, окислительный сигнал инсулина не является тканеспецифичным для адипоцитов. Впервые показано, что такой тип сигнализации имеет место в печени и сердце, но источником окислительного сигнала инсулина в этих тканях служит митохондрия, а не НАДФН-оксидаза как в адипоцитах. Скорость генерации сигнальной H_2O_2 имеет гиперболическую зависимость от концентрации сукцината в интервале его физиологически релевантных концентраций 1–80 мкМ и описывается уравнением Михаэлиса-Ментен – уравнением наиболее известной модели ферментативной кинетики, причем максимальный прирост скорости образования сигнальной H_2O_2 наблюдается в интервале 1–10 мкМ, соответствующем уровням сукцината в крови у человека в состоянии покоя (Nochachka et al. 1976).

Критическая зависимость окислительного сигнала инсулина от концентрации сукцината и активности СДГ комплекса II митохондрий указывает на участие СДГ в генерации сигнальной H_2O_2 . Известно, что сайтами генерации митохондриальной H_2O_2 с участием активности СДГ могут быть комплекс II или комплекс I митохондрий, в зависимости от концентрации сукцината (Quinlan et al. 2012). В диапазоне концентраций менее 200 мкМ, включающем интервал физиологически релевантных концентраций сукцината, основным генератором H_2O_2 является реакция O_2 с восстановленным флавинадениндинуклеотидом ($FADH_2$) в составе СДГ комплекса II митохондрий (сайт F_{II}), получающим восстановительные эквиваленты прямо от сукцината, тогда как при патофизиологических миллимолярных концентрациях сукцината H_2O_2 генерируется комплексом I митохондрий за счет, как полагают, обратного трансфера электрона от комплекса II митохондрий. С учетом этих обстоятельств наиболее вероятным сайтом формирования окислительного сигнала инсулина с участием сукцината является сайт F_{II} комплекса II митохондрий.

Согласно результатам настоящего исследования функция митохондриального окислительного сигнала инсулина, аналогично функции H_2O_2 в адипоцитах, состоит в кратковременном ингибировании активности ПТФ, известных негативных регуляторов фосфорилирования ИР (Goldstein et al. 1998).

4. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОНАХ

4.1 Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах

Зависимость фосфорилирования β -цепи ИР по остаткам тирозина Y1150/1151 (нумерация изоформы А), регулирующим активность рецепторной тирозинкиназы, от концентрации инсулина и продолжительности инкубации с инсулином гранулярных нейронов мозжечка крыс показаны на Рис. 3.

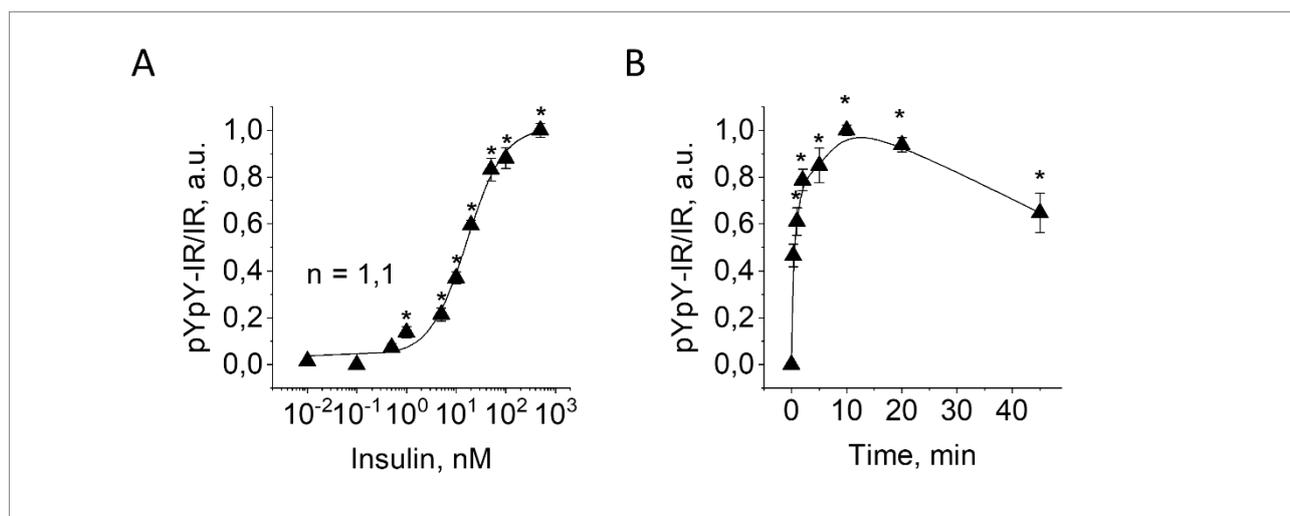


Рисунок 3. Дозовая (А) и временная (В) зависимость фосфорилирования ИР в нейронах. Культуры гранулярных нейронов мозжечка крыс инкубировали 10 мин с 0,5–500 нМ инсулина (А) или с 100 нМ инсулина в интервале 0–45 минут (В) и определяли уровень фосфорилирования рецептора (pYpY-IR/IR). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=5-9$). * $p<0,05$ в сравнении с нестимулированным контролем.

Фосфорилирование ИР в нейронах имеет гиперболическую зависимость от концентрации инсулина (коэффициент Хилла $n=1,1$), что соответствует характеристикам изоформы А рецептора, причем максимальные значения фосфорилирования ИР достигаются на временах инкубирования 5–20 мин. Соответственно, концентрация инсулина 100 нМ, обеспечивающая практически полное фосфорилирование ИР в нейронах, и времена инкубации 5–20 мин были выбраны для исследования окислительного сигнала инсулина на этой модели *in vitro*.

4.2 Окислительный сигнал инсулина в нейронах

Стимуляция инсулином вызывала немедленный выброс H_2O_2 в культуре гранулярных нейронов мозжечка крыс, что указывает на существование окислительной инсулиновой сигнализации в нейронах (Рис. 4).

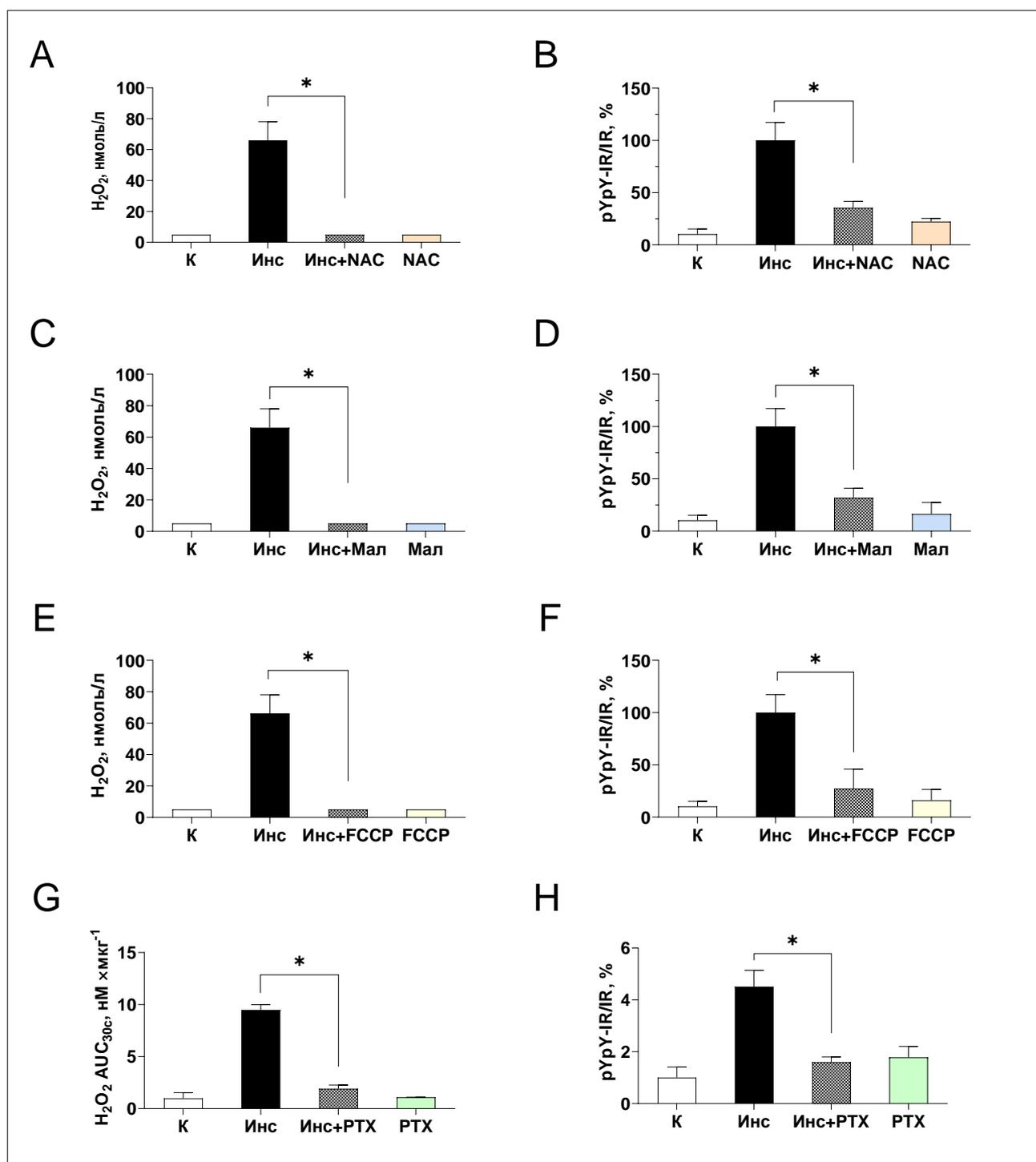


Рисунок 4. Влияние ингибиторов на стимулированную инсулином продукцию H₂O₂ и фосфорилирование рецептора инсулина в нейронах. Культуры гранулярных нейронов мозжечка крыс инкубировали в буфере в отсутствие (контроль, К) или в присутствии 100 нМ инсулина (Инс), а также в присутствии 100 нМ инсулина с добавками ингибиторов: 5 мМ N-ацетилцистеина (NAC), 2 мМ малоната (Mal), 0,5 мкМ FCCP (FCCP) или 2 мг/л коклюшного токсина (PTX). Результаты представлены в виде M ± s концентраций H₂O₂ (A, C, E, G) в среде инкубации через 1 мин после введения инсулина или в виде M ± s значений pYpY-IR/IR (B, D, F, H) через 20 мин после введения инсулина (n=4–9). Предел обнаружения анализа H₂O₂ 7 нМ. *p<0,05 по сравнению с 100 нМ инсулина (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Для того, чтобы выявить характер связи между окислительным сигналом инсулина и фосфорилированием ИР, нейроны инкубировали с инсулином и измеряли уровни H_2O_2 и уровни фосфорилирования ИР (pYpY-IR/IR) в присутствии батареи ингибиторов (Рис. 4). N-ацетилцистеин (НАС), эффективный поглотитель H_2O_2 , статистически значимо ингибировал как окислительный сигнал инсулина ($p < 0,05$), так и фосфорилирование ИР в ответ на инсулин ($p < 0,05$), что указывает на критическую роль сигнальной H_2O_2 как регулятора фосфорилирования ИР в нейронах (Рис. 4А и 4В). Малонат, конкурентный ингибитор СДГ митохондрий, уменьшал выброс H_2O_2 ($p < 0,05$) и снижал уровни фосфорилирования ИР ($p < 0,05$) в ответ на инсулин по сравнению с контролем (Рис. 4С, 4D), тогда как сукцинат, субстрат СДГ, взятый в виде соли холина, напротив, повышал уровни фосфорилирования ИР в нейронах в ответ на 5 нМ инсулина (см. раздел 6.1), что в целом указывает на ключевую роль СДГ в генерации окислительного сигнала инсулина в нейронах. Протонофор FCCP, вызывающий деполяризацию митохондрий через диссипацию протонного градиента, уменьшал выброс H_2O_2 ($p < 0,05$) и снижал фосфорилирование ИР ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что указывает на необходимость поддержания высокого потенциала внутренней мембраны митохондрий для генерации окислительного сигнала инсулина в нейронах (Рис. 4Е, 4F). Коклюшный токсин (РТХ), ингибитор Gi/o сигнализации, снижал выброс H_2O_2 и ингибировал фосфорилирование ИР в ответ на инсулин (Рис. 4G, 4H), что указывает на роль G-белковой сигнализации в генерации окислительного сигнала в нейронах, функция которой по аналогии с известной ролью $G\alpha_{i2}$ в адипоцитах (Krieger-Brauer et al. 1997) может состоять в передаче сигнала инсулина от ИР к сайту генерации окислительного сигнала.

В целом, в настоящем исследовании впервые показано, что существует неизвестный ранее сигнальный путь, регулирующий чувствительность инсулинового рецептора в нейронах, где объектом регуляции является фосфорилирование инсулинового рецептора, а роль регулятора играет окислительный сигнал инсулина, ключевую роль в генерации которого играет сукцинатдегидрогеназа комплекса II митохондрий.

4.3 Кинетика окислительного сигнала инсулина в нейронах

Исследование кинетики генерации окислительного сигнала инсулина показало, что этот сигнал представляет собой однократный выброс H_2O_2 , вызываемый кратковременным повышением скорости генерации H_2O_2 в ответ на стимуляцию нейронов инсулином и имеющий продолжительность не более 30 с (Рис. 5А).

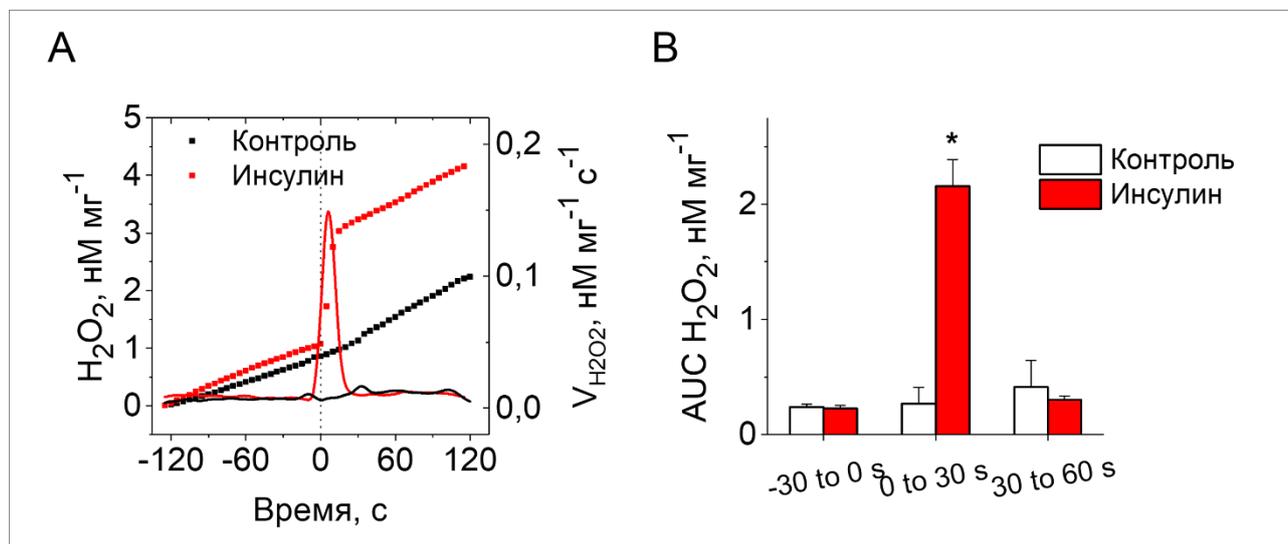


Рисунок 5. Кинетика окислительного сигнала инсулина в нейронах. (А) Средние значения концентрации H_2O_2 в среде инкубации (левая ось Y, символы) и средние значения скорости выделения H_2O_2 гранулярными нейронами мозжечка крыс (правая ось Y, линии) с добавкой инсулина или среды без инсулина (контроль). (В) Площади под кривой (AUC) прироста концентраций H_2O_2 в среде инкубации в указанные отрезки времени, представленные как $M \pm m$ ($n=10$). Время 0 с – время добавления инсулина или среды (контроль) * $p<0,05$ в сравнении с контролем.

Сравнение площадей под кривыми прироста концентраций H_2O_2 в 30-секундные отрезки времени до и после стимуляции инсулином показывает, что все статистически значимые изменения происходят только в интервале первых 30 с после стимуляции инсулином (Рис. 5В).

Сравнение временных характеристик окислительного сигнала инсулина (Рис. 5А) и фосфорилирования ИР в ответ на инсулин (Рис. 3В) показывает, что окислительный сигнал предшествует фосфорилированию ИР, так как максимум сигнала H_2O_2 наблюдается уже на 10-й секунде, тогда как пик фосфорилирования достигается только к 10-й мин стимуляции инсулином.

Малонат (Рис. 6А) и РТХ (Рис. 6С), ингибиторы СДГ и Gi/o сигнализации, соответственно, снижали амплитуду окислительного сигнала инсулина во

временном интервале 0–30 с. Сравнение площадей под кривой генерации H_2O_2 в интервале 0–30 с и уровней фосфорилирования ИР в ответ на инсулин в присутствии ингибиторов малоната (Рис. 6В) и РТХ (Рис. 6D) показывает, что ингибирование окислительного сигнала инсулина в первые 30 секунд стимуляции инсулином достаточно для того, чтобы вызвать статистически значимое гипофосфорилирование ИР.

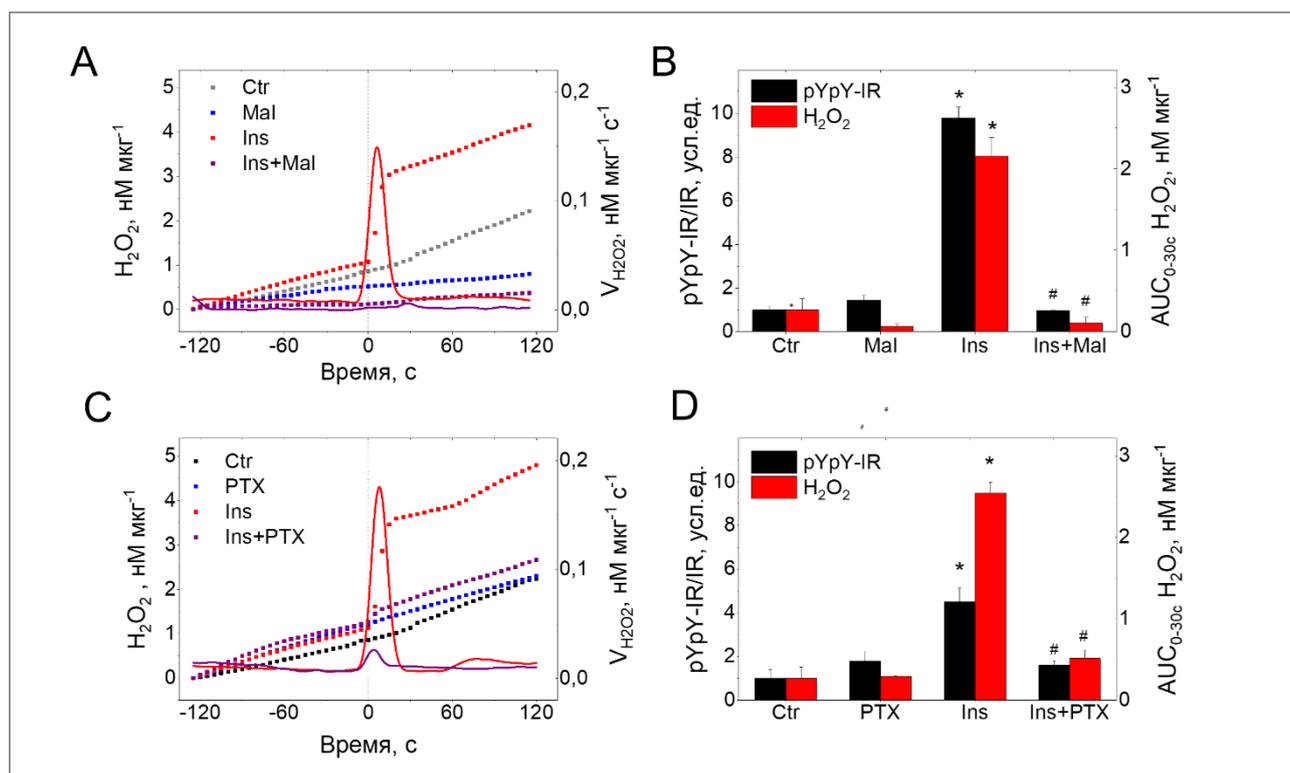


Рисунок 6. Эффекты малоната и РТХ на кинетику генерации окислительного сигнала инсулина и фосфорилирование ИР в нейронах. Эффекты малоната (А) и РТХ (С) на концентрацию H_2O_2 в среде инкубации (левая ось Y, символы) и средние значения скорости выделения H_2O_2 (правая ось Y, линии) в гранулярных нейронах мозжечка без добавок (Ctr) или в присутствии добавок ($n=3-10$). Эффекты малоната (В) и РТХ (D) на фосфорилирование ИР и площадь под кривой (AUC) концентраций H_2O_2 в среде инкубации без (Ctr) или в присутствии добавок. Добавки: 100 нМ инсулина (Ins), 6 мМ малоната (Mal), 100 нМ инсулина и 6 мМ малоната (Ins+Mal), 2 мг/л РТХ, 100 нМ инсулина и 2 мг/л РТХ. Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR через 10 мин инкубации с инсулином ($n=5-11$) или AUC в период 0–30 с после добавления инсулина ($n=3-10$). * $p<0,05$ в сравнении с Ctr. # $p<0,05$ в сравнении с Ins.

Согласно полученным результатам окислительный сигнал инсулина в нейронах имеет две фазы, фазу повышения скорости генерации H_2O_2 в первые 10 секунд, за которой следует фаза снижения скорости генерации H_2O_2 до исходного уровня в следующие 20 секунд. Такой двухфазный характер окислительного

сигнала, согласно теории, может иметь место когда за быстрой активацией реакции генерации H_2O_2 в ответ на стимул следует ее отсроченное ингибирование до исходного уровня продуктами этой реакции. Результаты настоящего исследования, указывающие на роль СДГ в генерации сигнальной H_2O_2 , вполне укладываются в эту схему, так как сукцинатдегидрогеназная реакция, приводящая на первой фазе к образованию сигнальной H_2O_2 ингибируется, как известно, продуктом этой реакции H_2O_2 через поддержание и усиление оксалоацетат-опосредованной инактивации СДГ (Moser et al. 2009, Ackrell et al. 1975), а длительность окислительного сигнала (<30 с) вполне согласуется с известными временами перехода между активным и неактивным состояниями СДГ (Gutman et al. 1971).

Таким образом, окислительный сигнал инсулина в нейронах представляет собой однократный 30-секундный выброс H_2O_2 , вызванный двухфазным изменением скорости генерации H_2O_2 , когда за быстрым 10-секундным подъемом следует 20-секундная фаза снижения скорости генерации H_2O_2 до исходного уровня. Практически полное ингибирование окислительного сигнала инсулина ингибитором СДГ митохондрий указывает на исключительную роль СДГ в генерации инсулин-индуцированной сигнальной H_2O_2 , регулирующей фосфорилирование ИР в ответ на инсулин в нейронах.

4.4 Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах сверхчувствительно к ингибированию окислительного сигнала инсулина

В настоящем исследовании впервые показано, что фосфорилирование ИР в ответ на инсулин сверхчувствительно к ингибированию окислительного сигнала инсулина, т.е., согласно определению более чувствительно к изменению концентрации ингибитора, чем гиперболический ответ Михаэлиса-Ментен. N-ацетилцистеин (Рис. 7А) и малонат (Рис. 7В) в дозозависимой манере ингибировали фосфорилирование ИР в ответ на 100 нМ инсулина, причем аппроксимация полученных экспериментальных кривых функцией Хилла дает IC_{50} $3,7 \pm 0,2$ мМ и коэффициент Хилла $n = 8,0 \pm 2,3$ ($R^2 = 0,97$) для ингибирования НАС и IC_{50} $2,0 \pm 0,3$ мМ и коэффициент Хилла $n = 3,4$ ($R^2 = 0,92$) для ингибирования малонатом.

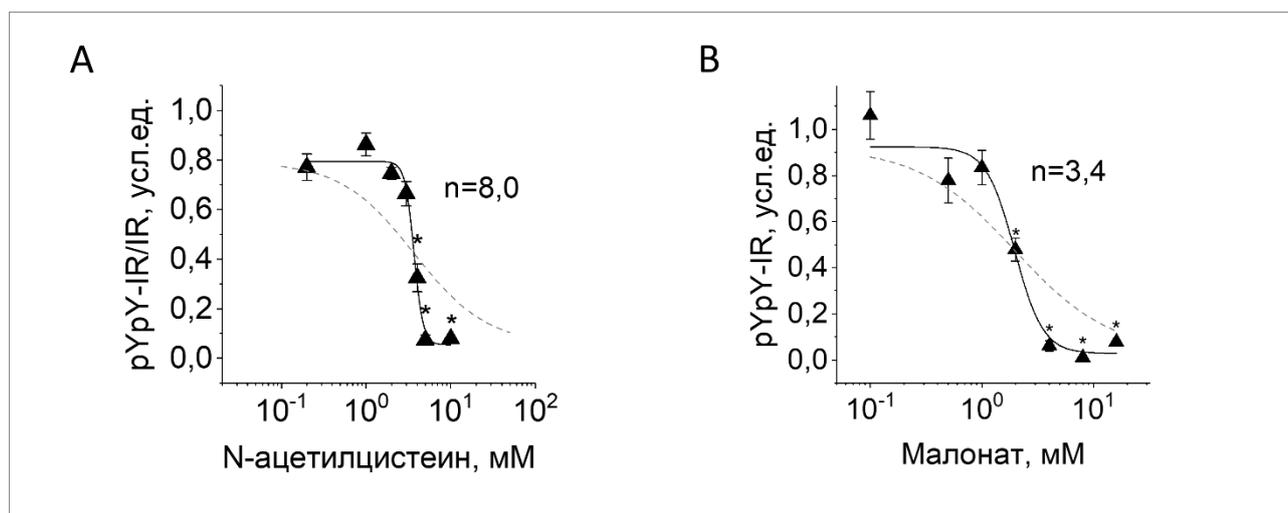


Рисунок 7. Сигмоидальная зависимость фосфорилирования ИР в нейронах от концентрации ингибиторов N-ацетилцистеина (А) и малоната (В). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=3-7$) значений $pYpY-IR/IR$ (символы). Сплошная линия – аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла. Пунктирная линия – расчетная кривая для гиперболического ответа Михаэлиса-Ментен (коэффициент Хилла $n=1,0$). * $p < 0,05$ в сравнении с 100 нМ инсулина в отсутствие ингибиторов.

Экстремально высокие значения коэффициента Хилла $n=8,0$ для НАС и $n=3,4$ для малоната означают, что существует пороговая концентрация для каждого из ингибиторов (IC_{50}), в окрестности которой происходит резкое изменение ответа на инсулин от полного фосфорилирования ИР при концентрации ингибитора ниже пороговой до полной нечувствительности ИР к инсулину и запрета фосфорилирования ИР, если концентрация ингибитора превышает пороговую. Эти результаты позволяют предположить, что окислительный сигнал инсулина регулирует чувствительность ИР к инсулину по принципу «все-или-ничего», разрешая фосфорилирование ИР в ответ на инсулин только при условии, что величина окислительного сигнала превышает определенное пороговое значение.

4.5 Регуляция чувствительности инсулинового рецептора в нейронах

Опираясь на результаты настоящего исследования, можно составить предположительную схему регуляции чувствительности ИР в нейронах окислительным сигналом инсулина, где объектом регуляции является фосфорилирование инсулинового рецептора – посттрансляционная модификация, предопределяющая активность рецепторной тирозинкиназы, а роль регулятора играет окислительный сигнал инсулина, ключевую роль в генерации которого играет сукцинат-дегидрогеназа комплекса II митохондрий (Рис. 8).

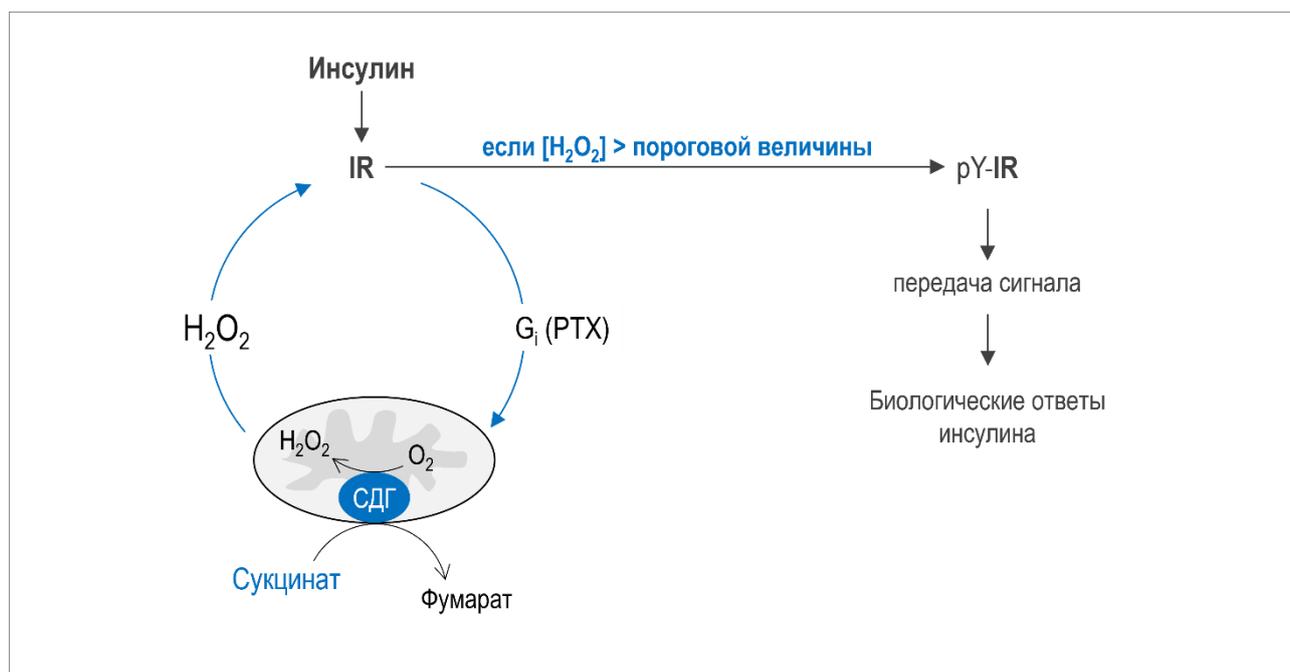


Рисунок 8. Схема регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах окислительным сигналом инсулина. Связывание инсулинового рецептора (IR) с инсулином вызывает кратковременное (<30 с) повышение скорости генерации окислительного сигнала инсулина (H_2O_2) в нейронах с участием реакции окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой (СДГ) комплекса II митохондрий, причем роль посредника между IR и сайтом генерации H_2O_2 играет активность G_i -белка (G_i), чувствительного к ингибированию коклюшным токсином (РТХ). Фосфорилирование IR сверхчувствительно к окислительному сигналу инсулина, то есть существует пороговое значение концентрации сигнальной H_2O_2 ($[H_2O_2]$), которое регулирует чувствительность IR к инсулину в режиме «все-или-ничего». Если $[H_2O_2]$ превышает необходимое пороговое значение, происходит фосфорилирование IR по критическим тирозинам (pY-IR), рецепторная тирозинкиназа активируется и начинает передачу сигнала IR, опосредующую все биологические ответы инсулина. Если $[H_2O_2]$ не достигает необходимого порогового значения, наблюдается гипофосфорилирование IR и снижение биологического ответа на инсулин (инсулиновая резистентность).

Функциональную роль выявленного в настоящем исследовании механизма регуляции чувствительности IR в нейронах еще предстоит оценить. Предположительно, этот механизм может обеспечить избирательную активацию IR только в работающих синапсах, не затрагивая остальные. IR расположены преимущественно в постсинаптической плотности дендритных шипиков возбуждающих синапсов вместе с глутаматными NMDA рецепторами (Abbott et al. 1999), при этом только меньшинство дендритных шипиков ($<10\%$) содержит митохондрии (Li et al. 2004), что исключает массовую активацию IR в постсинаптической плотности дендритных шипиков в ответ на инсулин из-за полной зависимости

фосфорилирования ИР от митохондриального окислительного сигнала. Однако, электрическая стимуляция вызывает выброс глутамата и активацию NMDA рецептора с возникновением в постсинаптическом терминале градиента Ca^{2+} , от которого зависит перераспределение митохондрий в дендритных шипиках в пользу их накопления в работающих синапсах (Li et al. 2004), что создает условия для избирательной активации ИР только в синапсах, непосредственно вовлеченных в нейротрансмиссию, тем более, что инсулин высвобождается пресинаптическими нервными терминалами также в ответ на нейрональную активность (Clarke et al. 1986; Wei et al. 1990).

4.6 Возможные причины гипофосфорилирования ИР в нейронах

Выявленная в настоящем исследовании сверхчувствительность фосфорилирования ИР в нейронах к ингибированию сукцинатдегидрогеназы комплекса II митохондрий позволяет оценить роль известных факторов, влияющих на активность СДГ, в снижении фосфорилирования ИР в нейронах. Известно, что активность СДГ регулируется обратимым ингибированием оксалоацетатом. Аффинность связывания оксалоацетата с восстановленной формой СДГ по крайней мере на порядок меньше, чем с окисленной формой, поэтому СДГ активируется при восстановлении, когда высвобождает оксалоацетат, и ингибируется при окислении, связывая оксалоацетат (Ackrell et al. 1975; Gutman et al. 1978). Физиологическими активаторами-восстановителями СДГ являются сукцинат (Ackrell et al. 1978) и восстановленная форма кофермента CoQH_2 (Gutman et al. 1971), причем соотношение восстановленной к окисленной форме коэнзима CoQH_2/CoQ в каждый момент времени является основным фактором, определяющим активность СДГ. Соответственно, все факторы, снижающие CoQH_2/CoQ , в теории могут снижать окислительный сигнал инсулина, с оговоркой, что роль этих факторов была установлена в экспериментах, где стимуляция инсулином не изучалась. Тем не менее, к таким негативным факторам относятся нарушения в работе комплекса I митохондрии, так как CoQH_2 в значительной степени генерируется восстановлением CoQ на сайте I_Q комплекса I (Gutman et al. 1971); снижение концентрации CoQH_2 при окислении CoQH_2 комплексом III, которое происходит при

низком отношении АТФ/АДФ и в присутствии протонофоров, вызывающих деполяризацию митохондрий (Gutman et al. 1971); а также действие окислителей (H_2O_2), увеличивающих связывание оксалоацетата с СДГ митохондрий (Nulton-Persson et al. 2001; Moser et al. 2009).

Таким образом, митохондриальный гипометаболизм, деполяризация митохондрий и окислительный стресс теоретически являются факторами, которые способны снизить окислительный сигнал инсулина и вызвать гипофосфорилирование ИР в ответ на инсулин в нейронах.

4.7 Эффект деполяризации митохондрий на фосфорилирование ИР

С учетом сверхчувствительности фосфорилирования ИР в нейронах к ингибированию активности СДГ комплекса II митохондрий и того, что митохондриальная деполяризация снижает активность СДГ (Gutman et al. 1971), здесь были изучены эффекты деполяризации митохондрий с использованием протонофора FCCP и ингибиторов комплексов I и II митохондрий на фосфорилирование ИР в нейронах в ответ на инсулин (Рис. 9). Флуоресценцию родамина 123 (F/F_0) использовали как меру, обратно пропорциональную $\Delta\Psi_m$ (Toescu & Verkhratsky 2000).

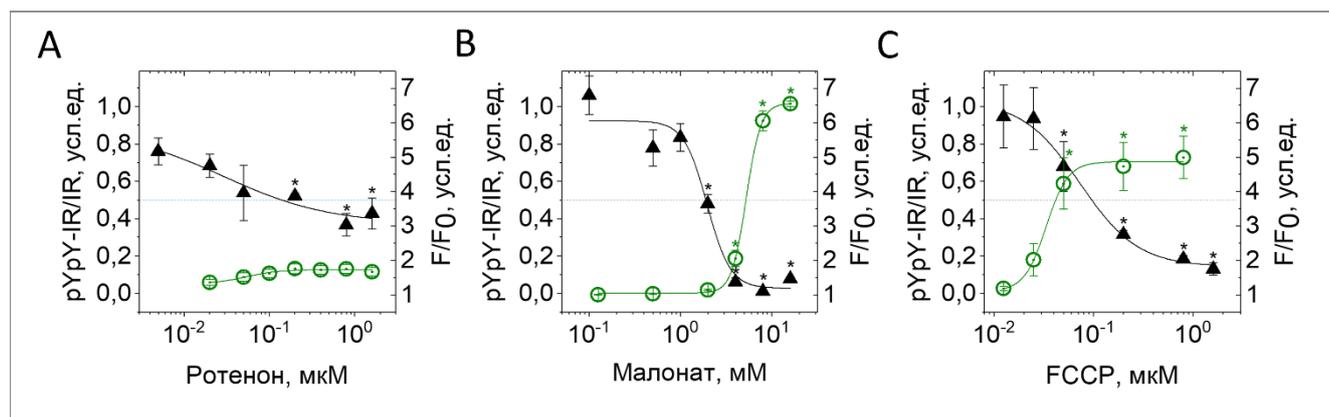


Рисунок 9. Эффекты ротенона (А), малоната (В) и FCCP (С) на фосфорилирование ИР и $\Delta\Psi_m$ в нейронах в присутствии 100 нМ инсулина. Фосфорилирование ИР (левая ось Y, черные символы и линии). Флуоресценция родамина 123 (правая ось Y, зеленые символы и линии). Результаты представлены как $M \pm m$ значений $pYpY-IR/IR$ и флуоресценции F/F_0 ($n=3-7$). $*p<0,05$ в сравнении с инсулином без ингибиторов.

Ротенон, ингибитор комплекса I митохондрий, влиял на $\Delta\Psi_m$ и фосфорилирование ИР в ответ на инсулин, но в значительно меньшей степени, чем другие ингибиторы (Рис. 9А). Малонат (Рис. 9В) и FCCP (Рис. 9С) вызывали

статистически значимое падение $\Delta\Psi_m$ и снижение фосфорилирования ИР. При концентрации малоната вызывающей 50% ингибирование автофосфорилирования, митохондрии были деполяризованы менее чем на 1%, из чего следует, эффект малоната на фосфорилирование ИР не связан с деполяризацией митохондрий. FCCP индуцирует митохондриальную деполяризацию через диссипацию протонного градиента, поэтому исследование эффектов FCCP позволяет оценить влияние именно деполяризации митохондрий на фосфорилирование ИР. При концентрации FCCP, приводящей к практически полной деполяризации митохондрий (>95%), фосфорилирование ИР снижалось только на 50%, из чего следует, что эффект деполяризации в случае FCCP первичен по отношению к фосфорилированию. Существенное ингибирование фосфорилирования ИР в присутствии FCCP, хотя и не такое полное, как в присутствии малоната, тем не менее указывает на то, что деполяризация митохондрий сама по себе является достаточным условием для снижения фосфорилирования ИР в ответ на инсулин и развития инсулиновой резистентности в нейронах.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РАЗВИТИЯ ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В НЕЙРОНАХ В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ

Деполяризация митохондрий является характерной особенностью глутаматной эксайтотоксичности, ключевого повреждающего фактора таких заболеваний, как черепно-мозговая травма и ишемический инсульт. Деполяризация митохондрий происходит в ответ на активацию NMDA рецепторов и массовый приток Ca^{2+} в постсинаптические терминалы нейронов (Nicholls 2004).

С целью оценки возможного вклада глутаматной эксайтотоксичности в развитие инсулиновой резистентности был изучен эффект глутамата на фосфорилирование ИР и нижележащих киназ Akt, mTOR и GSK3 β в каскаде передачи сигнала рецептора инсулина в культуре нейронов коры мозга крыс. Глутамат в эксайтотоксической концентрации 100 мкМ уже к 30-й мин инкубации статистически значимо повышал внутриклеточный кальций ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) и снижал значения потенциала митохондрий $\Delta\Psi_m$ ($p < 0,0001$) относительно исходных значений (Рис.

10). Этот 30-минутный интервал воздействия глутамата был выбран для последующих экспериментов с инсулином.

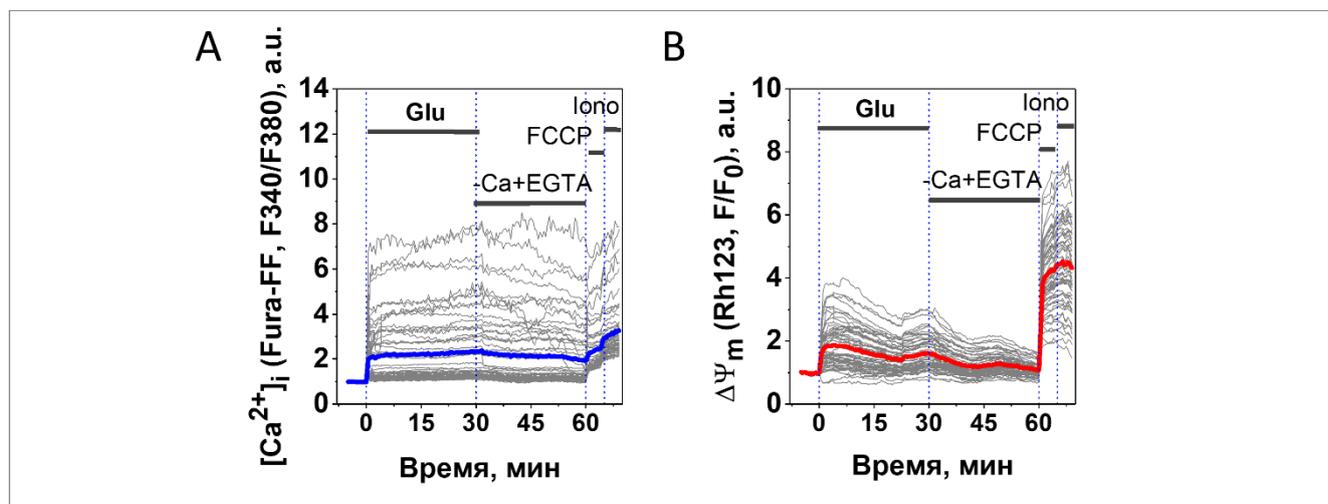


Рисунок 10. Влияние 100 мкМ глутамата на динамику $[Ca^{2+}]_i$ (А) и $\Delta\Psi_m$ (В) в индивидуальных нейронах коры мозга крыс. Концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и $\Delta\Psi_m$ в индивидуальных нейронах определяли с использованием флуоресцентных зондов Fura-FF и родамин 123 (Rh123), учитывая, что флуоресценция Rh123 обратно пропорциональна величине $\Delta\Psi_m$ (Toescu & Verkhratsky 2000). Серые линии – одиночные нейроны ($n=60$); синие и красные линии – средние значения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, соответственно. Обозначения: -Ca+EGTA – замена среды на безкальциевую; FCCP и Iono – добавление в среду FCCP и иономицина, соответственно.

Стимуляция нейронов инсулином ожидаемо вызывала повышение уровней фосфорилирования β -цепи ИР ($IR\beta$) и нижележащих киназ Akt, mTOR и GSK3 β каскада передачи сигнала рецептора (Рис. 11). Однако, после предобработки глутаматом в течение 30 мин та же концентрация инсулина вызывала существенно меньший ответ. Так, фосфорилирование рецептора по остаткам тирозина $pY^{1150/1151}$, необходимое для полной активации рецепторной тирозинкиназы, было снижено на 48% ($p<0,001$); фосфорилирование Akt по остатку серина pS^{473} и фосфорилирование mTOR по остатку серина pS^{2448} , модификации имеющие решающее значение для их активации, были снижены на 72% ($p<0,0001$) и 44% ($p<0,0001$), соответственно; а фосфорилирование GSK3 β по остатку серина pS^9 , ингибирующее ее активность, было снижено на 38% ($p<0,01$) по сравнению с соответствующими контролями, необработанными глутаматом. Эти результаты показывают, что глутамат в эксайтотоксических концентрациях вызывает острую нейрональную инсулиновую резистентность, снижая долю фосфорилированных

сигнальных молекул, в том числе инсулинового рецептора и нижележащих сигнальных киназ Akt, mTOR и GSK3 β каскада передачи сигнала ИР.

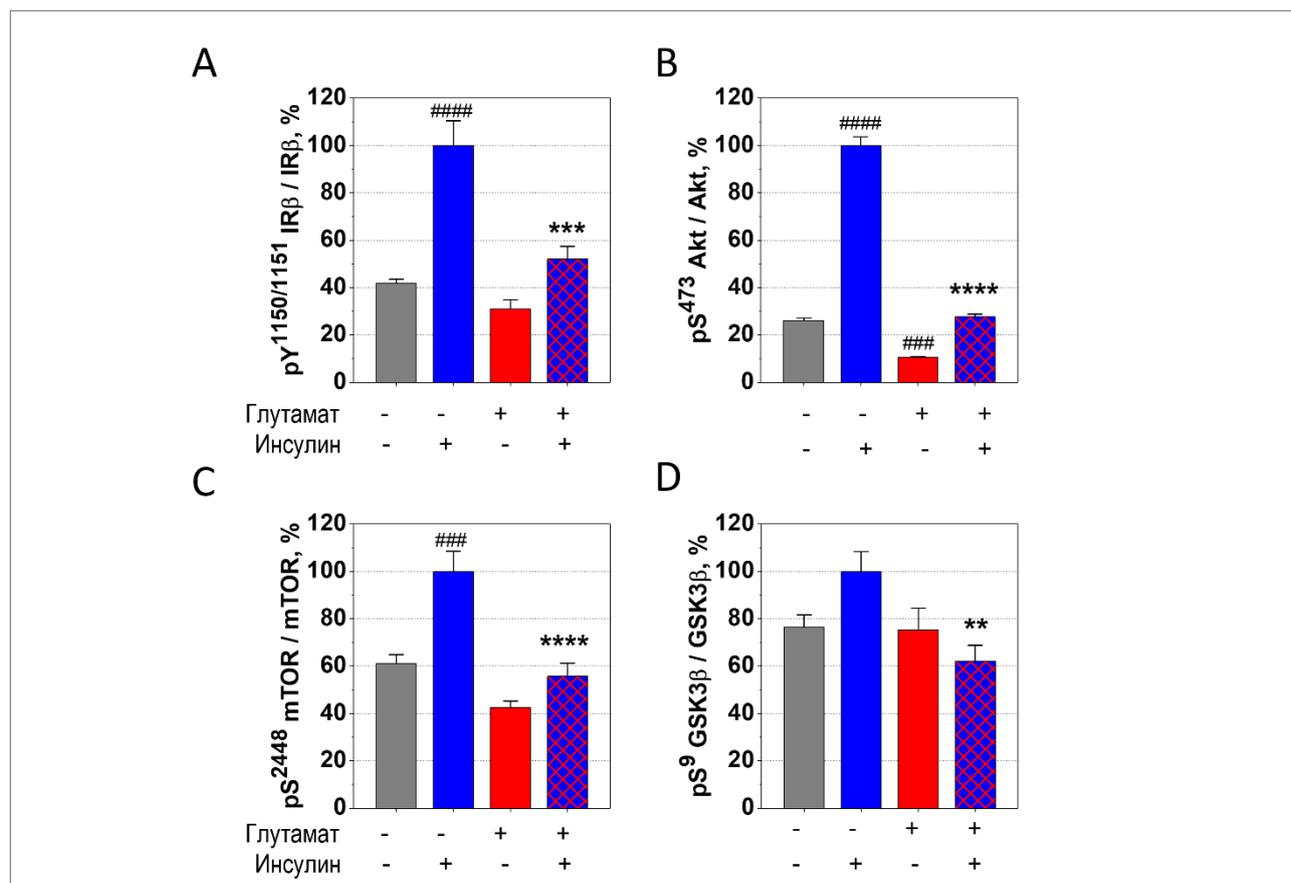


Рисунок 11. Глутамат в эксайтотоксической концентрации ингибирует инсулиновую сигнализацию в нейронах коры мозга крыс. Уровни фосфорилирования IR β pY^{1150/1151} (A), Akt pS⁴⁷³ (B), mTOR pS²⁴⁴⁸ (C) и GSK3 β pS⁹ (D) в нейронах, инкубированных 30 мин с 100 мкМ глутамата и 15 мин с 100 нМ инсулина. Уровни фосфопротеинов IR β pY^{1150/1151}, Akt pS⁴⁷³, mTOR pS²⁴⁴⁸ и GSK3 β pS⁹ и общие уровни белков IR β , Akt, mTOR и GSK3 β измеряли с помощью панели MILLIPLIX® MAP Akt/mTOR (EMD Millipore). Результаты представлены как $M \pm m$ уровней фосфопротеинов, нормализованных относительно общих уровней белков, и выраженных в %. (n=6). **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 по сравнению с инсулином; ###p < 0,001, ####p < 0,0001 по сравнению с контролем (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показано, что глутаматная эксайтотоксичность вызывает гипофосфорилирование ИР и нижележащих киназ каскада Akt, mTOR и GSK3 β в нейронах. Опираясь на полученные результаты, можно составить предположительную схему возникновения острой инсулиновой резистентности в нейронах в условиях глутаматной эксайтотоксичности по причине негативного взаимодействия сигнальных путей рецептора инсулина и NMDA рецептора (Рис. 12).

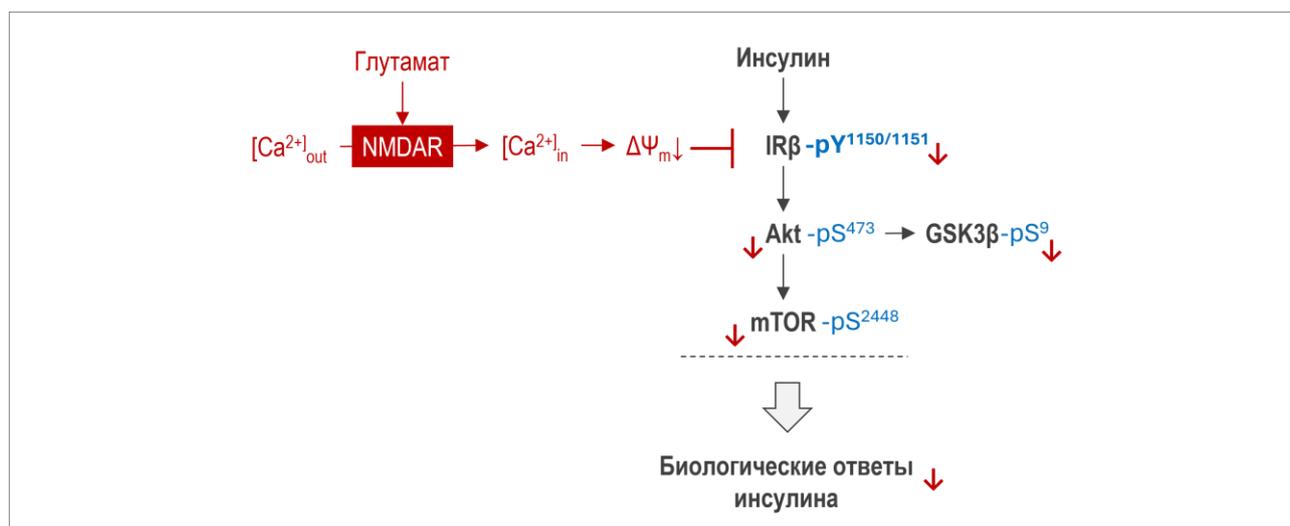


Рисунок 12. Схема влияния эксайтотоксической концентрации глутамата на инсулиновую сигнализацию в нейронах. Глутамат в эксайтотоксических концентрациях активирует NMDA рецептор (NMDAR) в постсинаптических терминалах нейронов, что ведет к входу внеклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_{out}$) и повышению внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_{in}$) с одновременной деполаризацией митохондрий ($\Delta\Psi_m \downarrow$) (Nicholls 2004). Деполаризация митохондрий вызывает гипофосфорилирование расположенных в тех же постсинаптических терминалах инсулиновых рецепторов IR β (pYpY^{1150/1151}↓) и нижележащих киназ каскада передачи сигнала Akt (pS⁴⁷³↓), mTOR (pS²⁴⁴⁸↓) и GSK3 β (pS⁹↓), что ведет к развитию острой нейрональной инсулиновой резистентности.

Таким образом, глутамат вызывает гипофосфорилирование ИР и нижележащих киназ каскада передачи сигнала ИР, что объясняет природу нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, где глутаматная эксайтотоксичность является поражающим фактором, в частности при ишемическом инсульте.

6. СОЗДАНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОГО ИНСУЛИН-СЕНСИТАЙЗЕРА И ЕГО ИССЛЕДОВАНИЕ НА БИОМОДЕЛЯХ

6.1 Дихолинсукцинат – нейрональный инсулин-сенситайзер

Выявленная в настоящей работе ключевая роль сукцината как субстрата в генерации окислительного сигнала инсулина открывает перспективу для создания нейронального инсулин-сенситайзера, повышающего чувствительность ИР к инсулину. Ограничением такого подхода является низкая способность сукцината транспортироваться через клеточные мембраны при физиологических значениях рН среды, которую удалось преодолеть путем использования новой соли – дихолинсукцината, предпочтительное название IUPAC бис(2-гидрокси-N,N,N-

триметилэтан-1-аминия) бутандиоат, синоним «ДХС», CAS 109438-15-5, молекулярная формула $C_{14}H_{32}N_2O_6$, который был впервые синтезирован в настоящей работе по реакции янтарной кислоты с гидроксидом холина.

Дихолинсукцинат в интервале концентраций 10–100 мкМ более, чем в два раза повышал уровень фосфорилирования ИР в культуре нейронов мозжечка в ответ на физиологически релевантную концентрацию 5 нМ инсулина (Рис. 13).

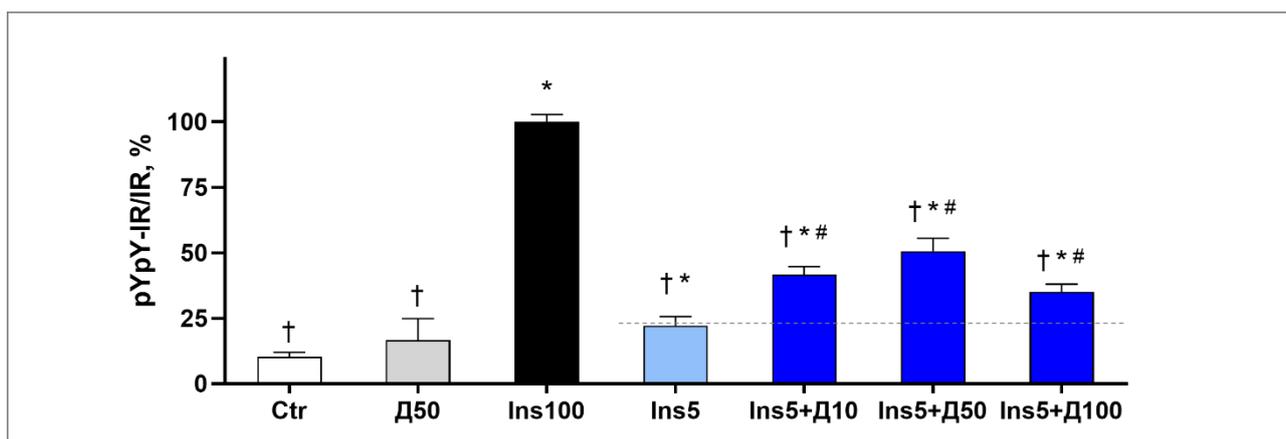


Рисунок 13. Эффект дихолинсукцината на фосфорилирование ИР в нейронах. Гранулярные нейроны мозжечка крыс инкубировали без добавок (Ctrl), с ДХС 50 мкМ (D50), с инсулином 100 нМ (Ins100), с инсулином 5 нМ (Ins5) или с инсулином 5 нМ с добавкой дихолинсукцината в концентрациях 10 мкМ (Ins5+D10), 50 мкМ (Ins5+D50) или 100 мкМ (Ins5+D100) мкМ в течение 20 мин, после чего измеряли фосфорилирование ИР. Результаты представлены как $M \pm s$ значений pY-IR/IR в % ($n=5-9$). * $p < 0,05$ по сравнению с Ctrl; † $p < 0,05$ по сравнению с 100 нМ инсулина; # $p < 0,05$ по сравнению с 5 нМ инсулина (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Таким образом, дихолинсукцинат повышает чувствительность ИР в нейронах к инсулину в интервале физиологически релевантных концентраций сукцината 10–100 мкМ, что создает предпосылки для его эффективного и безопасного применения в качестве нейронального инсулин-сенситайзера для лечения состояний, где инсулиновая резистентность является патогенетическим фактором.

6.2 Тестирование дихолинсукцината на биомодели глобальной ишемии

Регуляция энергетического метаболизма является одной из функций инсулина в мозге. Для того, чтобы оценить эффекты курсового 7-дневного в/б введения дихолинсукцината (ДХС) в сравнении с физ. раствором и контрольными препаратами – холина хлоридом (ХХ), калия сукцинатом (КС) и натрия сукцинатом (НС) на энергетический метаболизм в мозге крыс, на 8-й день у животных

вызывали глобальную ишемию и измеряли динамику снижения уровней АТФ и фосфокреатина (ФК) в мозге методом ^{31}P ЯМР спектроскопии *in vivo* (Рис. 14).

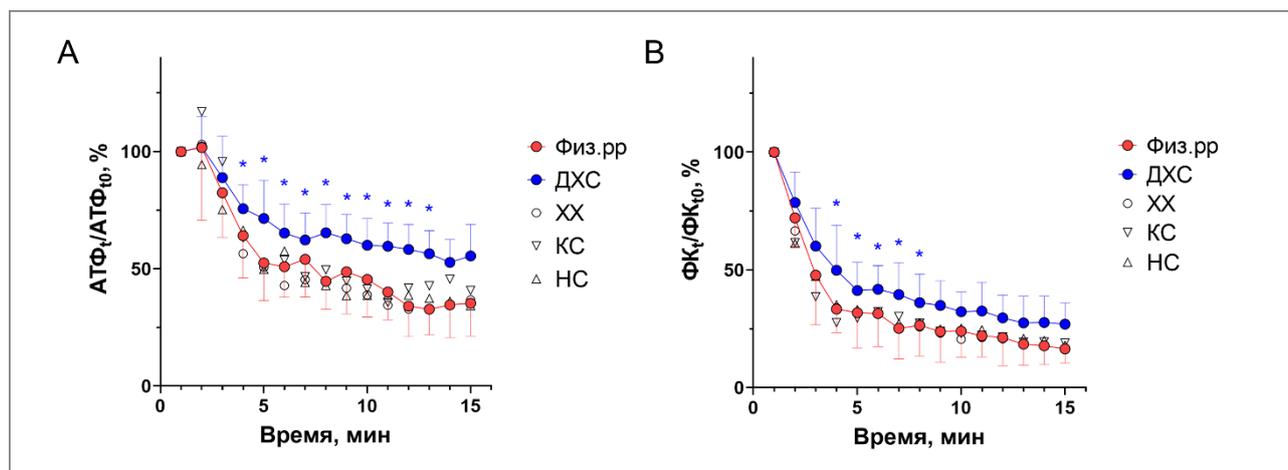


Рисунок 14. Динамика изменений концентраций АТФ (А) и ФК (В) в мозге крыс в период глобальной ишемии. Крысы получали в/б физ. раствор (Физ. pp), дихолинсукцинат (ДХС) в дозе 10 мг/кг или эквимолекулярные количества холина хлорида (XX), калия сукцината (КС), натрия сукцината (КС) один раз в день, 7-дневным курсом. Через 24 часа после окончания введения препаратов у животных индуцировали глобальную ишемию электрофибрилляцией сердечной мышцы и измеряли уровни аденозинтрифосфата (β АТФ) и фосфокреатина (ФК) в мозге методом ^{31}P МРС *in vivo*. Результаты представлены как $M \pm s$ $\text{АТФ}_t/\text{АТФ}_{t_0}$ и $\text{ФК}_t/\text{ФК}_{t_0}$ в мозге *in vivo* в каждый момент времени (t) относительно исходного момента (t_0), и выражены в %. В опытных группах было по 8 животных, в контроле – 23 животных. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем (Физ. pp).

Глобальная ишемия вызывала быстрое падение интенсивностей сигналов β АТФ (Рис. 14А) и ФК (Рис. 14В) в мозге во всех группах, однако, только у животных, получавших дихолинсукцинат, наблюдалось статистически значимое замедление падения макроэргов в мозге ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, причем эффект дихолинсукцината значимо превосходит индивидуальные эффекты холина и сукцината, его составляющих, взятых в эквимолекулярных количествах, что позволяет выбрать дихолинсукцинат в качестве соединения-лидера для дальнейших исследований на биомоделях церебральной ишемии.

6.3 Тестирование дихолинсукцината на биомодели хронической церебральной гипоперфузии у крыс

Снижение мозгового кровотока связано с инсулиновой резистентностью (Noscheidt et al. 2017). Из-за снижения церебральной перфузии у 25-30% выживших после ишемического инсульта в течение трех лет развиваются сосудистая деменция или отсроченные когнитивные нарушения (Kalaria et al. 2016).

Постоянная двусторонняя окклюзия общих сонных артерий (2VO) у крыс Вистар вызывает нарушение когнитивной функции из-за наполовину сниженного мозгового кровотока (Farkas et al. 2007). В этой биомодели ДХС в дозах 1–25 мг/кг статистически значимо улучшил обучение и память, а также повысил уровни N-ацетиласпартата (NAA/Cr), маркера функциональной активности нейронов мозга (Рис. 15).

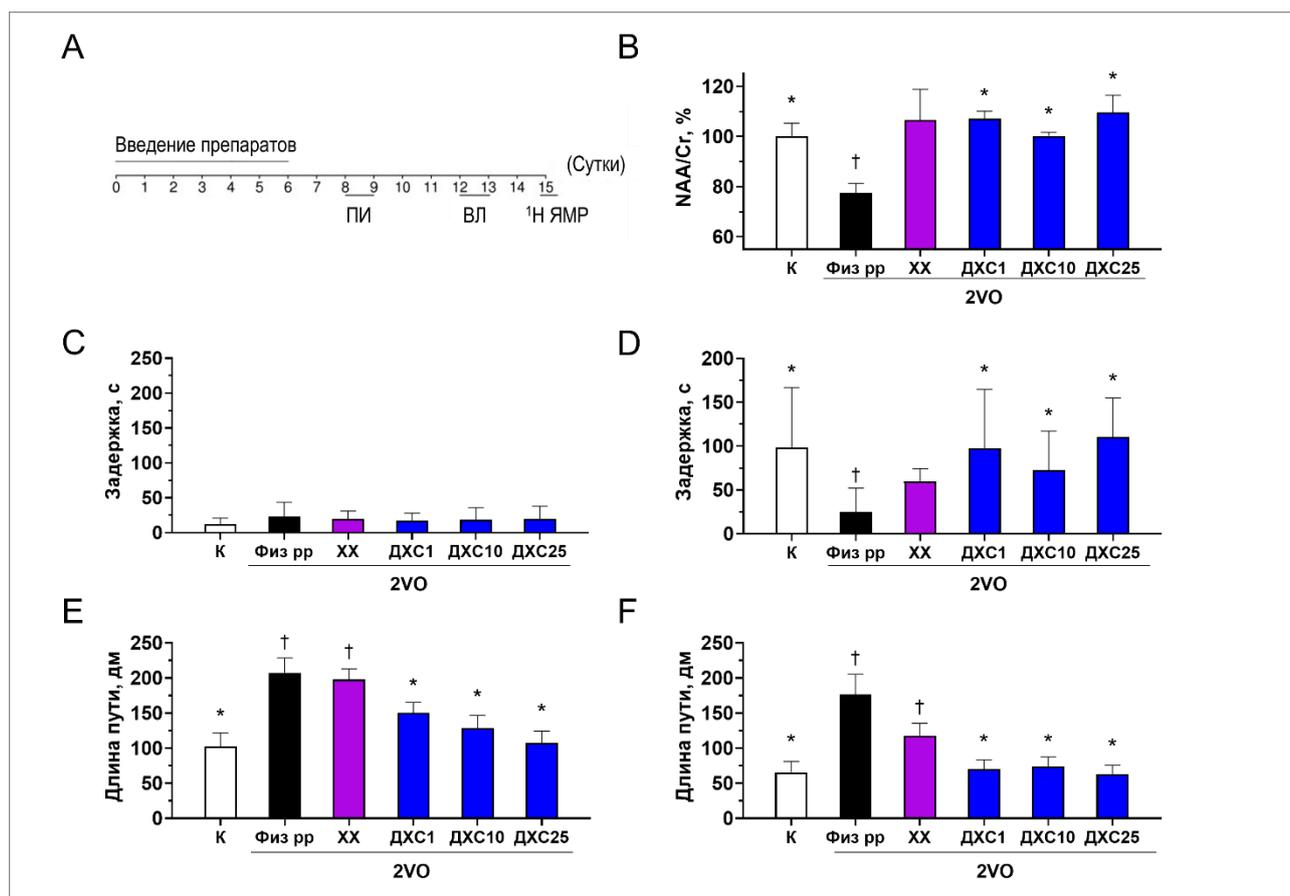


Рисунок 15. Эффекты дихолинсукцината на биомодели хронической церебральной гипоперфузии у крыс Вистар. Ложнооперированные крысы Вистар получали в/б физ. раствор (К), а крысы с окклюзией двух сонных артерий (2VO) получали в/б физ. раствор (Физ.рр), 10 мг/кг холина хлорида (ХХ) или ДХС в дозах 1 (ДХС1), 10 (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25) семь дней, один раз в день, после чего крыс тестировали согласно расписания (А). Уровни NAA/Cr в головном мозге измеряли методом ^1H ЯМР *in vivo* (В). В тесте условного рефлекса пассивного избегания (ПИ) животных тестировали в день обучения (С) и через 24 часа (D). В тесте водного лабиринта Морриса (ВЛ) животных тестировали в день обучения (Е) и через 24 часа (F). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n \geq 9$) для уровней NAA/Cr (В), задержки перехода в темный отсек в секундах (С и D) и длины пути в дециметрах до скрытой платформы (Е и F). * $p < 0,05$ по сравнению с Физ.рр/2VO; † $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными животными.

6.4 Тестирование дихолинсукцината на биомодели старения у мышей

Дихолинсукцинат улучшил обучение и память, а также повысил уровни N-ацетиласпартата в мозге старых мышей по сравнению контролем (Рис. 16).

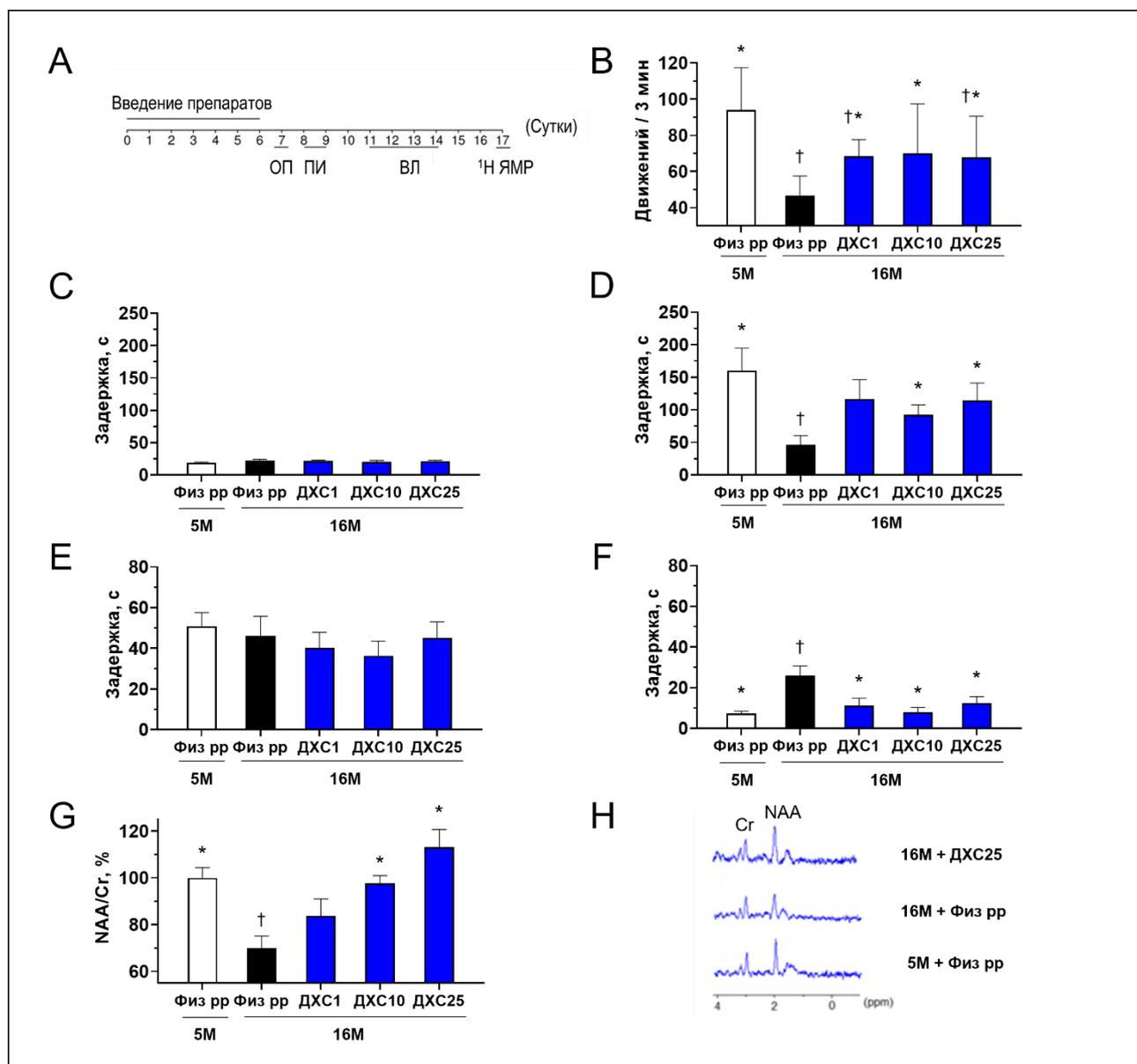


Рисунок 16. Эффекты дихолинсукцината на биомодели старения мышей C57Bl/6.

Старым 16-месячным (16М) или молодым взрослым 5-месячным (5М) мышам вводили в/б физ. раствор (Физ рр) или ДХС в дозах 1 (ДХС1), 10 (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25) семь дней подряд, один раз в день, после чего тестировали согласно расписания (А) подвижность животных в открытом поле (В); обучение и память в тесте условного рефлекса пассивного избегания в день обучения (С) и через 24 часа (D); обучение и память в тесте водного лабиринта в 4-х ежедневных сессиях, результаты представлены для первой (Е) и последней (F) сессии; и измеряли NAA/Cr в мозге ¹Н ЯМР *in vivo* (G), где (H) – репрезентативный спектр. Результаты представлены как M ± m (n≥8) общего числа движений за 3 мин (В), задержки спуска с приподнятой платформы (С, D), задержки до обнаружения скрытой платформы (Е, F); относительных уровней NAA/Cr (G). *p < 0,05 по сравнению с 16М животными; †p < 0,05 по сравнению с 5М животными.

6.5 Тестирование дихолинсукцината на биомодели токсичности β -амилоида 25-35

Болезнь Альцгеймера – наиболее изученное состояние, при котором центральная инсулиновая резистентность вносит вклад в нарушения памяти (Kellar&Craft 2020; Talbot et al. 2012). Однократная инъекция β -амилоидного пептида 25–35 (А β) в базальное ядро Мейнерта мозга крыс моделирует деменцию по типу болезни Альцгеймера (Harkany et al. 1998) со снижением активности холинацетилтрансферазы, ключевого фермента биосинтеза ацетилхолина в мозге (Yamaguchi et al. 2001). Дихолинсукцинат в дозах 10 и 25 мг/кг улучшил память в тесте условного рефлекса пассивного избегания у А β -индуцированных крыс в этой модели по сравнению контролем (Рис. 17).

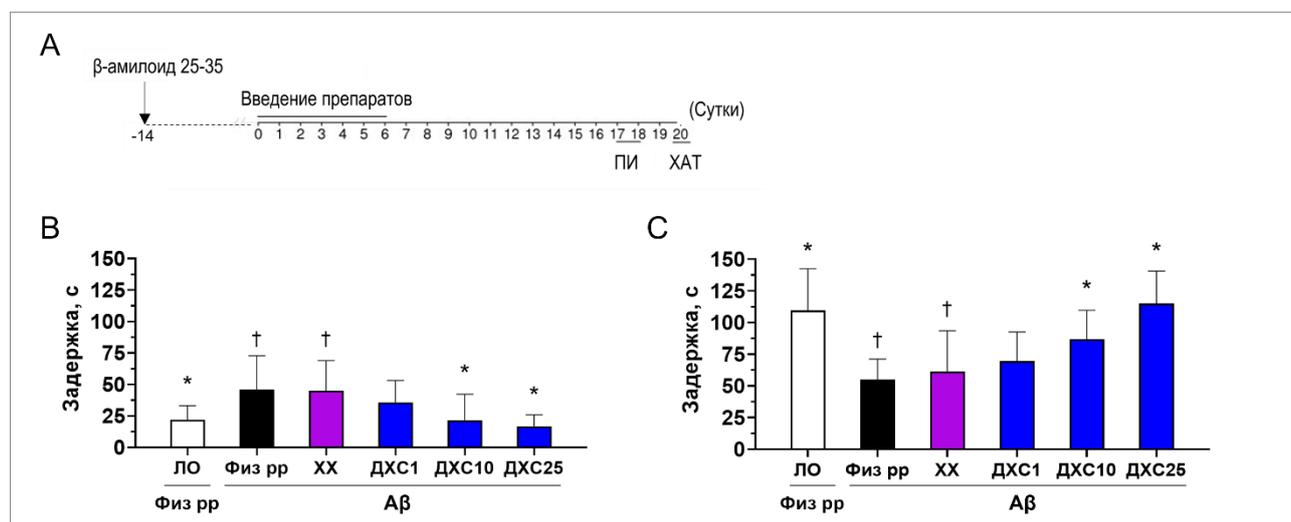


Рисунок 17. Эффекты дихолинсукцината на биомодели токсичности β -амилоида 25-35 у крыс Вистар. Ложнооперированному животному (ЛО) вводили в/б физ. раствор (Физ рр), а крысам, получившим инъекцию β -амилоидного пептида 25–35 (А β) вводили в/б физ. раствор (Физ рр), холина хлорид в дозе 10 мг/кг (ХХ) или ДХС в дозах 1 (ДХС1), 10 (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25) семь дней подряд, один раз в день, и тестировали согласно расписания (А) обучение и память в тесте условного рефлекса пассивного избегания в день обучения (В) и через 24 часа (С). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=8$) задержки перехода в темный отсек в секундах. * $p < 0,05$ по сравнению с А β животными; † $p < 0,05$ по сравнению с ЛО животными.

В этой же биомодели, дихолинсукцинат в наивысшей выбранной дозе 25 мг/кг статистически значимо повысил активность холинацетилтрансферазы (ХАТ) в мозге у А β -индуцированных крыс в сравнении с контролем (Табл. 4).

Таблица 4. Эффект ДХС на активность холинацетилтрансферазы в мозге Аβ-индуцированных крыс.

Группы	Активность ХАТ, распадов в мин/мг ткани
Физ. раствор + физ. раствор	6,15 ± 0,21*
Аβ + физ. раствор	4,52 ± 0,25†
Аβ + ХХ 10 мг/кг	4,84 ± 0,68
Аβ + ДХС 1 мг/кг	5,19 ± 0,35
Аβ + ДХС 10 мг/кг	5,39 ± 0,41
Аβ + ДХС 25 мг/кг	5,72 ± 0,38*

Примечание: Ложнооперированные животные получали в/б физ. раствор (Физ. раствор + физ. раствор). Аβ-индуцированные животные получали в/б физ. раствор, 10 мг/кг холина хлорида (ХХ) или ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). Данные представлены как $M \pm m$ активности ХАТ (n=8), определенной по методу Fonnum (Fonnum 1996). *p < 0,05 по сравнению с Аβ + физ. раствор. †p < 0,05 по сравнению с ложнооперированными животными (Физ. раствор + физ. раствор).

В целом, положительные результаты тестирования дихолинсукцината на биомоделях заболеваний, где инсулиновая резистентность является патогенетическим фактором, являются подтверждением концепции о возможности использования сукцината для лечения этих состояний и открывают перспективу для его дальнейшего исследования в качестве нейронального инсулин-сенситайзера в лечении широкого ряда заболеваний, включая ишемический инсульт в раннем восстановительном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показано, что существует неизвестный ранее сигнальный путь, регулирующий чувствительность инсулинового рецептора в нейронах, где объектом регуляции является фосфорилирование рецептора, посттрансляционная модификация имеющая решающее значение для активации рецепторной тирозинкиназы, а роль регулятора играет окислительный сигнал инсулина (H_2O_2), ключевую роль в генерации которого играет сукцинатдегидрогеназа комплекса II митохондрий.

Впервые показано, что митохондрия может служить источником окислительного сигнала инсулина, что было продемонстрировано в экспериментах с тканями печени и сердца, а также в опытах на культурах нейронов. Реакция окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой комплекса II митохондрий играет ключевую роль в генерации окислительного сигнала инсулина, вовлеченного в ингибирование активности протеинтирозинфосфатаз, известных негативных регуляторов фосфорилирования инсулинового рецептора, причем скорость генерации сигнальной H_2O_2 имеет гиперболическую зависимость Михаэлиса-Ментен от концентрации сукцината в интервале его физиологически релевантных концентраций 1–80 мкМ. Окислительный сигнал инсулина в нейронах представляет собой однократный 30-секундный выброс H_2O_2 , вызванный двухфазным изменением скорости генерации H_2O_2 , когда за быстрым 10-секундным подъемом следует 20-секундная фаза снижения скорости генерации H_2O_2 до исходного уровня. Окислительный сигнал предшествует фосфорилированию инсулинового рецептора и является необходимым условием для активации инсулинового рецептора.

Впервые показано, что фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах проявляет сверхчувствительность к ингибированию окислительного сигнала инсулина, что выражается в резком сигмоидальном падении способности рецептора к фосфорилированию в ответ на инсулин при подавлении окислительного сигнала, что объясняет такое явление, как гипофосфорилирование инсулинового рецептора в отсутствие дефицита инсулина.

Впервые показано, что глутамат в эксайтотоксических концентрациях вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих киназ сигнального каскада инсулина Akt, mTOR и GSK3 β , что объясняет развитие нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, где глутаматная эксайтотоксичность является известным поражающим фактором, в том числе при ишемическом инсульте.

Выявленные в настоящей работе механизмы регуляции чувствительности инсулинового рецептора открывают перспективу для создания средств, повышающего чувствительность ИР к инсулину (инсулин-сенситайзеров) на основе солей или производных янтарной кислоты, так как реакция окисления сукцината является встроенным естественным механизмом генерации окислительного сигнала инсулина и существует гиперболическая зависимость Михаэлиса-Ментен скорости генерации окислительного сигнала от концентрации сукцината в интервале физиологически релевантных концентраций последнего. Этот подход был реализован при создании нейронального инсулин-сенситайзера дихолинсукцината, повышающего фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах в ответ на физиологически релевантные концентрации инсулина. Эффективность дихолинсукцината в защите метаболизма мозга показана на биомоделях церебральной ишемии по данным ^{31}P и ^1H МРС *in vivo* и результатам тестирования когнитивной функции. Полученные результаты в целом открывают перспективу дальнейшим исследованиям дихолинсукцината в качестве средства-кандидата для лечения ишемического инсульта.

Практическая значимость настоящей работы состоит в том, что на основе дихолинсукцината как действующего вещества, повышающего чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к инсулину, разработан препарат Дирекорд, эффективность и безопасность которого для лечения ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде показана в доклинических и клинических исследованиях I, II и III фазы (Приложения А – Д).

В целом, настоящее исследование раскрывает механизмы регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах мозга и создает

теоретические предпосылки для разработки новых подходов к лечению заболеваний, связанных с нарушенным биологическим ответом на инсулин в мозге.

ВЫВОДЫ

1. Митохондрия является участником инсулиновой сигнализации в сердце, печени и нейронах, где выполняет роль источника окислительного сигнала инсулина (H_2O_2), вовлеченного в ингибирование активности протеинтирозинфосфатаз, известных негативных регуляторов фосфорилирования инсулинового рецептора, причем скорость генерации сигнальной H_2O_2 в печени и сердце в ответ на инсулин имеет гиперболическую зависимость Михаэлиса-Ментен от концентрации сукцината в интервале его физиологически релевантных концентраций 1–80 мкМ.

2. В нейронах митохондриальная сигнализация встроена в сигнальный путь, регулирующий чувствительность инсулинового рецептора, где объектом регуляции является фосфорилирование рецептора, известная посттрансляционная модификация необходимая для полной активации рецепторной тирозинкиназы, а роль регулятора играет окислительный сигнал инсулина, источником которого служит реакция окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой комплекса II митохондрий.

3. Окислительный сигнал инсулина представляет собой однократный 30-секундный выброс H_2O_2 в ответ на инсулин, предшествующий фосфорилированию рецептора и необходимый для повышения чувствительности инсулинового рецептора в нейронах к инсулину.

4. Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах проявляет сверхчувствительность к ингибированию окислительного сигнала инсулина, что выражается в резком сигмоидальном падении способности рецептора к фосфорилированию в ответ на инсулин при достижении определенной пороговой концентрации ингибитора, что объясняет гипофосфорилирование инсулинового рецептора в условиях, когда нет недостатка в инсулине.

5. Одним из факторов, снижающих окислительный сигнал инсулина и приводящих к гипофосфорилированию инсулинового рецептора в нейронах, является деполяризация внутренней мембраны митохондрий.

6. Глутамат в эксайтотоксической концентрации через деполяризацию митохондрий вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих киназ Akt, mTOR и GSK3 β в условиях, когда нет недостатка инсулина, что объясняет развитие нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, где глутаматная эксайтотоксичность является поражающим фактором, в частности при ишемическом инсульте.

7. На основе выявленных механизмов регуляции чувствительности инсулинового рецептора окислительным сигналом инсулина создан нейрональный инсулин-сенситайзер (дихолинсукцинат) – средство, улучшающее чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к инсулину, которое показало эффективность на биомоделях церебральной ишемии, старения и токсичности β -амилоида, где инсулиновая резистентность является одним из известных патогенетических факторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Pomytkin I.A., Kolesova O.E. Key role of succinate dehydrogenase in insulin-induced inactivation of protein tyrosine phosphatases. // Bull. Exp. Biol. Med. 2002. Vol. 133, № 6, P. 568–570.
2. Pomytkin I.A., Kolesova O.E. Effect of insulin on the rate of hydrogen peroxide generation in mitochondria. // Bull. Exp. Biol. Med. 2003. Vol. 135, № 6, 541–542.
3. Pomytkin I.A., Semenova N.A. Study of the effect of preconditioning with succinic acid salt of choline (1:2) on the disturbances of energy metabolism in the brain during ischemia by ^{31}P NMR in vivo. // Dokl. Biochem. Biophys. 2005. Vol. 403, P. 289–292.
4. Pomytkin I.A., Storozheva Z.I., Semenova N.A., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Varfolomeev S.D. Neuroprotective effect of choline succinate in rats with experimental chronic cerebral ischemia evaluated by cognitive ability tests. // Biology Bulletin. 2007. Vol. 34, P. 144–147.
5. Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Pomytkin I.A. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. // BMC Neurosci. 2007. Vol. 8, P. 84.
6. Storozheva Z.I., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Semenova N.A., Zakharova E.I., Pomytkin I.A. Dicholine salt of succinic acid, a neuronal insulin sensitizer, ameliorates cognitive deficits in rodent models of normal aging, chronic cerebral hypoperfusion, and beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia. // BMC Pharmacol. 2008. Vol. 8, P. 1.
7. Pomytkin I.A., Storozhevykh T.P., Senilova Ya.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Semenova N.A. P4-224: Mitochondrial respiration plays an integral role in insulin receptor activation in neurons: a possible link between dysfunctional insulin receptor signaling and mitochondrial dysfunction. // Alzheimer's and dementia. 2008. Vol. 4, № S4, P. T737.

8. Сариев А.К., Рычихин В.М., Помыткин И.А., Воронина Т.А. Противопаркинсоническое действие дихолина сукцината на модели МФТП-индуцированного паркинсонизма. // *Анн. клин. и эксперим. неврол.* 2011. Т. 4, С. 33–36.
9. Pomytkin I.A. H₂O₂ Signalling Pathway: A Possible Bridge between Insulin Receptor and Mitochondria. // *Curr. Neuropharmacol.* 2012. Vol. 10, № 4, P. 311–320.
10. Persiyantseva N.A., Storozhevyykh T.P., Senilova Y.E., Gorbacheva L.R., Pinelis V.G., Pomytkin I.A. Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. // *J. Mol. Signal.* 2013. Vol. 8, № 1, P. 11.
11. Рычихин В.М., Сариев А.К., Помыткин И.А. Противосудорожный эффект дихолина сукцината на моделях первично-генерализованной эпилепсии у мышей. // *Эксперим. клин. фармакол.* 2013, Т. 76, № 3, С. 10–12.
12. Помыткин И.А., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Каркищенко Н.Н. Инсулиновый рецептор в мозге: новая мишень в лечении центральной инсулиновой резистентности. // *Биомедицина.* 2018. № 3, С. 17-34.
13. Pomytkin I., Costa-Nunes J.P., Kasatkin V., Veniaminova E., Demchenko A., Lyundup A., Lesch K.P., Ponomarev E.D., Strekalova T. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. // *CNS Neurosci Ther.* 2018. Vol. 24, № 9, P. 763–774.
14. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. Insulin Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. // *Front. Neurosci.* 2019. Vol. 13, P. 1027.
15. Pomytkin I.A., Cline B.H., Anthony D.C., Steinbusch H.W., Lesch K.P., Strekalova T. Endotoxaemia resulting from decreased serotonin transporter (5-HTT) function: a reciprocal risk factor for depression and insulin resistance? // *Behav. Brain. Res.* 2015. Vol. 276, P. 111–117.
16. Pinelis V., Krasilnikova I., Bakaeva Z., Surin A., Boyarkin D., Fisenko A., Krasilnikova O., Pomytkin I. Insulin Diminishes Superoxide Increase in Cytosol and Mitochondria of Cultured Cortical Neurons Treated with Toxic Glutamate. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 20, P. 12593.

17. Pomytkin I., Krasil'nikova I., Bakaeva Z., Surin A., Pinelis V. Excitotoxic glutamate causes neuronal insulin resistance by inhibiting insulin receptor/Akt/mTOR pathway. // *Mol. Brain*. 2019. Vol. 12, № 1, P. 112.
18. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. Роль и регуляция индуцируемого гипоксией фактора транскрипции-1 и сукцинатного рецептора-1 при диабете типа 2: связь с сосудистыми осложнениями. // *Биомедицина*. 2019. Т. 15, № 1, С. 48–61.
19. Помыткин И.А., Каркищенко Н.Н. Метаболический контроль высокочастотных гамма-осцилляций в головном мозге. // *Биомедицина*. 2019. Т. 15, № 2, С. 43–53.
20. Pomytkin I., Pinelis V. Insulin Receptors and Intracellular Ca^{2+} Form a Double-Negative Regulatory Feedback Loop Controlling Insulin Sensitivity. // *F1000Res*. 2020. Vol. 9, P. 598.
21. Pomytkin I., Pinelis V. Brain Insulin Resistance: Focus on Insulin Receptor-Mitochondria Interactions. // *Life (Basel)*. 2021. Vol. 11, № 3, P. 262.
22. Krasilnikova, I.A., Pomytkin, I.A., Pinelis, V.G. Surin A.M. Insulin Normalizes Ionic Homeostasis and the State of Mitochondria after a Mechanical Damage to the Culture of Brain Neurons. // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2021. Vol. 15, P. 365–371.
23. Помыткин И.А., Писарев В.В., Меркулов М.Е., Носков С.М., Каркищенко Н.Н. Результаты I фазы открытого клинического исследования на здоровых добровольцах препарата Дирекорд. // *Биомедицина*. 2023. Т. 19, № 2, С. 69–77.
24. Помыткин И.А., В.В. Писарев, Меркулов М.Е., Кузнецова Е.Б., Салина Е.А., Малыгин А.Ю., Каркищенко Н.Н. Результаты клинического исследования II фазы: рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, с параллельными группами, проспективное исследование по подбору оптимальной дозировки и изучению эффективности, безопасности и переносимости лекарственного препарата Дирекорд, раствор для внутримышечного введения, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. // *Биомедицина*. 2023, Т.19, №3, С. 87–96.

25. Помыткин И.А., Писарев В.В., Меркулов М.Е., Лукиных Л.В., Моржухина М.В., Каркищенко Н.Н. Результаты клинического исследования III фазы: многоцентровое рандомизированное двойное слепое, плацебо-контролируемое в параллельных группах исследование эффективности и безопасности лекарственного препарата Дирекорд у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. // Биомедицина. 2023, Т.19, №4, С. 81 – 93.
26. Патент РФ № RU2228174С2. Янтарнокислый бис(2-гидрокси-N,N,N-триметилэтанаминий) для лечения инсулиновой резистентности, сахарного диабета, гиперлипидемии и дислипидемии : № 2002101481/15 : заявл. 10.04.2000 : опубл. 10.09.2003 / Помыткин И.А., Колесова О.Е., Уханова Т.Ю. ; – 5 с.
27. Патент РФ № RU2281765С1. Способ лечения церебральной ишемии: № 2005106088/14 : заявл. 04.03.2005 : опубл. 20.08.2006 / Помыткин И.А. Вертелецкий П.В. ; – 5 с.
28. Патент РФ № RU2281766С1. Российская Федерация. Способ улучшения когнитивной функции: № 2005106089/14: заявл. 04.03.2005 : опубл. 20.08.2006 / Помыткин И.А. Вертелецкий П.В. ; – 6 с.
29. Патент Евразийской патентной организации № EA017094В. Фармацевтические композиции, содержащие холиновые соли янтарной кислоты, для интраназального введения: № 201000120 : заявл. 02.08.2007 : опубл. 28.09.2012 / Помыткин И.А. ; – 7 с.
30. Патент Евразийской патентной организации № EA016274В1. Применение янтарной кислоты для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний : № 201000116 : заявл. 02.08.2007 : опубл. 30.03.2012 / Помыткин И.А. ; – 3 с.
31. Патент Евразийской патентной организации № EA019584В1. Холиновые соли янтарной кислоты для лечения депрессии, тревоги, шизофрении, нарушений сна, эпилепсии: № 201100826 : заявл. 26.11.2008 : опубл. 30.04.2014 // Помыткин И.А. ; – 11 с.
32. Патент США № US7666908В2. Method for enhancing cognitive function : US11/338,169 : filed 24.01.2006 : granted 23.02.2010 // Pomytkin I.A., Verteletsky P.V. ; – 4 p.

33. Патент США № US6521665B1. Method of treating insulin resistance : № US09/914,499 : filed 01.03.1999 : granted 18.02.2003 // Pomytkin I.A., Kolesova O.E., Ukhanova T.Ju. ; – 5 p.
34. Патент США № US8673977B2. Choline salts of succinic acid for the treatment of depression, anxiety, schizophrenia, sleep disorder, and epilepsy : № US13/129,739 : filed 26.11.2008 : granted 18.03.2014 // Pomytkin I.A. ; – 5 p.
35. Патент Европейской патентной организации № EP1156795B1. Use of succinic acid or salts thereof and method of treating insulin resistance : № EP99933301A : filed 01.03.1999 : granted 02.06.2004 // Pomytkin I.A., Kolesova O.E., Ukhanova T.Ju. ; – 10 p.
36. Патент Японии № JP3944393B2. インスリン抵抗性および糖尿病のための、コリン塩基とコハク酸とを含む相乗効果のある組成物 [Синергическая композиция, содержащая холиновое основание и янтарную кислоту, для лечения резистентности к инсулину и диабета] : № JP2001574101 : заявл. 10.04.2000 : опубл. 11.07.2007 // Помыткин И.А., Колесова О.Е., Уханова Т.Ю. ; – 9 с.
37. Патент КНР № CN101801368B. 包含琥珀酸的胆碱盐的用于鼻内给药的药物组合物 [Фармацевтические композиции для интраназального введения, содержащие холиновые соли янтарной кислоты] : № CN2007801000929 : заявл. 02.08.2007 : опубл. 13.06.2012 // Помыткин И.А. ; – 10 с.
38. Патент КНР № CN102223883B. 用于治疗抑郁症、焦虑症、精神分裂症、睡眠障碍和癫痫症的琥珀酸的胆碱盐 [Холиновые соли янтарной кислоты для лечения депрессии, тревоги, шизофрении, нарушений сна и эпилепсии] : № CN200880132120 : заявл. 26.11.2008 : опубл. 10.07.2013 // Помыткин И.А. ; – 9 с.

СОКРАЩЕНИЯ

^1H МРС	магнитно-резонансная спектроскопия на ядрах ^1H
^{31}P МРС	магнитно-резонансная спектроскопия на ядрах ^{31}P
ANOVA	дисперсионный анализ
Cr	креатин
EC ₅₀	концентрация полумаксимального эффекта
FCCP	карбонил цианид-п-трифторметоксифенилгидразона
G α_{i2}	G-белок альфа2i
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования
K _m	константа Михаэлиса
mTORC1/2	мишень рапамицина млекопитающих комплекс 1/2
NAA	N-Ацетиласпартат
NAC	N-ацетилцистеин
NIHSS	шкала тяжести инсульта
PTX	коклюшный токсин
V _{max}	максимальная скорость реакции
$\Delta\Psi_m$	потенциал внутренней мембраны митохондрий
Akt	протеинкиназа АКТ/В
АТФ	аденозинтрифосфат
ДХС	дихолинсукцинат
ИР	инсулиновый рецептор
H ₂ O ₂	перекись водорода
НЯ	нежелательное явление
ПТФ	протеинтирозинфосфатаза
СДГ	сукцинатдегидрогеназа
ЦНС	центральная нервная система
УРПИ	условный рефлекс пассивного избегания
ФК	фосфокреатин