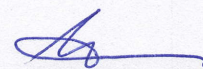


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-
биологического агентства»



На правах рукописи

Помыткин Игорь Анатольевич

**МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО
РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОНАХ**

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

д.м.н., профессор Каркищенко Владислав Николаевич

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Инсулин в центральной нервной системе.....	14
1.2 Инсулиновый рецептор в центральной нервной системе.....	17
1.3 Активация инсулинового рецептора	20
1.4 Сигнальная система рецептора инсулина в мозге.....	23
1.5 Биологические эффекты инсулина в мозге.....	28
1.6 Окислительный сигнал инсулина.....	29
1.7 Инсулиновая резистентность.....	30
1.8 Инсулиновая резистентность и болезнь Альцгеймера.....	32
1.9 Инсулиновая резистентность и болезнь Паркинсона.....	34
1.10 Инсулиновая резистентность и черепно-мозговая травма.....	35
1.11 Ишемический инсульт и постинсультная инсулиновая резистентность..	36
1.12 Связь инсулиновой резистентности и нейропластичности мозга.....	52
1.13 Антидиабетические средства в лечении ишемического инсульта.....	60
1.14 Выводы по главе 1.....	66
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	70
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МИТОХОНДРИЙ В ГЕНЕРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СИГНАЛА ИНСУЛИНА И РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗ.....	83
3.1 Введение.....	83
3.2 Роль митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и ингибировании протеинтирозинфосфатаз.....	84
3.3 Влияние инсулина на скорость генерации H ₂ O ₂ митохондриями.....	88
3.4 Выводы по главе 3.....	93

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОНАХ..	94
4.1 Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах.....	94
4.2 Роль митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и регуляции фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах.....	95
4.3 Кинетика окислительного сигнала инсулина в нейронах.....	101
4.4 Сверхчувствительность фосфорилирования рецептора инсулина к окислительному сигналу инсулина в нейронах.....	105
4.5 Эффект деполяризации митохондрий на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах.....	111
4.6 Регуляция чувствительности инсулинового рецептора в нейронах.....	114
4.7 Возможные причины гипофосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах.....	118
4.8 Выводы по главе 4.....	121
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РАЗВИТИЯ ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В НЕЙРОНАХ В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ	124
5.1 Введение.....	124
5.2 Динамика $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в нейронах коры мозга крыс	124
5.3 Эффект глутамата на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах коры мозга крыс.....	126
5.4 Выводы по главе 5.....	130
ГЛАВА 6. СОЗДАНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОГО ИНСУЛИН-СЕНСИТАЙЗЕРА И ЕГО ИССЛЕДОВАНИЕ НА БИОМОДЕЛЯХ.....	131
6.1 Введение.....	131
6.2 Дихолинсукцинат – общая информация.....	133
6.3 Дихолинсукцинат – нейрональный инсулин-сенситайзер.....	136
6.4 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели глобальной ишемии мозга у крыс методом ^{31}P ЯМР <i>in vivo</i>	138

6.5 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели церебральной гипоперфузии у крыс методом ^1H ЯМР <i>in vivo</i> и в тестах когнитивной функции.....	143
6.6 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели нормального старения у мышей методом ^1H ЯМР <i>in vivo</i> и в тестах когнитивной функции.....	150
6.7 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели токсичности β -амилоида 25-35 у крыс.....	158
6.8 Выводы по главе 6.....	164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	165
СОКРАЩЕНИЯ.....	169
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	174
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное). Акт о внедрении результатов диссертационной работы Помыткина Игоря Анатольевича «Механизм регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах».....	221
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное). Клиническое исследование I фазы лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у здоровых добровольцев.....	222
ПРИЛОЖЕНИЕ В (справочное). Клиническое исследование II фазы лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде.....	231
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное). Клиническое исследование III фазы лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде.....	241

ВВЕДЕНИЕ

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. С учетом того, что фосфорилирование ИР по трем тирозинам Y1146, 1150 и 1151 (нумерация изоформы А рецептора) является решающим условием активации рецепторной тирозинкиназы ИР и первым шагом в каскаде передачи сигнала инсулина, опосредующем все биологические ответы инсулина, 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 [1], 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 [2]. 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 [3]. Возможности фармакотерапии ишемического инсульта крайне ограничены. В первые часы острейшей фазы инсульта ($\leq 4,5$ часа) рекомендуется прием тромболитических препаратов [4]. Разработка нейро-протекторов, снижающих гибель нейронов, не имела успеха несмотря на много-летние усилия и успешные доклинические испытания более чем 1000 экспериментальных кандидатов [5, 6]. 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 HOMA-IR, имеют повышенный неврологический дефицит и повышенный риск инвалидизации, повторного инсульта и смерти в первый год после инсульта [7, 8, 9, 10]. 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 и задачи исследования. Цель исследования – изучить молекулярные механизмы регуляции чувствительности инсулиновых рецепторов в нейронах для создания на этой основе новых подходов к лечению нейрональной инсулиновой резистентности.

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.

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.

Степень достоверности и апробация 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. 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. 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).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа оформлена в соответствии 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Инсулин в центральной нервной системе

Инсулин представляет собой полипептид с массой 5,7 кДа, который секретируется β -клетками поджелудочной железы и действует на рецепторы в тканях-мишенях, таких как печень, скелетные мышцы и жировая ткань, регулируя метаболизм глюкозы и липидов. Официальный приоритет открытия инсулина принадлежит Бантингу, Маклеоду и Бесту из университета Торонто, которые выделили инсулин из экстракта поджелудочной железы и впервые успешно применили его как сахаропонижающее средство у пациента с инсулинозависимым сахарным диабетом в январе 1922 г. [15, 16]. Структура инсулина была расшифрована тридцать три года спустя британским биохимиком Фредериком Сенгером в 1955 г. [17]. Хотя инсулин широко рассматривается как гормон, регулирующий гомеостаз глюкозы, его функции значительно шире.

Открытие инсулина и инсулиновых рецепторов в мозге крыс в 1978 г. [18, 19], а затем и в мозге человека в 1981 г. [20], поставило вопрос о происхождении и функциях инсулина в центральной нервной системе (ЦНС). В ранних работах было обнаружено, что хотя уровни инсулина в крови значительно отличались у здоровых животных и животных со стрептозотоциновым диабетом, таких отличий не было обнаружено в мозге, на основании чего была выдвинута гипотеза, что инсулин может продуцироваться мозгом, а не только поджелудочной железой, и роль инсулина в ЦНС может быть не связана с периферическим метаболизмом глюкозы [21, 22].

К настоящему времени накопились многочисленные доказательства того, что существует по меньшей мере два источника инсулина в мозге: (1) транспорт инсулина из кровотока в мозг через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) путем насыщаемого рецептор-опосредованного трансцитоза [23, 24, 25, 26, 27] и (2) локальный синтез инсулина в нейронах мозга [28, 29, 30, 31, 32, 34]. В пользу существования синтеза инсулина *de novo* в нейронах свидетельствует ряд фактов.

В исследованиях *in vitro* на культурах клеток мозга грызунов инсулин и мРНК инсулина были найдены в нейронах [28, 29, 30], но не в глиальных клетках [28, 31]. Инкубация культур нейронов с меченым [³H]-лейцином приводила к появлению меченого [³H]-инсулина в среде инкубации [32]. Экспрессия гена препроинсулина 2 (*Ins2*), ортолога гена инсулина млекопитающих была обнаружена у грызунов в гиппокампе [33, 34], коре головного мозга [35] и передней обонятельной луковице [34]. Области активной транскрипции гена *INS* были обнаружены в нескольких областях человеческого мозга, включая гиппокамп, кору головного мозга и мозжечок [34].

Особенностью нейронального инсулина является то, что он секретируется нервными окончаниями в ответ на деполяризацию. Так, деполяризация нейронов в первичной культуре мозга крыс вератридином (Na^+ -ионофор) или повышение концентрации внеклеточного K^+ в присутствии Ca^{2+} , вызывала секрецию инсулина [32]. Этот же эффект высвобождения инсулина был получен при деполяризации нервных терминалов (синапсом), на основании чего авторы работы сделали вывод, что инсулин хранится в мозге взрослых крыс в синаптических везикулах внутри нервных окончаний, из которых он может быть высвобожден экзоцитозом в условиях нейрональной активности [36]. Если транспорт инсулина, произведенного поджелудочной железой, в мозг в целом согласуется с представлениями об инсулине как о гормоне, то локальный синтез инсулина в нейронах, хранение в синаптических везикулах и высвобождение в ответ на деполяризацию указывает на особые функции нейронального инсулина в мозге. В контексте этих особых функций было показано, что инсулин участвует в процессах регуляции синаптической пластичности в ЦНС, регулируя как долговременную потенциацию, так и долговременную депрессию, механизмы, связанные с формированием памяти. В возбуждающих синапсах инсулин способствует нейротрансмиссии, опосредованной ионотропным глутаматным рецептором подтипа N-метил-D-аспартата (NMDAR), тем самым индуцируя долговременную потенциацию. Инсулин стимулирует транслокацию функциональных рецепторов NMDAR к

клеточной мембране [37] и потенцирует токи NMDAR, причем величина этих токов зависит от дозы инсулина, времени воздействия и состава субъединиц NMDA рецептора [38, 39, 40, 41,42]. Структурно NMDAR представляет собой гетеротетрамер, состоящий из 4 субъединиц и включающий по 2 субъединицы подтипов NR1 и NR2. Инсулин быстро потенцирует ответы NMDAR, имеющие в своем составе субъединицы NR2A и NR2B, но не NR2C и NR2D [38], через транзиторное тирозинфосфорилирование субъединиц NR2A и NR2B в составе NMDAR [40]. Инсулин снижает нейротрансмиссию, связанную с ионотропными глутаматными рецепторами подтипа α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), индуцируя ДВД [43, 44]. Инсулин стимулирует транслокацию рецептора γ -аминомасляной кислоты типа А (GABAAR) из внутриклеточного компартмента к постсинаптической мембране, тем самым увеличивая плотность функциональных рецепторов в постсинаптическом домене тормозящих синапсов [45]. Кроме того, высокие нефизиологические концентрации инсулина (500 нМ) индуцируют тоническую проводимость в нейронах CA1 гиппокампа через активацию высокоаффинных экстраинаптических каналов GABA типа А, содержащих субъединицу $\alpha 5$, тем самым ограничивая возбудимость нейронов CA1 [46]. В совокупности приведенные данные указывают на прямое участие инсулина в регуляции синаптической пластичности, особенно в потенцировании токов NMDAR в возбуждающих синапсах.

Инсулин в ЦНС участвует в процессах обучения и формирования памяти [47], регуляции пищевого поведения [48] и метаболизма глюкозы в мозге [49, 50, 51, 52, 53, 54]. Регулируемый инсулином транспортер глюкозы 4 (GLUT4) экспрессируется наряду с основным нейрональным транспортером глюкозы 3 (GLUT3) в базальных отделах переднего мозга, гиппокампе, миндалевидном теле, коре головного мозга и мозжечке [49], а также в гипоталамусе [50]. Инсулин стимулирует транслокацию GLUT4 к плазматической мембране гиппокампа крысы [51], усиливает локальный гликолитический метаболизм, а также улучшает пространственную память [52].

Ингибирование GLUT4 в ЦНС само по себе не ухудшает характеристик пространственной памяти, но предотвращает эффект усиления когнитивных функций инсулином [53]. Индуцированная инсулином транслокация GLUT4 к мембране нейронов в гиппокампе происходит в периоды высокой потребности в энергии, в частности, во время обучения, что указывает на наличие причинно-следственной связи между нарушением регуляции инсулинозависимого транспорта глюкозы в некоторых областях мозга и когнитивными нарушениями [54]. В целом, инсулин усиливает метаболизм глюкозы в мозге в условиях высокой потребности в энергии, но не влияет на базовый метаболизм, из-за чего мозг ранее считался инсулин-нечувствительным органом.

1.2 Инсулиновый рецептор в центральной нервной системе

Инсулиновый рецептор (ИР) представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух α -субъединиц и двух β -субъединиц, связанных дисульфидными мостиками, причем каждая внеклеточная α -субъединица содержит высокоаффинный и низкоаффинный сайты связывания инсулина, а цитоплазматическая часть трансмембранной β -субъединицы обладает тирозинкиназной активностью [55].

Существуют две структурно и функционально различные изоформы рецептора инсулина, а именно длинная изоформа В (ИР-В), которая преобладает в периферических тканях взрослых млекопитающих (мышцы, печень, почки и жировая ткань), и короткая изоформа А (ИР-А), у которой в результате альтернативного сплайсинга экзона 11 отсутствуют 12 аминокислот на С-конце α -субъединицы рецептора [56]. Обе изоформы имеют схожую аффинность к инсулину в терминах полумаксимального ингибирования связывания инсулина (IC_{50}) в анализе на конкурентное связывание лигандов [57, 58, 59, 60], и эти значения IC_{50} близки к концентрациям инсулина, требуемым для полумаксимального фосфорилирования рецептора (EC_{50}), являющегося общим механизмом активации для обеих изоформ рецептора [57]. Обе изоформы имеют схожую эффективность

при активации инсулином *in vitro* [61], однако, короткая изоформа ИР-А не имеет отрицательной кооперативности в связывании инсулина, который характерен для ИР-В [56, 57]. Важнейшим отличием короткой изоформы ИР-А от ИР-В является ее способность эффективно связывать инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF2) при физиологически значимых концентрациях последнего, что ведет к активации ИР-А [57, 58, 59, 60, 62, 63] (Таблица 1).

Таблица 1 - Связывающие свойства изоформ ИР-А и ИР-В ([65]).

Параметр	Клетки	ИР-А	ИР-В	Ссылка
Инсулин				
IC ₅₀ , нМ	CHO	0,9	1,6	58
	R ⁻ мыши	0,9	1,0	57
	R ⁻ мыши	0,4	0,5	59
	CHO	0,3	0,5	60
EC ₅₀ , нМ	R ⁻ мыши	0,8	1,1	57
	CHO	0,6	0,7	57
	NIH 3T3	0,7	0,8	57
	HEK-293	2,7	2,6	61
IGF2				
IC ₅₀ , нМ	R ⁻ мыши	2,5	>20,0	57
	CHO	2,2	10,0	60
EC ₅₀ , нМ	R ⁻ мыши	3,0	24,0	57
	CHO	3,8	30,0	57
	NIH 3T3	3,6	22,0	57

Сокращения: IC₅₀, полу-максимальное ингибирование связывания в анализе конкуренции лигандов; EC₅₀, полу-максимальная эффективная концентрация, необходимая для достижения 50% максимальной активности рецептора; R⁻ мыши, клетки с целенаправленным нарушением гена рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR), трансфицированные ИР-А или ИР-В.

Метаболические и митогенные эффекты инсулина и IGF2, опосредуемые ИР-А, могут при этом отличаться, что, как полагают, связано с меньшей эффективностью фосфорилирования сайта тирозинкиназной активности в β-цепи

ИР-А и снижением скорости интернализации рецептора в ответ на стимуляцию IGF2 по сравнению с инсулином [64].

Рецепторы к инсулину найдены во всех отделах мозга, но с наивысшей плотностью в обонятельных луковицах, гипоталамусе, гиппокампе, коре головного мозга и мозжечке [19, 66, 11]. В отличие от классических инсулин-чувствительных периферических тканей взрослых млекопитающих (печень, мышцы, жировая ткань), где преобладает длинная изоформа рецептора ИР-В, нейроны в ЦНС экспрессируют исключительно короткую изоформу ИР-А [11, 12, 13, 14] (Таблица 2).

Таблица 2 - Распределение рецепторов ИР-А и ИР-В в ЦНС и периферических тканях взрослых млекопитающих ([65]).

Ткань/клетки	Вид	ИР-А	ИР-В	Ссылка
Центральная нервная система				
Мозг	Крыса	++	–	11
Синапсосомы				
Гиппокамп	Крыса	++	–	13
Гипоталамус	Крыса	++	–	13
Обонятельный бугорок	Крыса	++	–	13
Кора	Крыса	++	–	14
Астроциты	Человек	+	++	12
Астроциты	Человек	++	+	67
Периферические ткани				
Печень	Человек	+	++	56, 68
Мышцы	Человек	+	++	68
Жировая ткань	Человек, крыса	+	++	13, 68

Символы указывают на отсутствие (–), присутствие в количестве <50% (+) или >50% (++) конкретной изоформы в ткани/клетке.

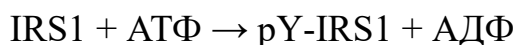
Рецепторы ИР-А обнаруживаются как в соме, так и на периферических участках нейронов, но в наивысшей концентрации в постсинаптической плотности дендритных шипиков, где ИР-А локализованы вместе с NMDAR, что указывает на роль инсулиновой сигнализации в функционировании возбуждающих синапсов

[11]. Клетки глии экспрессируют обе изоформы инсулинового рецептора ИР-А и ИР-В [12, 67], но их плотность существенно ниже, чем в нейронах [66, 11].

IGF2 эффективно связывается не только с ИР-А, но также с рецепторами инсулиноподобного фактора роста типа 1 (IGF1R) и 2 (IGF2R) [69, 70], что затрудняет понимание специфической роли IGF2/ИР-А сигнализации в эффектах IGF2 в мозге. IGF2 широко экспрессируется в ЦНС, где участвует в регуляции синаптической пластичности [71, 72, 73, 74]. Единственный доказанный процесс, в котором эффекты IGF2 опосредуются только ИР-А, но не рецепторами IGF1R и IGF2R, — это активация взрослого нейрогенеза в субвентрикулярной зоне боковых желудочков [75, 76]. Известно, что взрослый нейрогенез особенно усиливается после ишемического инсульта (инфаркта мозга), когда вновь образовавшиеся нейробласты и клетки-предшественники олигодендроцитов мигрируют из субвентрикулярной зоны к границе зоны ишемии, где они вовлекаются в процесс постинсультной регенерации [77]. Было показано, что экспрессия IGF2 в мозге долговременно повышается после эпизодов гипоксии-ишемии [78] и внутримозгового кровоизлияния [79], что указывает на возможное участие IGF2 в процессах постинсультной регенерации. В этом контексте IGF2/ИР-А сигнализация может рассматриваться как мишень для создания новых лекарственных средств, направленных на реабилитацию после инсульта.

1.3 Активация инсулинового рецептора

Инсулиновый рецептор является тирозинкиназой, которая катализирует реакцию фосфорилирования остатков тирозина в белках-субстратах инсулинового рецептора (IRS), в частности, IRS1 в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ):



где pY-IRS1 – тирозинфосфорилированный IRS1, а АДФ – аденозиндифосфат.

Структура тирозинкиназного домена рецептора в активном и неактивном состоянии была расшифрована Стивеном Хаббардом и его коллегами в 1994 и 1997 гг. с использованием метода рентгеноструктурного анализа [80, 81, 82]. В

неактивном состоянии каталитический сайт киназы находится в состоянии аутоингибирования псевдосубстратом, так называемой петлей активации, где один из тирозинов петли Y1150 (нумерация ИР-А) образует водородную связь с каталитическим аспаратом D1120. В неактивной конформации петля активации пространственно запрещает доступ АТФ (сайт связывания K1018) и субстрата к активному центру киназы (Рисунок 1) [80]. Связывание рецептора с инсулином вызывает фосфорилирование трех остатков тирозина Y1146, Y1150 и Y1151 в петле активации, что ведет к главному конформационному изменению, открывающему неограниченный доступ субстрата и АТФ к каталитическому сайту киназы [81] и последующему 200-кратному увеличению тирозинкиназной активности рецептора [82].

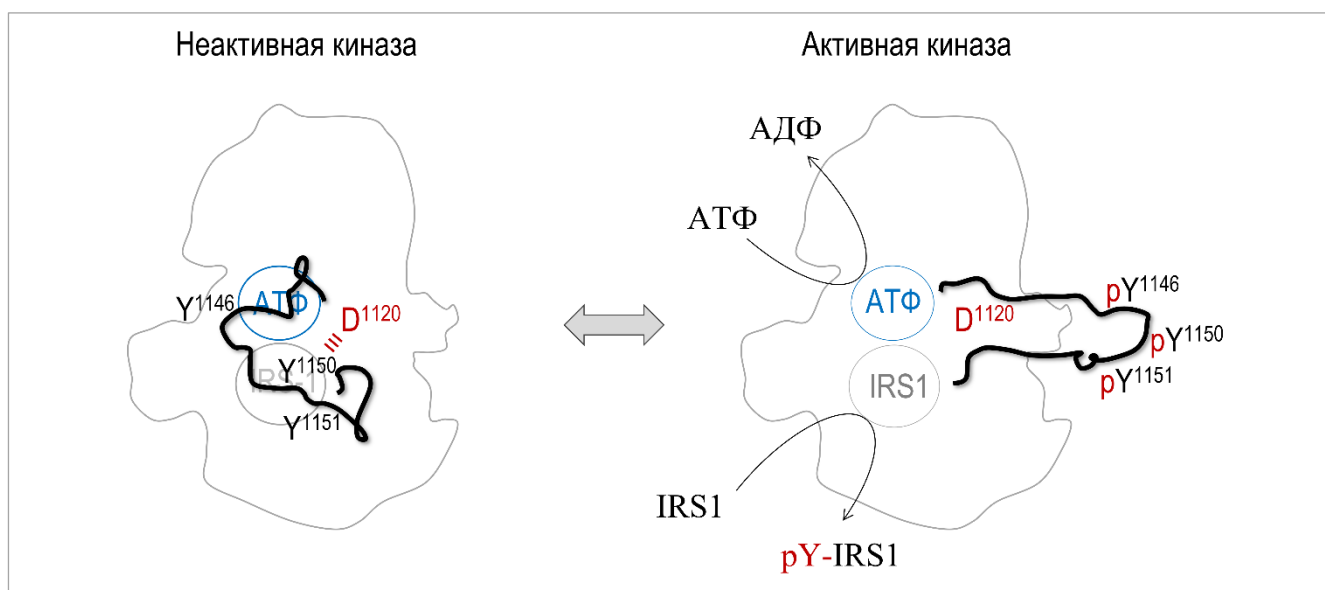


Рисунок 1 - Схема активации инсулинового рецептора. Рецепторная киназа в неактивном состоянии находится в состоянии аутоингибирования, которое стабилизировано водородной связью между Y1150 (нумерация ИР-А) и каталитическим D1120, причем доступ субстратов и АТФ к активному центру киназы пространственно запрещен. Связывание рецептора с инсулином вызывает фосфорилирование остатков тирозина 1146, 1150 и 1151 в петле активации с образованием остатков фосфотирозина pY1146, pY1150 и pY1151, что ведет к главному конформационному изменению, которое открывает доступ субстрата

(например, IRS1) и АТФ к каталитическому сайту киназы и активации рецепторной тирозинкиназы, что считается активацией рецептора. Киназа фосфорилирует IRS1 в присутствии АТФ, образуя тирозинфосфорилированную форму pY-IRS1, которая способна передавать сигнала от рецептора к нижележащим участникам сигнального пути рецептора инсулина.

Фосфорилирование петли активации в ответ на стимуляцию инсулином является обратимым. Дефосфорилирование рецептора катализируется целым рядом внутриклеточных протеинтирозинфосфатаз, среди которых важную роль играет протеинтирозинфосфатаза 1В (PTP1B), что ведет к инактивации инсулинового рецептора [83, 84]. Реакция дефосфорилирования вторична по отношению к активации инсулинового рецептора, так как PTP1B сама является субстратом рецепторной тирозинкиназы и фосфорилирование остатков тирозина Y152/Y153 в составе PTP1B необходимо для каталитической активности PTP1B [85]. Этот способ взаимодействия ИР и PTP1B формирует обратную отрицательную связь в регуляции активности ИР (Рисунок 2).

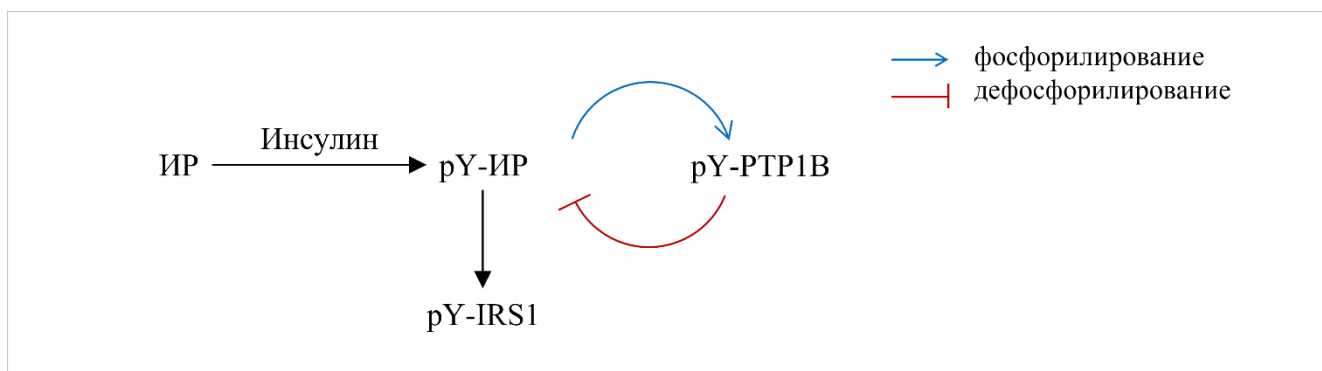


Рисунок 2 - Схема инактивации инсулинового рецептора фосфатазой PTP1B. Инсулин стимулирует переход рецептора ИР в активную фосфорилированную форму pY-ИР, которая фосфорилирует субстрат IRS1 с образованием активной сигнальной формы pY-IRS1, запускающей каскад инсулиновой сигнализации. Кроме того, активная форма рецептора pY-ИР фосфорилирует тирозинфосфатазу PTP1B с образованием активной фосфорилированной формы pY-PTP1B, которая в

свою очередь дефосфорилирует и инактивирует инсулиновый рецептор, терминируя инсулиновую сигнализацию.

В целом, активность протеинтирозинфосфатаз ограничивает время существования рецептора в активном состоянии, но не влияет на активацию рецептора инсулином.

Известно, что G-белки участвуют в активации инсулинового рецептора. $G\alpha_{i2}$ является специфическим G-белком, который ассоциируется с ИР в периферических тканях и влияет на фосфорилирование ИР пропорционально степени такой ассоциации [93]. Фосфорилирование ИР и IRS1 в ответ на введение инсулина *in vivo* заметно усиливалось в жире и скелетных мышцах мышей Q205L $G\alpha_{i2}$, которые постоянно экспрессировали активный $G\alpha_{i2}$ [94]. Напротив, фосфорилирование IRS1 в периферических тканях заметно снижалось у трансгенных мышей с дефицитом $G\alpha_{i2}$ в ответ на введение инсулина по сравнению с нормальным контролем [95]. Стимуляция адипоцитов инсулином вызывает выброс перекиси водорода, которая ингибирует каталитический сайт протеинтирозинфосфатаз, негативных регуляторов инсулиновой сигнализации. Генерация этого окислительного сигнала инсулина в адипоцитах опосредуется $G\alpha_{i2}$ [93, 363], который наряду с другими белками $G\alpha_{i/o}$ ингибируется коклюшным токсином (pertussis toxin, PTX) [364]. В этом контексте функция G-белков, в частности $G\alpha_{i2}$, связана с поддержанием высокой активности рецептора инсулина в процессе фосфорилирования через ингибирование ферментов дефосфорилирующих и инактивирующих инсулиновый рецептор.

1.4 Сигнальная система рецептора инсулина в мозге

Сигнальная система инсулинового рецептора построена как сложная сеть сигнальных путей, в которых участвует множество сигнальных молекул. Поэтому общим основным подходом к изучению этой системы является выявление так называемых «критических узлов» (critical nodes) в сети передачи сигнала, которые

в наибольшей степени определяют биологический результат действия инсулина [96].

Связывание инсулина (или IGF2 в случае ИР-А) с рецептором на мембранах клеток ведет к фосфорилированию рецептора по трем тирозинам активационной петли и активации рецепторной тирозинкиназы (раздел 1.1.4), которая далее фосфорилирует остаток тирозина Y960 (нумерация ИР-А) в околосмембранном домене рецептора, создавая сайт связывания с крупными белками-субстратами инсулинового рецептора, среди которых IRS1, IRS2 и IRSp53 наиболее широко представлены в ЦНС [11, 96, 97, 99].

Инсулиновый рецептор и ассоциированные с ним субстраты IRS, из которых наиболее изучен IRS1, образуют первый критический узел сигнальной системы инсулина. IRS1 представляет собой стыковочный белок, который передает сигнал от инсулинового рецептора к нижестоящим регуляторным элементам. В ответ на связывание инсулина, рецепторная тирозинкиназа ИР активируется и фосфорилирует по меньшей мере восемь остатков тирозина Y460, Y608, Y628, Y895, Y939, Y987, Y1172 и Y1222 в составе IRS1, которые формируют несколько сайтов связывания с теми сигнальными молекулами, которые имеют src-гомологичный 2 (SH2) домен. В частности, pY608/Y939 образуют сайт связывания с регуляторной субъединицей p85 α фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), pY895 со связывающим белком 2 рецепторов факторов роста (Grb2), а pY1172 с тирозинфосфатазой SHPTP2, что обеспечивает дальнейшее разветвление сигнала рецептора инсулина по нескольким нижележащим сигнальным путям [100] (Рисунок 3).

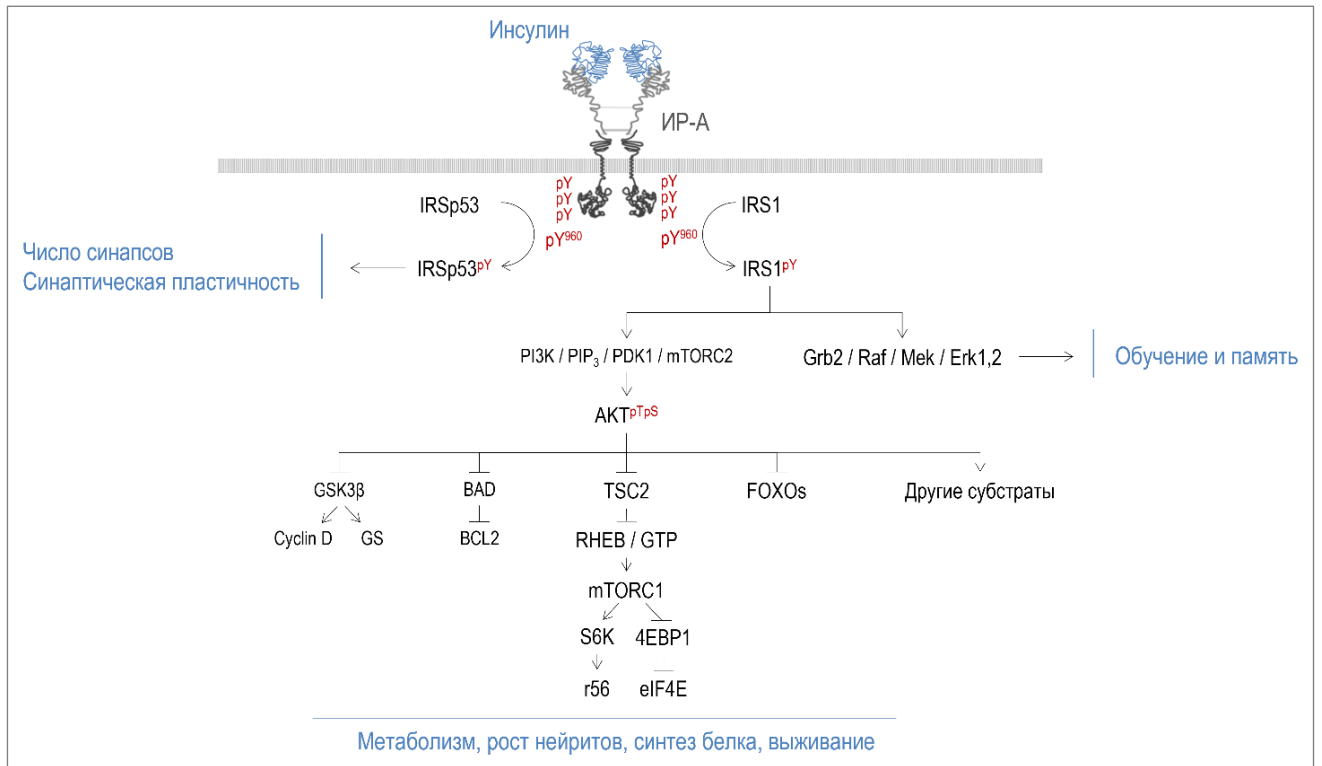


Рисунок 3 - Сигнальная система инсулинового рецептора в ЦНС. Связывание рецептора (ИР-А) с инсулином ведет к активации рецептора, его ассоциации с IRS1 и тирозинфосфорилированию IRS1 (IRS1^PY) по сайтам связывания с PI3K (pY608/pY939) и Grb2 (pY895). Сигнальный путь IRS1^PY/PI3K/PIP₃/PDK1/mTORC2 ведет к фосфорилированию АКТ по остаткам треонина (pT³⁰⁸) и серина (pS⁴⁷⁴), что ведет к полной активации АКТ киназы (АКТ^PT^PS) и фосфорилированию нижележащих субстратов GSK3β, BAD, TSC2, FOXOs и др., что опосредует множество биологических эффектов инсулина, включая регуляцию метаболизма, рост нейритов, синтез белка и выживание. Сигнальный путь Grb2/Raf/Mek/Erk1,2 ведет к активации митоген-активируемых протеинкиназ и опосредует процессы формирования памяти. Сигнальный путь ИР-А/IRSp53 участвует в регуляции числа синапсов и синаптической пластичности в возбуждающих нейронах. Сигнализация инсулинового рецептора в ЦНС регулирует число синапсов, пластичность дендритов и функцию нейронной сети в целом [112]. Сокращения: АКТ, протеинкиназа АКТ/В; IRS1, инсулинового рецептора субстрат 1; BAD, BCL2 антагонист клеточной смерти; BCL2, регулятор апоптоза BCL2; eIF4E, эукариотический фактор инициации трансляции 4E; Erk1,2, внеклеточным

сигналом-активируемая киназа 1,2; 4EBP1, связывающий белок 1 эукариотического фактора инициации трансляции 4E; FOXOs, англ. forkhead box белок O; Grb2, рецепторов факторов роста связывающий белок 2; GSK3 β , гликогенсинтазы киназа 3 β ; GS, гликогенсинтаза; GTP, гуанозинтрифосфат; Mek, митоген-активируемая протеинкиназа; mTORC1/2, мишень рапамицина млекопитающих комплекс 1/2; PI3K, фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP₃, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PDK1, фосфатидилинозитол-зависимая киназа 1; Raf, Raf-1 киназа; r56, рибосомальный белок S6; RHEB, гомолог RAS в мозге; S6K, S6 киназа; TSC2, туберин.

PI3K представляет собой гетеродимер, состоящий из регуляторной субъединицы p85 α , имеющей SH2 домен, и каталитической субъединицы p100. Последняя фосфорилирует мембраносвязанный фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP₂) с образованием фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP₃), образующего сайт связывания с белками, которые имеют домен гомологичный плекстрину (PH), в частности с протеинкиназами D1 (PKD1) и B (АКТ/ПКВ) [101]. PKD1 фосфорилирует АКТ по остатку треонина T308, а киназа mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) по остатку серина S473, что ведет к полной активации АКТ киназы. АКТ киназа представляет собой центральный критический узел в передаче сигнала рецептора инсулина к нижележащим сигнальным молекулам, в том числе mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) [102], которые вместе регулируют такие процессы, как метаболизм, синтез белка, клеточный рост, аутофагия, выживание и апоптоз. В целом, эта сложная последовательность реакций фосфорилирования формирует канонический путь IP/IRS1/PI3K/mTORC1, общий для ЦНС [99] и периферических тканей [103].

Grb2 представляет собой небольшой цитоплазматический белок, который после связывания с тирозинфосфорилированным IRS1 запускает цепь внутриклеточных событий, приводящих к активации митоген-активируемых (MAP) киназ. Функциональная важность этого сигнального пути в ЦНС в

процессах обучения и памяти была показана Жао и коллегами, которые обнаружили, что во время обучения в водном лабиринте Морриса у крыс происходила активация Grb2/MAPK сигнализации [104].

Необычный для периферических тканей субстрат инсулинового рецептора IRSp53 был открыт в 1996 г. Преимущественным сайтом локализации IRSp53 является мозг [105]. Инсулин дозозависимо стимулирует быстрое тирозинфосфорилирование белка IRSp53 [105, 106]. В сером веществе мозга содержание IRSp53 больше, чем в белом, причем IRSp53 представлен во всех структурах мозга, включая кору головного мозга (слои II/III, V и VI), стриатум, гиппокамп, обонятельный бугорок, обонятельную луковицу, мозжечок, субталамическое ядро, миндалевидное тело, гипоталамус и черную субстанцию, [107, 108]. На клеточном и субклеточном уровне IRSp53 обнаруживается преимущественно в возбуждающих синапсах нейронов, где он концентрируется в постсинаптической плотности дендритных шипиков совместно с ИР и NMDAR [11]. Уровень IRSp53 в возбуждающих синапсах в 5-17 раз выше, чем в ГАМКергических синапсах [108]. IRSp53 взаимодействует со множеством белков-партнеров в синапсах, в том числе с F-актином, PSD93, PSD95, Kank1, Rac1, Cdc42, BAI1, Cypin, DRPLA/Atrophia1, Dynamin, Rps8, Espin, Shank1, Shank3, Spin90, Synaptopodin, Tiam1, Wave-1/2 и VASP [109]. IRSp53 способствует формированию постсинаптической плотности и связыванию актиновых филаментов [110]. Нокаут IRSp53 ведет к снижению плотности дендритных шипиков, а повышение экспрессии IRSp53, напротив, увеличивает их плотность и размер [111].

В целом, система инсулиновой сигнализации распространена по всему мозгу и включает лиганды (инсулин и IGF2), инсулиновый рецептор (преимущественно ИР-А изоформу), и, по меньшей мере, три сигнальных пути: два канонических ИР/IRS1/PI3K/АКТ/mTORC1 и ИР/IRS-1/Grb2/Raf/Mek/Erk1,2, а также специфический для возбуждающих синапсов путь ИР-А/IRSp53, которые вместе обеспечивают множество ответов инсулина в ЦНС, включая процессы нейропластичности мозга.

1.5 Биологические эффекты инсулина в мозге

Биологические эффекты инсулина в ЦНС подробно суммированы в ряде недавних обзоров, часть из которых вышла к 100-летию открытия инсулина Бантингом и Бестом [113, 114, 115, 116, 117]. Условно, эффекты, опосредуемые инсулиновым рецептором в ЦНС, можно подразделить на две категории: (а) инсулиновый рецептор активируется в ЦНС и биологический эффект ограничивается ЦНС, и (б) инсулиновый рецептор активируется в ЦНС, но биологические эффекты наблюдаются также и в периферических тканях.

Первая категория эффектов включает активацию регуляцию нейронального компонента в системах обоняния и зрения, защиту нейронов к действию повреждающих факторов, поддержание стабильности нейрональной сети, поддержание энергетического метаболизма мозга, особенно в условиях повышенной потребности в энергии, а также регуляцию нейропластичности. Все эти эффекты широко обсуждаются в научной литературе в контексте роли инсулина в механизмах формирования памяти и роли инсулина как нейропротектора при нейродегенеративных заболеваниях (деменция), психиатрических заболеваниях (депрессия, тревожность, шизофрения, аутизм, дефицит внимания и гиперактивность), а также при острых состояниях типа черепно-мозговой травмы и ишемического инсульта.

Вторая категория эффектов включает эффекты инсулина в гипоталамусе, влияющие на продукцию глюкозы в печени, липогенез и липолиз, аппетит, расход энергии периферическими тканями, потребление пищи, поддержание температуры тела, выделение гормонов; а также эффекты инсулина в обонятельной системе, влияющие на чувствительность к пищевым запахам и связанный с этим аппетит. Эта часть эффектов центрального инсулина обсуждается в научной литературе в контексте метаболических заболеваний, таких как метаболический синдром, ожирение и диабет 2 типа, а также коморбидных состояний с наличием одновременно диабета 2 типа и депрессии, тревожности или болезни Альцгеймера (БА).

1.6 Окислительный сигнал инсулина

Расшифровка Хаббардом и его коллегами структуры неактивной формы рецепторной тирозинкиназы ИР [80] породила вопрос – каким образом происходит фосфорилирование петли активации в условиях активации инсулинового рецептора, если доступ донора фосфата АТФ в активный центр киназы пространственно запрещен? Классическое для других рецепторных киназ объяснение, что фосфорилирование ИР может происходить путем трансфосфорилирования не отвечает на этот вопрос, так как для трансфосфорилирования также нужен донор фосфата АТФ, доступ которого к активному центру киназы в инсулиновом рецепторе и в этом случае также запрещен. С учетом этих соображений Дреге и его коллеги в 1998 г. представили ряд доказательств, что существует еще одна промежуточная реакция в процессе активации ИР, которую они назвали окислительно-восстановительное праймирование (redox priming) [86, 87]. Дреге показал, что экзогенные окислители, такие как перекись водорода (H_2O_2), облегчали, а экзогенные восстановители и антиоксиданты, напротив, ингибировали индуцированное инсулином фосфорилирование ИР в экспериментах *in vitro* [86]. Окислительная модификация рецептора по остаткам цистеина была предложена в качестве структурной основы праймирования, так как неокисляемый мутант ИР, полученный заменой остатка цистеина С1126 (нумерация ИР-А) на аланин в составе β -цепи инсулинового рецептора, показал дефектное фосфорилирование в условиях стимуляции инсулином [87]. С1126 расположен в непосредственной близости от каталитического аспартата D1120, и его окислительная модификация теоретически могла бы повлиять на доступ к АТФ к активному центру киназы, но это не было доказано. Несмотря на наличие ряда фактов в пользу гипотезы окислительного праймирования как составной части процесса активации киназы инсулинового рецептора, эта гипотеза не получила последующего развития, так как не было представлено прямых доказательств того, что такое праймирование действительно имеет место в процессе активации инсулинового рецептора в отсутствие

экзогенных окислителей и что существует связь между таким праймированием и фосфорилированием рецептора в физиологических условиях.

При исследовании эффектов инсулина в жировой ткани в 70-х годах двадцатого века было обнаружено, что инсулин стимулирует выброс эндогенной H_2O_2 адипоцитами [88, 89], а позднее был найден инсулин-чувствительный источник H_2O_2 в адипоцитах – никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза 4 ($Nox4$) [90]. Инсулин-индуцированная H_2O_2 в адипоцитах и клетках гепатомы человека ингибирует протеинтирозинфосфатазу РТРВ1, которая дефосфорилирует и инактивирует инсулиновый рецептор [90, 343, 344], что указывает на сигнальную роль инсулин-индуцированной H_2O_2 в адипоцитах. В целом, роль инсулин-индуцированной H_2O_2 (окислительного сигнала инсулина) как положительного регулятора инсулиновой сигнализации вполне установлена для адипоцитов, однако ничего неизвестно о существовании и роли такой окислительной сигнализации инсулина в ЦНС.

1.7 Инсулиновая резистентность

Родоначальниками концепции инсулиновой резистентности являются Химсворт и Керр, которые в 1939 г. впервые использовали термин «нечувствительность к инсулину» для обозначения относительно менее выраженного эффекта экзогенного инсулина на уровне глюкозы в крови у диабетических пациентов с ожирением по сравнению со здоровым контролем [118]. В следующем году, Рут и Карпентер использовали синонимичный термин «инсулиновая резистентность» для описания состояний диабетических пациентов с нарушенной эффективностью действия инсулина [119]. До 90-х годов двадцатого века концепция инсулиновой резистентности применялась только к взаимоотношениям инсулина и глюкозы. Однако, на основе накопленных знаний в этой области конференция по выработке консенсуса в отношении инсулиновой резистентности, состоявшаяся в 1997 г., определила инсулиновую резистентность как нарушение любого биологического ответа на экзогенный или эндогенный

инсулин [120]. Особо было отмечено, что указанный биологический ответ не обязательно связан только с метаболизмом глюкозы, но может отражать, в теории, любые процессы, в том числе метаболические процессы (углеводный, липидный или белковый метаболизм) и митогенные процессы (рост, дифференцировку тканей, синтез ДНК, регуляцию транскрипции генов). Фактически, новое определение вывело термин «инсулиновая резистентность» за пределы эндокринологии и разрешило его использование для характеристики состояний, не связанных с ожирением, метаболическим синдромом и диабетом 2 типа.

Открытие инсулиновых рецепторов в ЦНС и последующие исследования привели к обнаружению феномена центральной инсулиновой резистентности, которая характеризуется нарушением биологических ответов на экзогенный или эндогенный инсулин в ЦНС [121, 122]. Современные гипотезы рассматривают центральную инсулиновую резистентность, иногда называемую инсулиновой резистентностью мозга, как важный фактор в патогенезе ряда заболеваний ЦНС, таких как болезнь Альцгеймера и другие деменции [123], болезнь Паркинсона [124], ишемический инсульт [125], депрессия [126] и черепно-мозговая травма [127].

Центральная инсулиновая резистентность необязательно сопровождается инсулиновой резистентностью в периферических тканях и может развиваться как независимый процесс, что было доказано, например, при болезни Альцгеймера [99]. В то же время, при метаболических заболеваниях, таких как ожирение и диабет 2 типа, центральная и периферическая инсулиновая резистентность наблюдаются вместе [128].

В теории, любое нарушение на уровне передачи сигнала инсулинового рецептора в сигнальных путях, а также нарушение на уровне экспрессии генов, синтеза белка или любое другое нарушение, которое ведет к снижению биологического ответа на инсулин, может рассматриваться как причина инсулиновой резистентности. Однако, в научной литературе обычно рассматриваются две основные причины центральной инсулинорезистентности: (1)

нарушение в активации инсулинового рецептора в ответ на инсулин и (2) нарушение в передаче сигнала инсулина в нижележащих сигнальных путях, происходящее в основном на уровне IRS белков.

Исследования в этой области обычно связаны с изучением патогенетических механизмов возникновения и развития отдельных заболеваний ЦНС, но наибольший прогресс в исследованиях центральной инсулиновой резистентности был достигнут при изучении болезни Альцгеймера (БА).

1.8 Инсулиновая резистентность и болезнь Альцгеймера

Концепция резистентности мозга к инсулину впервые была предложена Хойером в 1998 г. как одно из объяснений гипометаболизма глюкозы, наблюдаемого у пациентов с БА [129]. В качестве одной из причин сниженного ответа на инсулин в мозге было выявлено падение плотности компонентов сигнальной системы инсулина в мозге у некоторых категорий больных БА. Исследование де ла Монте и ее коллег показало снижение уровней экспрессии мРНК и белка инсулина, инсулиновых рецепторов, снижение общей экспрессии мРНК IRS1, а также снижение других индикаторов сигнальной активности инсулина в образцах мозга, выделенных посмертно у больных с деменцией по сравнению с контрольными образцами мозга от здоровых людей того же возраста [130]. Позднее, эти же исследователи продемонстрировали наличие связи между нарушениями инсулиновой сигнализации в мозге со степенью тяжести БА по Брааку, причем увеличение тяжести по Брааку сопровождалось прогрессивным снижением уровней мРНК инсулина и рецептора инсулина, снижением уровней аденозинтрифосфата (АТФ) и снижением экспрессии холинацетилтрансферазы (ХАТ) [131].

Снижение экспрессии синаптического субстрата инсулинового рецептора IRSp53 было выявлено как одно из проявлений болезни Альцгеймера, причем только IRSp53 был снижен из девяти основных белков постсинаптической плотности у пациентов с БА [132].

Ключевая работа Тэлбота, Арнольда, и их коллег, опубликованная в 2012 г., впервые предоставила прямые доказательства существования центральной инсулиновой резистентности у человека как нарушения инсулиновой сигнализации на уровне инсулинового рецептора и нижележащих сигнальных путей [99]. Инсулинорезистентность выражалась в том, что одна и та же концентрация инсулина 1 нМ вызывала пониженное на 26-29% фосфорилирование петли активации (Y1146, Y1150, Y1151) рецептора и на 34-58% фосфорилирование сайта связывания IRS1 (Y960) рецептора (изоформа А) в образцах мозга, выделенных посмертно из коры и гиппокампа больных с БА, чем в сопоставимых контрольных образцах, выделенных из мозга здоровых людей того же возраста. При этом содержание рецепторов ИР-А в образцах не отличалось между группами. Помимо относительного снижения способности рецептора к активации, резистентность наблюдалась во всем нижележащем сигнальном каскаде и выражалась как относительное снижение к контролю уровня фосфорилирования сигнальных молекул, в том числе IRS1 на 90% (pY), Akt1 на 89% (pS473), GSK-3 β на 76% (pY216), GSK-3 β на 83% (pS9), mTOR на 74% (pS2448) и ERK2 на 90% (pT185/pY187). При этом общие уровни сигнальных молекул ИР β , IRS1, IRS2, Akt1, GSK3 β , mTOR и ERK2 не отличались между группами. Опираясь на полученные результаты, авторы сделали вывод, что центральная инсулиновая резистентность при БА может возникать на уровне сигнальной системы инсулина как относительное снижение уровня содержания активных (фосфорилированных) форм сигнальных молекул по сравнению с нормой. Наиболее интересный результат исследования состоит в том, что относительное снижение фосфорилирования инсулинового рецептора не было связано с дефосфорилированием рецептора, так как содержание тирозинфосфатазы PTP1B, дефосфорилирующей инсулиновый рецептор, в образцах мозга не отличалось между группами. Из чего авторы сделали вывод, что сниженное фосфорилирование инсулинового рецептора не связано с активностью протеинтирозинфосфатаз, а является результатом сниженной по неизвестной причине чувствительностью рецептора к инсулину.

До работы Тэлбота снижение на 80% фосфорилирования ИР-А в ответ на инсулин (50 нМ) по сравнению с нормой было показано в культурах нейронов коры и гиппокампа крысы, инкубированных в присутствии олигомеров β -амилоида ($A\beta$) [133]. Авторы обнаружили, что эффект $A\beta$ опосредуется активацией NMDAR и входом ионов Ca^{2+} в нейрон, так как глутамат усиливал эффект $A\beta$, ингибиторы NMDA рецептора мемантин и APV, напротив, снижали негативные эффекты $A\beta$ и глутамата, а быстрый хелатор Ca^{2+} ВАРТА-АМ полностью предотвращал негативный эффект $A\beta$ на фосфорилирование ИР-А. Важность этой работы состоит в том, что впервые была обнаружена связь между пониженным фосфорилированием (активацией) ИР-А в нейронах и эксайтотоксичностью и повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , хотя механизм негативного влияния высоких концентраций Ca^{2+} на активность рецептора не был установлен.

1.9 Инсулиновая резистентность и болезнь Паркинсона

Относительно более высокое содержание фосфорилированного по остаткам серина pS312 белка IRS1, одного из маркеров инсулиновой резистентности, было обнаружено в черной субстанции мозга у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению с контролем, причем наблюдалась высокая степень совместной локализации pS312-IRS1 и телец Леви [134]. Более высокая интенсивность окрашивания pS312-IRS1 в черной субстанции наблюдалась у крыс с вирусно-опосредованной экспрессией мутантного альфа-синуклеина человека A53T (модель болезни Паркинсона), чем в контрольной группе [134]. Однако, вопрос о прямой связи между инсулиновой резистентностью в черной субстанции и развитием собственно болезни Паркинсона остается открытым, так как признаков центральной инсулиновой резистентности в отсутствие когнитивных нарушений у этих пациентов не обнаруживается [135].

1.10 Инсулиновая резистентность и черепно-мозговая травма

Было показано, что черепно-мозговая травма (ЧМТ) вызывает острую центральную резистентность у мышей C57Bl/6, которая исчезает в течение 7 дней после однократной травмы, но сохраняется до 28 дней после повторного травмирования [136]. Инсулиновая резистентность в этой работе оценивалась как *ex vivo* фосфорилирование (активация) Акт киназы в ответ на инсулин в образцах мозга мышей, выделенных после ЧМТ в сравнении с ложнооперированным контролем.

ЧМТ вызывает хроническую синаптическую инсулиновую резистентность, что было продемонстрировано как относительное снижение уровня фосфорилирования петли активации инсулинового рецептора pY1150/1151 (нумерация IP-A) в ответ на инсулин в синапсосомах, выделенных из гиппокампа крыс Sprague-Dawley после ЧМТ, по сравнению с ложнооперированным контролем [137]. Резистентность сохранялась в течение всего срока наблюдений 3 месяца, при неизменной плотности инсулиновых рецепторов в первый месяц и компенсаторном повышении к концу наблюдений.

Исследование с использованием микро-позитронно-эмиссионной томографии/компьютерной томографии (микро-ПЭТ/КТ) показало, что после трехкратной легкой ЧМТ у мышей наблюдалось снижение метаболизма глюкозы в коре, гиппокампе и мозжечке, а также значительный двигательный и когнитивный дефицит по сравнению с однократной ЧМТ и ложнооперированными животными [138].

Исследование на небольшой группе пациентов с ЧМТ средней или тяжелой степени ($n = 60$) в сравнении со здоровым контролем ($n = 60$) показало, что инсулиновая резистентность, оцениваемая по индексу НОМА-IR, встречалась в 46,7% случаев пациентов с ЧМТ, что более, чем в два раза, превышало распространенность инсулиновой резистентности в контроле (18,33%; $p = 0,002$) [139].

Еще одно исследование пациентов с ЧМТ средней и тяжелой степени тяжести ($n = 85$) показало, что наличие инсулиновой резистентности (значение индекса $\text{НОМА2} \geq 1,4$) было значимым фактором неблагоприятного прогноза через 6 месяцев после ЧМТ по шкале Глазго (отношение шансов 3,25 (1,03-10,31), $p = 0,041$), исходя из чего авторы сделали вывод, что улучшение нарушенной чувствительности к инсулину может быть потенциальной терапевтической стратегией для лечения пациентов с ЧМТ [140].

В совокупности эти работы указывают на вклад центральной инсулиновой резистентности в неблагоприятный прогноз после ЧМТ.

1.11 Ишемический инсульт и постинсультная инсулиновая резистентность

Ишемический инсульт – это эпизод неврологической дисфункции, вызванный фокальным инфарктом головного мозга (некрозом вещества головного мозга). Недавний систематический анализ показал, что до пандемии COVID-19, в 2019 г. инсульт оставался второй по значимости причиной смерти (11,6%) и третьей по значимости причиной вместе взятых смерти и инвалидности (5,7%) в 204 странах и территориях [141]. С 1990 по 2019 г. абсолютное число случаев инсульта увеличилось на 70,0%, распространенных инсультов увеличилось на 85,0%, а смертность от инсульта увеличилась на 43,0% при том, что за тот же период стандартизированные по возрасту показатели заболеваемости инсультом снизились на 17,0%, распространенность снизилась на 6,0%, а смертность снизилась на 36,0%, (5,0–7,0). Прирост произошел за счет увеличения распространенности инсульта среди лиц моложе 70 лет. Ишемический инсульт составил в среднем 62,4% всех случаев инсульта в 2019 г. Выделяют следующие клинические периоды инсульта: острейший период от дебюта инсульта до 3 суток, острый период – до 28 суток, ранний восстановительный период – до 6 месяцев, поздний восстановительный период – до 2 лет, период остаточных явлений – после 2 лет [142] (Рисунок 4).



Рисунок 4 - Клинические периоды ишемического инсульта.

В острейшем периоде ишемического инсульта падение кровотока в регионе мозга вследствие тромба, эмболии или спазма ведет последовательно к гипоксии в зоне ишемии, эксайтотоксичности вследствие массового выброса глутамата и аспартата, реперфузии после растворения сгустка с массовым выбросом активных форм кислорода и началу воспалительного ответа микроглии с выбросом провоспалительных цитокинов, что в совокупности ведет к гибели клеток мозга и образованию зоны некроза (инфаркта мозга) [143, 144].

Нормальный средний мозговой кровоток у взрослого человека составляет около 50 мл/100 г/мин [145], снижение которого ведет к ишемии, последствия которой зависят от степени снижения [143, 146]. Первоначально снижение кровотока вызывает обратимые изменения метаболизма, а именно снижение синтеза белка и экспрессии генов, повышение анаэробного гликолиза и концентрации лактата в ткани мозга. Двукратное и более падение кровотока от нормы ведет к падению уровней фосфокреатина и АТФ, нарушению ионного гомеостаза Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , массовому выбросу глутамата, деполяризации внутренней мембраны митохондрий, окислительному стрессу и активации ферментов (протеазы, липазы, NO синтазы), что в совокупности вызывает гибель

нейронов (инфаркта мозга). Два пороговых значения кровотока выделяют в связи с церебральной ишемией – снижение кровотока в три раза от нормы до уровня 16–18 мл/100 г в минуту ведет к потере электрической функции нейронов; а падение кровотока в пять раз до порогового уровня 10–12 мл/100 г в минуту ведет к инфаркту мозга [146]. В целом, патологический процесс, приводящий к инфаркту мозга в острейшей фазе инсульта, является крайне сложным. Однако, ключевым и наиболее широко признанным триггером гибели нейронов при возникновении инсульта считается массовое появление внеклеточного глутамата и связанная с этим глутаматная эксайтотоксичность [143, 144].

Глутамат – основной возбуждающий нейротрансмиттер, который синтезируется и хранится в пре-синаптических везикулах возбуждающих синапсов, откуда выделяется в синаптическую щель в ответ на нейрональную активность. Эффекты глутамата опосредуются различными типами рецепторов: ионотропными глутаматными рецепторами, включающими AMPAR, NMDAR и каинатные рецепторы, а также метаботропными глутаматными рецепторами (mGluR) [147]. Ионотропные рецепторы AMPAR и NMDAR наиболее широко представлены в постсинаптической плотности и могут регулировать ионные токи в миллисекундной временной шкале [148]. Функциональные колебания концентрации глутамата в синаптической щели в ответ на нейрональную активность характеризуются острым пиком около 1 мМ в интервале около 1,2 мс [148]. Потенциал действия 10 мс вызывает быстрое повышение концентрации глутамата в синаптической щели более 1 мМ с возвращением к уровню менее 20 нМ из-за поглощения глутамата нейронами и глиальными клетками [149].

Глутаматная эксайтотоксичность была обнаружена в 50-х годах двадцатого века, когда Хайяши показал, что инъекция глутамата в кору мозга млекопитающих вызывает клонические судороги [150], а Лукас и Ньюхаус нашли, что парентеральное введение глутамата способно вызвать частичный некроз сетчатки глаза у мышей [151]. Ранние работы по нейротоксичности глутамата и его роли в ишемическом повреждении мозга суммированы в обзоре 1985 г., где уже тогда был

сделан вывод о необходимости создания терапии, блокирующей постсинаптические эффекты глутамата для лечения ишемического инсульта [152], что инициировало множество исследований в этом направлении, но не привело за 40 лет к созданию эффективного препарата.

Динамика изменений концентраций глутамата в плазме крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) изучалась у пациентов после ишемического инсульта ($n = 184$) против здорового контроля ($n = 43$) и было показано, что средняя концентрация глутамата в СМЖ у пациентов с инсультом в два раза выше, чем в контроле ($p < 0,0001$), причем среди пациентов средний уровень глутамата был значимо выше у пациентов с прогрессирующим инсультом, чем у пациентов со стабильным инсультом, 12,5 мкМ и 4,0 мкМ, соответственно ($p < 0,0001$) [153]. У пациентов со стабильным инсультом уровень глутамата в СМЖ был высоким первые часы после инсульта и возвращался к норме через 6 часов, тогда как уровень глутамата в СМЖ у пациентов в группе прогрессирующего инсульта был постоянно выше нормы все первые 24 часа после инсульта. Эти данные, хотя и не позволяют прямо оценить динамику глутамата в зоне инсульта, тем не менее указывают на связь концентраций глутамата и тяжести инсульта в острейшем периоде.

Средний уровень глутамата в СМЖ пациентов с полушарным ишемическим инсультом ($n = 110$) зависит от тяжести инсульта и имеет прогностическое значение [154, 155]. В первые 6 часов после инсульта уровень глутамата в СМЖ в среднем в 8 раз, а в подгруппе умеренно-тяжелого инсульта в 18 раз превышал уровни у здорового контроля, и падал в следующие 12 часов. В группе пациентов с тяжелым инсультом уровень глутамата в СМЖ повышался первые 24 часа с тенденцией к снижению к 3 дню.

Двукратно повышенный уровень глутамата в спинномозговой жидкости был обнаружен у 128 пациентов в первые 24 часа после ишемического инсульта с подтвержденным КТ инфарктом мозга по сравнению со здоровым контролем, при этом концентрация глутамата была значительно выше у больных с обширными

церебральными инфарктами и у больных с более высокой степенью неврологического дефицита [156, 157].

Высокий уровень глутамата в коре головного мозга, превышающий более, чем в 300 раз норму, определялся методом микродиализа в течение 6 дней после инсульта в коре головного мозга пациента с массивным инфарктом мозга вследствие окклюзии внутренней сонной артерии [158].

В еще одном исследовании с медианой поступления пациентов в госпиталь через 6,3 часа после ишемического инсульта или транзиторной ишемической атаки, со средней суммой баллов 4 по шкале NIHSS, не было выявлено значимых различий в уровнях глутамата в СМЖ между пациентами ($n = 89$) и здоровым контролем ($n = 31$), что не противоречит результатам других исследований, где уровень глутамата в СМЖ падал уже к 6 часам после инсульта.

Согласно многочисленным исследованиям, массовое повышение концентрации внеклеточного глутамата в острейшей фазе ишемического инсульта происходит в связи с так называемой аноксической деполяризацией, когда из-за падения парциального давления кислорода и прекращения поступления глюкозы в зону ишемии снижается синтез АТФ, уровень АТФ падает и начинаются нарушения ионного гомеостаза. Мозг имеет массу около 2% от массы тела, но при этом потребляет до 20% кислорода из-за того, что основным производителем АТФ в нейронах являются митохондрии [159]. Основная доля АТФ в мозге потребляется ионными насосами, встроенными в плазматические мембраны и мембраны внутриклеточных органелл нейронов для того, чтобы поддерживать или восстанавливать ионные ингредиенты между различными компартментами в периоды нейрональной активности [159, 160]. АТФ используется для обеспечения активности Na^+/K^+ -АТФазы (НКА) [161], Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума [162] и H^+ -АТФазы пресинаптических везикул [163]. НКА является основным потребителем АТФ, поддерживая низкую внутриклеточную концентрацию Na^+ и создавая возможность для передачи электрических сигналов. При ишемии активность НКА падает из-за снижения

синтеза АТФ, что ведет к накоплению внутриклеточного Na^+ [164]. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCX), в физиологических условиях отвечающий за удаление кальция из клетки, из-за массового накопления внутриклеточного Na^+ при ишемии начинает действовать в обратном режиме, обменивая внутриклеточный Na^+ на внеклеточный Ca^{2+} , что ведет к накоплению Ca^{2+} в пре-синаптическом терминале нейрона и вызывает массовое Ca^{2+} -зависимое высвобождение глутамата из пресинаптических везикул [165]. Помимо NCX в высвобождении пре-синаптического глутамата участвуют другие источники Ca^{2+} , например, потенциал-зависимые кальциевые каналы (VGCC), которые обеспечивают постоянный приток Ca^{2+} из-за коллапса ионного градиента в условиях ишемии [166, 167]. Следует отметить, что нейроны – это не единственный источник внеклеточного глутамата и астроциты также могут служить источником внеклеточного глутамата при ишемии [168].

Центральным событием в развитии эксайтотоксичности считается активация глутаматом NMDAR, что вызывает массовый приток Na^+ и Ca^{2+} в пост-синаптические терминалы нейронов [169, 170, 171, 172, 173]. Эксперименты *in vitro* на первичных культурах нейронов показали, что воздействие глутамата вызывает начальное быстрое увеличение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), за которым следует вторая волна более значительного увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с одновременным снижением потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) [169, 171, 174, 175, 176, 177]. Необратимое вторичное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может происходить с задержкой от нескольких минут до двух часов (лаг-период) и получило название «отсроченная кальциевая перегрузка» [175] или «отсроченная кальциевая дерегуляция» (ОКД) [176]. ОКД постулируется как точка невозврата в эксайтотоксичности – считается, что события, происходящие после начала ОКД, могут влиять на время гибели клеток, но не могут отменить ее неизбежности [170]. ОКД возникает, когда массивный приток Ca^{2+} больше не уравновешивается оттоком Ca^{2+} , что связано с переключением плазматического $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника на реверсивный режим работы и перенаправлением потока Ca^{2+} в клетку [176, 177]. ОКД и другие компоненты эксайтотоксичности глутамата, которые следуют за

ОКД, такие как деполяризация митохондрий, открытие переходных пор митохондриальной проницаемости, продукция окиси азота, а также активация фосфолипаз и протеаз, в совокупности приводят к гибели нейронов [178, 179, 180].

В фазе реперфузии, повышенная активность NMDAR ведет к появлению активных форм кислорода (АФК), в основном супероксид-анион радикала $O_2^{\cdot-}$ и перекиси водорода H_2O_2 , продуцируемых респираторной цепью митохондрий [181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188] и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) оксидазой 2 (NOX2) [189, 190, 191, 192, 193]. Основным продуцентом АФК в условиях глутаматной эксайтотоксичности является NOX2 [194], но повышение концентрации $O_2^{\cdot-}$ в митохондриальном компартменте может вносить даже больший вклад в гибель нейронов из-за высокой ингибирующей способности $O_2^{\cdot-}$ в отношении аконитазы, фермента цикла трикарбоновых кислот, участвующего в многостадийном процессе синтеза АТФ в митохондриями [194].

Острейшая фаза ишемического инсульта также характеризуется началом воспалительного ответа микроглии в зоне инфаркта, который активируется с появлением молекул из поврежденных или мертвых клеток, так называемых связанных с повреждением молекулярных паттернов (DAMPs), в том числе аденозина, белков теплового шока, белка бокс 1 группы высокой подвижности (HMGB1). Эти паттерны распознаются соответствующими рецепторами врожденной иммунной системы и активируют канонический путь активации ядерного фактора κB (NF- κB), который ведет к экспрессии множества генов, в том числе провоспалительных цитокинов, запуская начальную фазу воспаления [195].

Фармакологические подходы к снижению глутаматной токсичности разрабатывались в течение многих лет, но не привели к появлению препарата для лечения ишемического инсульта [196]. Антагонисты NMDAR, включая конкурентные, неконкурентные и частичные антагонисты, не показали эффективности в крупных контролируемых клинических испытаниях [197, 198, 199, 200, 201, 202]. Во всех указанных клинических исследованиях введение антагониста NMDAR начиналось не ранее 6 часов с начала инсульта и

продолжалось в течение от 4 недель до 3 месяцев, то есть за пределами острого периода эксайтотоксичности, что указывает на неудачный в целом выбор дизайна этих исследований.

Основным доказанным подходом к лечению ишемического инсульта в острейшем периоде является внутривенная тромболитическая терапия, которая показана пациентам с верифицированным ишемическим инсультом в случае, если время от появления первых симптомов заболевания до момента начала лечения не превышает 4,5 часов («терапевтическое окно») [203]. Систематический обзор 2014 г., включивший 27 испытаний с участием 10187 человек, в которых тестировали урокиназу, стрептокиназу, рекомбинантный тканевый активатор плазминогена, рекомбинантную проурокиназу или десмотеплазу показал, что тромболитическая терапия, назначаемая в первые часы после инсульта, значительно снижала долю пациентов с ишемическим инсультом, которые умерли или имели высокую зависимость по шкале Рэнкина через три и шесть месяцев после инсульта, причем лечение в течение трех часов после инсульта было наиболее эффективным [4]. В то же время тромболитическая терапия связана со значительным превышением смертности в течение первых 7-10 дней от внутримозговых кровоизлияний.

В остром периоде ишемического инсульта происходит отсроченная гибель нейронов вследствие активации механизмов апоптоза и нейровоспаления. Инсульт запускает несколько путей апоптоза, строго регулируемой формы гибели клеток, в том числе внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный) пути [204]. Внешний путь апоптоза запускается активацией рецепторов («death receptors») на поверхности плазматической мембраны лигандами TNF- α , FasL и TRAIL. Внутренний путь представляет собой независимый от рецепторов сигнальный каскад, вызываемый избыточным притоком Ca^{2+} в нейрон и последующей активацией фермента калпаина, который инициирует последовательность событий, ведущих к открытию переходных пор митохондриальной проницаемости и высвобождению проапоптотических факторов. В совокупности оба пути, внешний и внутренний, запускают каспазный каскад, приводящий к апоптотической гибели

клеток. Белок p53 активируется в ишемических зонах мозга и вызывает апоптоз через множество нижележащих посредников, которые все действуют на внутренние митохондриальные пути апоптоза [204].

Нейровоспаление активно развивается в острой фазе инсульта, поддерживаемая высвобождением молекул DAMP из поврежденных или мертвых тканей мозга. Молекулы DAMP распознаются соответствующими рецепторами врожденной иммунной системы и активируют канонический путь активации ядерного фактора κB (NF- κB), приводящий к экспрессии множества генов, в том числе провоспалительных цитокинов, хемокинов и других медиаторов воспаления, запускающих процесс, направленный на ликвидацию последствий повреждения ткани мозга, но также способных усугубить тяжесть поражения. Динамика молекулярного и клеточного иммунного ответа в острой фазе инсульта включает помимо появления ранних медиаторов воспаления интерлейкинов 1β (IL- 1β) и 18 (IL-1) и миграции нейтрофилов в зону ишемии также высвобождение внеклеточного HMGB1 и инфильтрацию моноцитов и лимфоцитов [205].

Белок HMGB1 играет роль важного повреждающего фактора при инсульте, способного усилить воспаление и активировать воспалительный каскад коагуляции после секреции во внеклеточное пространство и связывание с рецепторами TLR4 и RAGE [206]. Источником внеклеточного HMGB1 в зоне ишемии в острейшей фазе инсульта служат погибшие клетки и активный выброс тромбоцитами и нейтрофилами, а в острой фазе инсульта он активно выделяется клетками в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами и интерферонами. После инсульта повышенные концентрации HMGB1 в плазме крови определяются до 30 суток [207]. Согласно системному обзору и мета-анализу 2018 г. (28 исследований), включившему 2671 пациентов с инсультом и 1826 здоровых добровольцев, пациенты с инсультом имели более высокие уровни HMGB1 в крови, чем здоровые добровольцы, причем более высокие значения HMGB1, в том числе и в остром периоде инсульта, наблюдались у более тяжелых больных с большим объемом инфаркта мозга [208].

Острейший и острый периоды инсульта, когда происходит гибель клеток мозга и на этой основе возникает неврологический дефицит, сменяется в раннем восстановительном периоде процессами ограниченного восстановления функций. Возможность такого восстановления связана с нейрональной пластичностью (нейропластичностью), всеобщее определяемой как способностью мозга к реорганизации своей структуры, функций и связей на многих уровнях, включая молекулярный, клеточный, системный и поведенческий, и установлению новых нейрональных связей взамен утраченных [209].

Нейропластичность мозга после инсульта максимальна в период так называемого спонтанного биологического восстановления, который длится начиная с первой недели и до окончания первого месяца после экспериментального инсульта у грызунов и до окончания 3 месяцев после ишемического инсульта у человека [211, 212]. Восстановление связано с ростом аксонов в пери-инфарктной зоне [213, 214, 215], образованием синапсов [216] и восстановлением плотности дендритных шипиков в пери-инфарктной зоне [217, 218]. Экспериментальный инсульт приводит к массовой потере дендритных шипиков в пери-инфарктной зоне с максимумом потери по одним данным на 4 сутки [217], а по другим на 7 сутки [218]. Снижение плотности шипиков сначала компенсируется изменением формы и длины оставшихся шипиков [219]. Плотность шипиков постепенно нормализуется за счет образования новых шипиков на 16-32 сутки [217] или на 42 сутки после инсульта [218], в зависимости от выбранной модели инсульта, причем скорость восстановления плотности дендритных шипиков тесно связана с восстановлением уровнем кровотока в этой зоне [217]. Период спонтанного биологического восстановления рассматривается как «терапевтическое окно» для проведения реабилитационных мероприятий, направленных на восстановление двигательной активности и речи [220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227], при этом особо выделяют еще более короткий период от семи дней до окончания первого месяца после инсульта, когда ожидаемый эффект от терапии может быть максимальным [212]. За пределами 3 месяцев восстановление функций все еще возможно, но требует

интенсивной нейрореабилитационной терапии и усилий со стороны пациента [228, 229].

Молекулярно-биологические механизмы в периоде спонтанного биологического восстановления после инсульта имеют сходство с так называемым критическим периодом в нормальном развитии первых лет жизни человека, когда происходит легкое овладение языком в лингвистически богатой среде [230]. Повышенная пластичность стимулируется холинергической передачей сигналов как в критическом периоде развития [231], так и в периоде восстановления взрослого мозга после поражения [232]. Усиление экспрессии ингибитора роста нейритов Nogo-A [233, 234] и активация ГАМКергической системы [235, 236, 237] приводит к прекращению обоих периодов высокой пластичности мозга. Однако, подавление возбуждающей нейротрансмиссии в мозге после инсульта существенно отличает восстановительный период после инсульта от критического периода развития. Ишемия положительно влияет на экспрессию генов нейротрофинов BDNF, NGF и NT3, а также их рецепторов TrkB, TrkA и TrkC, которые предположительно способствуют нейропластичности и последующему восстановлению нервной ткани [238]. Следует отметить, что рецепторы нейротрофинов принадлежат к семейству инсулинового рецептора и активируются тем же самым способом, через фосфорилирование трех критических тирозинов в консервативной последовательности YXTDYY петли активации рецептора и открытия доступа к каталитическому остатку аспартата в консервативной последовательности HRDLA [239].

На экспериментальной модели ишемического инсульта с 90-минутной окклюзией средней мозговой артерии было показано снижение на 10–45% плотности NMDA рецепторов не только в пери-инфарктной зоне, но и в областях мозга, контралатеральных очагу поражения, причем это снижение сохранялось до 30 суток после инсульта [240]. Снижение экспрессии мРНК NR1, субъединицы NMDA рецептора, наблюдалось в области ишемии сразу после инсульта в интервале 1,5–24 часа [241]. Длительное отсроченное снижение плотности NMDA

рецепторов наблюдалось после краткосрочной церебральной ишемии без признаков гибели нейронов [242]. Вместе эти результаты свидетельствуют о дефиците возбуждающей нейротрансмиссии в раннем восстановительном периоде после инсульта, причем широко распространенная и стойкая потеря функции рецептора NMDA коррелирует с характером неврологического и когнитивного дефицита. В подтверждение этого, введение крысам непрямого агониста NMDA рецептора D-циклосерина через 24 ч после начала инсульта с целью снятия дефицита возбуждающей нейротрансмиссии привело к длительному (>1 месяца) улучшению неврологической функции и функции памяти без влияния на объем инфаркта мозга [243], что в целом согласуется с известной важной ролью сигнализации NMDAR в регуляции пластичности мозга, обучения и формирования памяти, а также в выживании нейронов [244, 245, 246]. В целом, нейрореабилитация в раннем восстановительном периоде требует восстановления возбуждающей нейротрансмиссии, а не ее подавления, как в острейшем и остром периоде инсульта, когда возбуждающая нейротрансмиссия доходит до уровня эксайтотоксичности и является ключевой причиной гибели нейронов. Технологии нейрореабилитации в восстановительном периоде активно развиваются и включают такие методы стимуляции, как физические упражнения, электрическую и магнитную стимуляцию, сенсорную стимуляцию [247, 248]. Фармакологические подходы основаны на проверке эффективности уже зарегистрированных препаратов, таких как леводопа, флуоксетин, ниацин, инозин и цитихолин [249] и создании новых препаратов с учетом биологических механизмов нейропластичности [230].

Следует отметить, что научная литература, посвященная исследованиям процессов нейропластичности в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта, не является обширной и не содержит каких-либо сведений об участии нейронального инсулинового рецептора в процессах нейропластичности после инсульта. В то же время имеются многочисленные данные о ключевой роли этого рецептора в процессах нейропластичности мозга. IGF2 запускает взрослый

нейрогенез в субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга через активацию только и исключительно изоформы А инсулинового рецептора [75, 76], причем как экспрессия IGF2 в мозге [78, 79], так и взрослый нейрогенез особенно усиливаются после ишемического инсульта, когда вновь образовавшиеся нейробласты и клетки-предшественники олигодендроцитов мигрируют из субвентрикулярной зоны к границе зоны ишемии, где они вовлекаются в процесс постинсультной регенерации [77]. Помимо этого, инсулиновый рецептор в мозге регулирует процессы нейропластичности, в том числе рост аксонов и нейритов, число синапсов, синаптическую и дендритную пластичность [37, 38, 39, 40, 41, 42, 112]. В совокупности эти факты указывают, что сигнализация инсулинового рецептора может играть важную роль в восстановлении функций мозга в ранний восстановительный период после инсульта.

Вопрос о существовании связи между инсулиновой резистентностью и риском инсульта интенсивно изучался последние сорок лет, но привел к противоречивым результатам, как полагают, из-за гетерогенности популяций в испытаниях, так как в большинство исследований включались лица как с диабетом, так и без диабета. В некоторых работах был сделан вывод, что инсулиновая резистентность может быть фактором риска инсульта [250, 251, 252]. Однако, большое исследование, включавшее 5234 участника старше 55 лет, без сахарного диабета, показало, что уровни инсулина в плазме натощак или гомеостатический индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR) никак не связаны с риском инсульта любого типа, включая ишемический инсульт [253]. Недавний мета-анализ, включивший семь исследований с общим числом участников 36343, также не обнаружил связи между индексом инсулиновой резистентности НОМА-IR и риском инсульта у лиц без сахарного диабета [254]. В целом, связь между инсулиновой резистентностью и риском ишемического инсульта не выявлена для лиц без сахарного диабета.

Феномен постинсультной инсулиновой резистентности был обнаружен как патологический фактор, возникающий в острейшей фазе ишемического инсульта и влияющий на клинический результат инсульта.

Статистически значимая положительная корреляция между значениями индекса чувствительности к инсулину, определенному в гомеостатической модели (НОМА-IR), и значениями шкалы тяжести инсульта NIHSS ($r = 0,408$; $p < 0,001$) была выявлена в исследовании, включавшем 173 пациента после ишемического инсульта без диабета [7]. Индекс НОМА-IR рассчитывали по формуле: $\text{НОМА-IR} = (\text{инсулин натощак (мкЕд/мл)} \times \text{глюкоза натощак (ммоль/л)}) / 22,5$. Инсулинорезистентность в первые 48 часа после возникновения инсульта (медиана 13,5 часа) определяли по индексу НОМА-IR в верхнем кваantиле (Q4). Функциональные нарушения оценивали при выписке с использованием модифицированной шкалы Рэнкина. Более высокие значения инсулиновой резистентности были связаны с более высоким риском неблагоприятного функционального исхода – отношение рисков 3,23 (95% ДИ 1,75–5,08; $p = 0,001$). В многомерных моделях, сравнивающих третий и четвертый кваantиле с первым кваantилем НОМА-IR, уровни НОМА-IR были связаны с неблагоприятным функциональным исходом, а скорректированный риск неблагоприятного исхода увеличился на 207% ($p = 0,006$) и 429% ($p < 0,001$) при сравнении третьего и четвертого кваantиле с первым кваantилем, соответственно. На основании этих результатов авторы сделали вывод о том, что высокая инсулиновая резистентность по индексу НОМА-IR ассоциирована с плохим функциональным исходом у недиабетических больных с острым ишемическим инсультом.

В исследовании ACROSS-China (Аномальная регуляция уровня глюкозы у пациентов с острым инсультом в Китае) у 1245 пациентов без сахарного диабета была изучена связь инсулиновой резистентности с клиническим исходом после первого ишемического инсульта [8]. Пациенты с высокой резистентностью к инсулину по индексу НОМА-IR в первые 24 часа после инсульта имели более высокий риск смертности в первый год после инсульта – отношение рисков 1,68 (95% ДИ 1,12–2,53; $p = 0,005$); более высокий риск повторного инсульта – отношение рисков 1,57 (95% ДИ 1,12–2,19); $p = 0,005$) и риск плохого функционального результата по шкале Рэнкина – отношение рисков 1,42 (95% ДИ

1,03–1,95; $p = 0,03$). Более высокие значения инсулиновой резистентности по индексу HOMA-IR были связаны с более высоким риском смерти в течение 1 года, повторного инсульта и неблагоприятного исхода ($p = 0,005$, $0,005$ и $0,001$, соответственно).

Более высокая степень инсулиновой резистентности по индексу HOMA-IR в остром и 3-месячном периоде после ишемического инсульта у пациентов без диабета ($n=441$) по сравнению с здоровым контролем ($n = 560$) была показана в исследовании SAHLSIS [9]. Тяжесть инсульта оценивали по шкале NIHSS. Средние значения индекса HOMA-IR через 4 суток у лиц после инсульта и у здорового контроля составляли $2,84 \pm 0,18$ и $1,43 \pm 0,09$ ($p < 0,001$), соответственно, при этом средние значения индекса HOMA-IR при тяжелом, умеренном и легком инсульте составляли $3,22 \pm 0,41$; $2,95 \pm 0,29$ и $2,47 \pm 0,28$ ($p < 0,02$), то есть значимо росли вместе с тяжестью инсульта. Функциональный результат оценивали по модифицированной шкале Рэнкина через 3 месяца, 2 года и 7 лет. Более высокие значения HOMA-IR предсказывали плохой функциональный исход через 3 месяца и 7 лет. По результатам исследования авторы сделали вывод, что у пациентов с ишемическим инсультом, не страдающих диабетом, HOMA-IR был повышен и связан с тяжестью инсульта.

В исследовании, включавшем 4655 участников, было показано, что более высокий постинсультный индекс HOMA-IR, определенный в среднем через $8,3 \pm 7,8$ дня после поступления в госпиталь, связан с неврологическим ухудшением по шкале тяжести инсульта NIHSS и с общей инвалидизацией по шкале Рэнкина, хотя не было обнаружено связи с повторными инсультами и смертностью [10]. Более высокие значения индекса инсулиновой резистентности HOMA-IR (высший квинтиль) были статистически значимо связаны с повышенным риском неврологического ухудшения по шкале NIHSS – среднее отношение рисков $1,86$ ($p = 0,001$), пониженным неврологическим улучшением по шкале NIHSS (≥ 4 снижение баллов или 0 баллов при выписке) – среднее отношение рисков $0,68$ ($p < 0,001$) и плохим функциональным результатом по шкале Рэнкина (≥ 3 баллов через

3 месяца после инсульта) – среднее отношение рисков 2,02 ($p < 0,001$); по сравнению с более низкими значениями НОМА-IR (первый квинтиль). При этом НОМА-IR не ассоциировался с рецидивом инсульта или смертностью в течение 3 месяцев после инсульта. Авторы сделали вывод, что резистентность к инсулину независимо связана с плохим функциональным исходом после острого ишемического инсульта, за исключением риска краткосрочного рецидива инсульта или смертности.

В указанных исследованиях постинсультная инсулиновая резистентность измерялась в среднем в первые 24 часа [8], в первые 48 часа [7], через 4 суток [9] и через 8 суток [10] после инсульта, что соответствует острейшему и острому периодам ишемического инсульта, причем во всех этих исследованиях была показана статистически значимая связь инсулиновой резистентности и клинического результата после инсульта.

В одном из исследований [9], инсулиновую резистентность по индексу НОМА-IR оценивали с медианой на 101 сутки после инсульта, то есть более чем через три месяца после инсульта. Постинсультная инсулиновая резистентность сохранялась к этому времени, и средние значения индекса у лиц с инсультом и у здорового контроля составляли $2,34 \pm 0,11$ и $1,43 \pm 0,09$ ($p < 0,001$), соответственно, причем сохранялась связь между более высокими значениями НОМА-IR и тяжестью перенесенного инсульта. Средние значения НОМА-IR в этом периоде при тяжелом, умеренном и легком инсульте составляли $2,48 \pm 0,24$; $2,50 \pm 0,21$ и $2,00 \pm 0,13$ ($p < 0,02$), соответственно, то есть были значимо выше у лиц с более тяжелым инсультом, чем с более легким. Однако, инсулиновая резистентность на этих временах только незначительно увеличивала риск плохого функционального клинического результата в будущем через 2 года – среднее отношение рисков 1,24. С учетом всех этих результатов [7, 8, 9, 10], можно сделать вывод, что постинсультная инсулиновая резистентность значимо повышает риск плохого функционального клинического результата в будущем в пределах срока, не превышающего три месяца после инсульта.

Помимо связи инсулиновой резистентности с неблагоприятным клиническим исходом после инсульта, была также выявлена связь инсулиновой резистентности по индексу HOMA-IR с недостаточным ответом на терапию тромболитиками [255, 256].

В совокупности результаты исследований указывают на существование постинсультной инсулиновой резистентности, наблюдаемой по меньшей мере в период первых трех месяцев после инсульта, причем более высокие значения индекса инсулиновой резистентности связаны с большей тяжестью инсульта по шкале NIHSS, большей зависимостью пациента по шкале Рэнкина, риском неблагоприятного клинического результата в будущем (до 7 лет), а также повышенным риском повторных инсультов и смерти в течение ближайшего после инсульта года.

Проблема инсулиновой резистентности при инсульте обсуждается почти исключительно в плане повышения риска инсульта и возможной защиты нейронов в острейшей фазе инсульта [257], но не в плане влияния инсулиновой резистентности на реабилитацию пациентов после инсульта, хотя известно, что инсулиновый рецептор в мозге участвует в процессах нейропластичности, регулируя формирование синапсов, число синапсов и синаптическую пластичность, [112, 258], рост нейритов [259, 260] и аксонов [261], а также дендритную структурную пластичность, зависящую от опыта [112], то есть по сути те процессы нейропластичности, которые требуются для нейрореабилитации в раннем восстановительном периоде после ишемического инсульта.

1.12 Связь инсулиновой резистентности и нейропластичности мозга

Восстановление функций после инсульта связано с активацией процессов нейрональной пластичности. Нейропластичность (нейрональная пластичность) определяется как способность мозга к реорганизации своей структуры, функций и связей на многих уровнях, включая молекулярный, клеточный, системный и поведенческий, и установлению новых нейрональных связей взамен утраченных

[209]. Инсульт приводит к потере синаптических связей вследствие необратимой гибели нейронов в очаге некроза и появлению прилегающей к зоне инфаркта неустойчивой области полутени (пенумбры), которая характеризуется резким снижением электрической активности [302] и для которой существует два исхода – либо восстановление при условии восстановления кровотока, либо превращение в зону некроза в ближайшие 2 дня [303]. Период максимальной постинсультной нейропластичности, то есть постинсультной реорганизации структуры и функций мозга, длится начиная с первой недели и до окончания первого месяца после экспериментального инсульта у грызунов и до окончания 3 месяцев после ишемического инсульта у человека [210, 211, 212, 223]. В этот период эндогенные процессы, в том числе проращение аксонов, синаптогенез и морфогенез дендритных шипиков, опосредуют структурные и функциональные изменения, лежащие в основе перестройки сенсорных и моторных нейрональных цепей [304]. Основные результаты в этой области были получены на доклинических биомоделях. Было найдено, что после фокального коркового инсульта периинфарктная кора теряет таламические связи и развивает новые горизонтальные корковые связи за счет разрастания аксонов [305]. Триггером для проращения аксонов и образования новых связей после инсульта в периинфарктной зоне, а также в зоне, контралатеральной очагу поражения, является спонтанная низкочастотная синхронизированная активность нейронов в периинфарктной зоне [306]. Эта нейрональная активность необходима для инициации процессов нейропластичности, так как ее ингибирование тетродотоксином блокировало проращение аксонов [306].

В основном постинсультная нейропластичность изучалась на доклинических биомоделях ишемического инсульта и поражения мозга, с использованием грызунов и нечеловекообразных приматов.

По данным большинства исследований на грызунах периинфарктная зона шириной несколько миллиметров является основной областью, где происходит перестройка нейрональных цепей у грызунов, но крупномасштабная реорганизация

также наблюдалась в исследованиях на обезьянах [307, 308]. Кроме того, было показано, что перестройка затрагивает контралатеральные регионы на стороне, противоположной очагу поражения [216]. В зоне нейропластичности меняется профиль экспрессии генов в направлении поддержания роста аксонов и дендритов и подавления процессов, ингибирующих их рост [214, 309]. В целом, постинсультная нейропластичность включает несколько видов пластичности в перинфарктной зоне и зоне контралатеральной очагу поражения, в том числе проращение аксонов, синаптогенез, образование и реорганизацию дендритных шипиков (Таблица 3).

Таблица 3 - Постинсультная нейропластичность.

Вид пластичности	Модель	Область пластичности	Ссылка
Проращение аксонов	Фокальный корковый инсульт у крыс	Периинфарктная зона	305
Проращение аксонов	Фокальное термокоагуляционное повреждение коры у крыс	Периинфарктная зона	306
Проращение аксонов	Ишемический инфаркт коры у обыкновенных белых обезьян	Периинфарктная зона и отдаленные регионы	307
Проращение аксонов	Поражение моторной коры у обезьян макак-резус	Крупномасштабная реорганизация связей	308
Проращение аксонов	Фокальный корковый инсульт у крыс	Периинфарктная зона (~2 мм)	309
Проращение аксонов	Фокальный ишемический инсульт у крыс	Периинфарктная зона	213
Проращение аксонов	Ишемический инсульт у крыс, приматов и человека	Периинфарктная зона	214
Образование синапсов	Фокальный ишемический корковый инсульт у крыс	Образование синапсов на контралатеральной стороне	216
Образование дендритных шипиков и увеличение плотности синапсов	Фокальный ишемический инсульт у мышей	Периинфарктная зона	217

Продолжение таблицы 3

Образование и реорганизация дендритных шипиков	Фокальный ишемический инсульт у мышей	Периинфарктная зона	218
Повышение скорости обновления дендритных шипиков	Фокальный ишемический инсульт у мышей	Периинфарктная зона	310

Сравнение процессов нейропластичности в мозге, запускаемых ишемическим инсультом, с процессами нейропластичности, регулируемые нейрональным инсулиновым рецептором, показывает их значительное сходство (Таблица 4).

Таблица 4 - Нейропластичность, регулируемая инсулиновым рецептором.

Вид пластичности	Модель	Ссылка
Рост нейритов	Культура сенсорных, симпатических, моторных эмбриональных нейронов	311, 259
Рост нейритов	Культура сенсорных взрослых нейронов крысы	261
Рост нейритов	Культура клеток нейробластомы SH-SY5Y	313
Число синапсов, пластичность дендритов	Зрительные тектальные нейроны головастиков <i>Xenopus in vivo</i>	112
Рост нейритов	Культура нейронов ганглиев задних корешков крысы	314
Рост и регенерация аксонов	Сенсорные икроножный нейроны крыс после повреждения <i>in vivo</i>	315
Рост нейритов	Neuro2A клетки в условиях инсулиновой резистентности	316
Образование дендритных шипиков	Первичная культура гиппокампальных нейронов крысы	317

Инсулин в физиологически релевантных концентрациях усиливает рост нейритов в культуре сенсорных нейронов крысы аналогично другим нейротрофинам, IGF1 и фактору роста нервов (NGF) [261]. Этот эффект инсулина связан со стабилизацией мРНК тубулина подобно эффектам IGF1 и NGF [312]. Инсулин активировал рост нейритов и экспрессию мРНК тубулина в культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y [313].

Инсулин в физиологически релевантной концентрации значительно увеличивает общую длину нейритов, максимальную длину нейрита и количество точек ветвления культивируемых нейронов ганглиев задних корешков по сравнению с нейронами, культивируемыми в контрольной среде [314].

Инсулин при интратекальном введении увеличивает количество и зрелость регенерирующих аксонов сенсорных икроножных нервов после повреждения [315]. Кроме того, в отдельном эксперименте инсулин также восстанавливал ретроградную потерю и атрофию глубоких малоберцовых, в основном двигательных, аксонов после травмы.

Инсулин при системном введении ускорял реиннервацию межкостных двигательных концевых пластинок после пересечения седалищного нерва и увеличивал функциональное двигательное восстановление денервированной задней лапы [316]. Кроме того, инсулин ускорял созревание регенерирующих миелиновых волокон на удалении от места повреждения седалищного нерва за счет увеличения калибра их аксонов.

Рост нейритов был снижен в Neuro2A клетках в условиях инсулиновой резистентности [317].

В экспериментах *in vivo* было показано, что инсулиновый рецептор участвует в регуляции числа синапсов и дендритной пластичности в тектальных нейронах головастиков *Xenopus* [112].

Инсулин способствует образованию дендритных шипов в первичных культурах нейронов гиппокампа крысы [318]. Использовании антител, блокирующих инсулиновую сигнализацию, или фармакологическая блокада сигнального пути PI3K/Akt/mTOR и малой ГТФазы Rac1 специфически предотвращали инсулин-индуцированное увеличение плотности дендритных шипиков, что в совокупности показывает важную роль передачи сигналов нейронального инсулинового рецептора в регуляции образования дендритных шипов и развития возбуждающих синапсов в нейронах гиппокампа через активацию сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и Rac1.

Сравнение постинсультной нейропластичности с нейропластичностью, регулируемой инсулиновым рецептором в ЦНС, показывает их значительное сходство в плане активации роста аксонов и нейритов, синаптогенеза и формирования дендритных шипиков. Инсулиновый рецептор в ЦНС играет роль сходную с рецепторами нейротрофинов IGF1 и NGF и делит с ними общие сигнальные пути, приводящие к структурным изменениям нейронной цепи.

1.5.2 Сравнение нейрогенеза, регулируемого инсулиновым рецептором, с постинсультным взрослым нейрогенезом

Нейрогенез – процесс образования новых нейронов в мозге останавливается во взрослом мозге после периода развития. Взрослый нейрогенез был открыт Альтманом в 1962 году [319]. С тех пор известно, что взрослый нейрогенез в основном происходит в основном двух нейрогенных нишах в мозге взрослых млекопитающих – в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа и субвентрикулярной зоне, выстилающей боковой желудочек [320]. В этих зонах новорожденные нейроны генерируются в течение всей жизни из нейрональных стромальных (стволовых) клеток. Существует оценка вклада взрослого нейрогенеза в динамику образования нейронов гиппокампа во взрослом мозге, построенная на ретроспективном датировании индивидуальных нейронов по содержанию изотопа ^{14}C в нейрональной ДНК гиппокампа, исходя из факта временного повышения уровней ^{14}C в атмосфере и воде в период проведения ядерных испытаний в 1955-63 гг. до запрещения испытаний международным договором, когда ^{14}C активно поглощался биотопом [321]. Согласно этой оценке, у взрослых людей в день добавляется 700 новых нейронов, что соответствует годовому обороту 1,75% нейронов в гиппокампе с умеренным снижением по мере старения.

Взрослый нейрогенез особенно усиливается после ишемического инсульта, когда вновь образовавшиеся нейробласты и клетки-предшественники олигодендроцитов мигрируют из нейрогенной зоны к границе зоны ишемии, где они вовлекаются в процесс постинсультной регенерации [77]. Миграция особенно активна в первые две недели после инсульта, но может длиться несколько месяцев

[322]. Основным источником новорожденных нейронов при инсульте является субвентрикулярная зона, откуда незрелые нейроны мигрируют в перинфарктную зону, например, стриатума [323, 324, 325] и коры мозга [325, 326, 327]. Деталям процесса постинсультного взрослого нейрогенеза посвящен ряд обзоров [328, 329]. Для этого процесса нет возрастных ограничений, и он наблюдался даже у пациента с инсультом в возрасте 87 лет [330]. В доклинических моделях инсульта ингибирование нейрогенеза ведет к ухудшению функциональных результатов, что указывает на вклад постинсультного нейрогенеза в функциональное восстановление после инсульта [331, 332]. Роль постинсультного нейрогенеза у человека в функциональном восстановлении после инсульта мало изучена, но, тем не менее, рассматривается как фактор, терапевтическое воздействие на который может улучшить реабилитацию после инсульта [329].

Роль нейронального инсулинового рецептора ИР-А во взрослом нейрогенезе изучалась и было показано, что он прямо участвует в активации взрослого нейрогенеза в субвентрикулярной зоне. IGF2, лиганд ИР-А, участвует в самообновлении (ассиметричном делении) и поддержании пула нейрональных стромальных клеток в субвентрикулярной зоне [75, 76, 333, 334]. Экспрессия нейронального рецептора инсулина (изоформа А), а не рецептора IGF-1R, преобладает в нейрональных стромальных клетках, и IGF2 является более эффективным промоутером нейрогенеза, чем IGF1, причем удаление ИР-А блокировало эффекты IGF2, указывая на основную роль IGF2/ИР-А сигнализации в самообновлении стромальных клеток [75]. Эти же исследования показали, что IGF2 и IGF1 имеют разные функции, и IGF2 участвует в самообновлении стромальных клеток, тогда как IGF1 участвует в пролиферации нейрональных прогениторных клеток, у которых уже начинают преобладать IGF-1R рецепторы. IGF2 также активирует взрослый нейрогенез в другой нише, субгранулярной зоне зубчатой извилины в гиппокампе [335].

Было показано, что экспрессия IGF2 в мозге долговременно повышается после эпизодов гипоксии-ишемии [78] и внутримозгового кровоизлияния [79], что

указывает на возможное участие IGF2 в процессах постинсультной регенерации. В недавнем клиническом исследовании было показано, что низкие уровни IGF2 в сыворотке крови после ишемического инсульта являются независимым маркером риска повышенной смертности [336]. Исследуемая популяция включала пациентов с ишемическим инсультом ($n = 492$) и контрольную группу ($n = 514$) из исследования по изучению ишемического инсульта (SAHLSIS). Выживаемость оценивали как минимум в течение 7 лет. Уровни IGF2 сыворотки были выше у больных с ишемическим инсультом как в острой фазе, так и через 3 мес. наблюдения по сравнению с контролем ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Самый низкий квинтиль острого IGF2 сыворотки был связан с повышенным риском постинсультной смертности (медиана наблюдения 10,6 лет, отношение рисков 2,34) по сравнению с четырьмя более высокими квинтилями. В этом контексте IGF2/ИР-А сигнализация может рассматриваться как мишень для создания новых лекарственных средств в восстановительном периоде после инсульта.

Возможность фармакологической модуляции как экспрессии IGF2, так и взрослого нейрогенеза в субвентрикулярной зоне мозга была показана при использовании ингибиторов ацетилхолинэстеразы [337, 338, 339, 340] и солей холина, предшественников ацетилхолина [239]. Галантамин, ингибитор ацетилхолинэстеразы, способствовал взрослому нейрогенезу у мышей посредством активации никотиновых $\alpha 7$ ацетилхолиновых рецепторов [338], причем этот эффект сопровождался повышением экспрессии мРНК IGF2 [339]. Добавка холина в пищу увеличивает экспрессию IGF2 у крыс во время внутриутробного развития [340]. В целом, активация холинэргической системы ведет к повышению экспрессии IGF2, регулятора взрослого нейрогенеза, что согласуется с данными, что постинсультная нейропластичность связана с активацией холинэргической системы [230].

Применение мезенхимальных стромальных клеток рассматривается как один из подходов к лечению ишемического инсульта [341]. Активация собственного нейрогенеза может рассматриваться в этом контексте как альтернатива клеточной терапии.

В совокупности, представленные данные показывают, что инсулиновый рецептор вовлечен в нейропластичность через активацию как инсулином, так и IGF2, а также вовлечен в регуляцию взрослого нейрогенеза. Оба процесса, нейропластичность и взрослый нейрогенез, участвуют в реорганизации мозга после инсульта, что указывает на возможный вклад инсулинового рецептора в нейронах в процесс восстановления после ишемического инсульта. В этом контексте постинсультная инсулиновая резистентность является одним из барьеров для нейрореабилитации в восстановительном периоде после инсульта, ограничивающем эффективность процесса восстановления. Соответственно, поиск средств лечения постинсультной инсулиновой резистентности является многообещающим новым подходом к лечению инсульта в восстановительном периоде.

1.13 Антидиабетические средства в лечении ишемического инсульта

Инсулин использовался в доклинических исследованиях инсульта как потенциальный нейропротектор при разных способах введения, в том числе при интраназальном введении. Исследования показали, что интраназальное введение обеспечивает доставку инсулина в мозг без побочного эффекта гипогликемии. Сравнительное фармакокинетическое исследование распределения инсулина между плазмой крови и тканями мозга при введении рекомбинантного инсулина человека мышам в одной и той же дозе показало, что интраназальное и подкожное введения обеспечивают примерно одинаковое повышение концентраций инсулина в мозге, но интраназальное введение ведет только к незначительному повышению уровней инсулина в плазме, не превышающему 3% от значения, достигаемого при подкожном введении [262]. Сходный эффект был получен при фармакокинетическом исследовании у человека, когда интраназальный инсулин практически не влиял на уровни инсулина в плазме, но обеспечил статистически значимое повышение концентрации инсулина в цереброспинальной жидкости испытуемых [263]. Таким образом, интраназальное введение инсулина позволяет

повысить локальные концентрации инсулина в мозге, не вызывая значимого снижения уровня глюкозы в крови, что делает этот способ введения безопасным с точки зрения отсутствия такого побочного эффекта как гипогликемия.

В то же время хроническое применение высоких доз интраназального инсулина несет риск возникновения центральной инсулиновой резистентности из-за особенностей физиологического механизма ауторегуляции инсулиновой сигнализации. Канонический каскад передачи сигнала инсулина ИР/IRS1/PI3K/Akt/mTORC1 построен по принципу отрицательной обратной связи, где активация комплекса mTORC1 ведет к активации рибосомальной S6 протеинкиназы (S6K1), которая фосфорилирует IRS1 по остатку серина S312 (нумерация IRS1 человека), что ведет к диссоциации IRS1 от инсулинового рецептора с последующей деградацией IRS1 и прекращением инсулиновой сигнализации [264]. Этот эффект был продемонстрирован в первичной культуре нейронов коры мозга крыс, когда длительная 24-часовая пре-инкубация нейронов с инсулином в высокой концентрации вызывала нейрональную инсулинорезистентность, блокируя эффекты последующего введения инсулина на активацию Акт [265].

Возможность использования интраназального инсулина как нейропротектора для лечения острого ишемического инсульта обсуждается в научной литературе с недавнего времени, из-за выявленных пересечений сигнальных путей инсулина в мозге с глутаматной эксайтотоксичностью и другими путями, приводящими к гибели нейронов, такими как воспаление и апоптоз [266].

Положительные эффекты инсулина на выживаемость нейронов в ранних доклинических исследованиях церебральной ишемии на диабетических моделях в основном объясняли нормализацией уровней глюкозы. На доклинической модели ишемического инсульта у крыс с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, было показано, что внутривенное введение инсулина в высокой дозе 12 МЕ/кг значительно уменьшило объем инфаркта у животных, подвергшихся 2-часовой окклюзии среднемозговых артерий (МСаО) с последующей 24-часовой

реперфузией [267]. Подкожные инъекции регулярного инсулина в дозе 0,3 МЕ/кг крысам с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, в модели кратковременной окклюзии двух сонных артерий снижали гибель гиппокампальных CA1 нейронов по сравнению с плацебо [268]. Интраперитонеальное введение инсулина в дозе 1,7 МЕ/кг крысам в модели церебральной ишемии, вызванной 20-минутной окклюзией подключичных артерий, снижало неврологический дефицит и повышало выживаемость животных по сравнению с плацебо [269]. Подкожные инъекции регулярного инсулина крысам с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, в модели окклюзии двух сонных артерий и окклюзии правой средней мозговой артерии снижало объем зоны инфаркта и неврологический дефицит по сравнению с плацебо [270]. Интрацеребровентрикулярное введение инсулина перед индукцией кратковременной церебральной ишемии путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий у монгольских песчанок снижало гибель нейронов гиппокампа CA3 по сравнению с плацебо [271]. В одной из работ было показано, что инсулин снижает ишемический некроз в мозге независимо от его влияния на уровни глюкозы [272].

Интраназальное введение инсулина нормогликемическим крысам Вистар с церебральной ишемией, индуцированной 20-минутной окклюзией сонных артерий в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией, снизило уровень маркеров повреждения в коре мозга, в том числе уровень оснований Шиффа, конъюгированных диенов и триенов, а также нормализовало активность Na^+ , K^+ -АТФазы, значительно сниженную после ишемии-реперфузии [273, 274, 275].

Таким образом, инсулин показал эффективность в защите нейронов на доклинических моделях церебральной ишемии и инфаркта мозга при разных способах введения, но эффективность инсулина в лечении ишемического инсульта не была доказана в рандомизированных клинических испытаниях.

Метформин — препарат первой линии лечения диабета 2 типа из класса бигуанидов, активатор аденозинмонофосфат (АМФ)-активируемой киназы

(АМРК). Метформин снижает концентрацию глюкозы в плазме главным образом за счет улучшения чувствительности к инсулину и подавления глюконеогенеза в печени. Механизмы действия метформина в мозге при когнитивных нарушениях типа болезни Альцгеймера широко обсуждаются в контексте его влияния на нейродегенерацию, β -амилоидную патологию, нейровоспаление и митохондриальную дисфункцию [276]. Влияние метформина на инсулиновую сигнализацию изучалось *in vitro* на клетках мышечной нейробластомы Neuro-2a, предварительно длительно инкубированных с высокими концентрациями инсулина, чтобы вызвать нечувствительность к инсулину [277]. Было показано, что в этих условиях метформин в очень высокой концентрации 1600 μ M может повышать фосфорилирование инсулинового рецептора в ответ на инсулин. Для сравнения, обычная концентрация метформина в плазме крови достигает 5–30 μ M после введения стандартной терапевтической дозы 1,5–2,0 г/сутки [278], что приблизительно в 50–300 раз ниже той, что снижала инсулиновую резистентность *in vitro* [277]. Поэтому вопрос о влиянии метформина в диапазоне его терапевтических концентраций на центральную инсулиновую сигнализацию в нейронах остается открытым.

Эффекты метформина изучались на доклинических *in vitro* и *in vivo* моделях ишемического инсульта. Метформин в концентрации 10 мМ повышал выживаемость нейронов гиппокампа и снижал показатели окислительного стресса в первичной культуре в условиях депривации глюкозы и кислорода, повышая при этом экспрессию АМРК и фосфорилированной формы pАМРК и снижая экспрессию mTOR [279]. Эти результаты указывают на связь защитного действия метформина при ишемии с активацией метформином сигнального пути АМРК/mTOR. Доклинические исследования метформина на моделях инсульта у грызунов суммированы в мета-анализе 2022 г. (включает 15 публикаций), который показал, что животные, принимавшие метформин, имели статистически значимое уменьшение размера инфаркта, снижение неврологических баллов и уменьшение содержания воды в мозге по сравнению с контролем [280]. Нейропротективный

эффект хронического применения метформина на биомоделях инсульта опосредовался через повышение активности АМРК [281, 282].

Исследование, изучавшее связь между тяжестью инсульта и применением метформина в период до инсульта у пациентов с диабетом 2 типа ($n = 1919$), показало статистически значимое снижение тяжести инсульта при поступлении по шкале NIHSS, снижение степени независимости через 3 месяца после инсульта по модифицированной шкале Рэнкина, а также снижение смертности (12,5% против 18%) у лиц, принимавших метформин до инсульта по сравнению с контролем [283].

Сравнительное исследование тяжести ишемического инсульта у пациентов с сахарным диабетом, получавшим инсулин ($n = 40$) или комбинированную терапию метформином или инсулином ($n = 40$), показали, что хотя не было статистически значимой разницы между группами по основным неврологическим показателям по шкале NIHSS в начале исследования, статистически значимое снижение неврологического дефицита было достигнуто в группе комбинированной терапии по сравнению с инсулином через две недели после начала терапии [279]. При этом комбинированная терапия повышала когнитивный дефицит по шкале MMSE, а также повышала зависимость пациента по шкале ADL в сравнении с только инсулином, что указывает на возможный негативный вклад метформина в постинсультную терапию в контексте влияния на когнитивные функции.

Агонисты рецептора PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) относятся к категории инсулин-сенситайзеров, которые используются для лечения пациентов с диабетом 2 типа. Два представителя этого класса, розиглитазон и пиоглитазон, изучались как потенциальные агенты для лечения ишемического инсульта.

Мета-анализ доклинических испытаний розиглитазона или пиоглитазона 2010 г., включивший 31 исследование, показал, что агонисты PPAR γ могут предотвращать или ослаблять повреждение ЦНС вследствие ишемического события, в том числе на моделях фокальной или глобальной ишемии [284].

Розиглитазон или пиоглитазон одинаково эффективно снижали объем инфаркта и улучшали неврологический исход.

Механизм защитного действия пиоглитазона и розиглитазона изучался на гиппокампальных нейронах в первичной культуре, где было показано, что пиоглитазон снижает вход Ca^{2+} в нейрон через NMDA рецепторы, хотя розиглитазон нет, что ставит вопрос, опосредуются ли эффекты пиоглитазона на эксайтоксичность через рецепторы PPAR γ [285].

В доклиническом исследовании на грызунах, где пиоглитазон вводился через 3 часа после 90-минутной окклюзии средней мозговой артерии в фазе реперфузии и еще до 5 дней подряд, было обнаружено статистически значимое снижение объема инфаркта мозга на 31% по сравнению с нелеченым контролем, хотя не было выявлено значимых различий в неврологических показателях между животными, получавшими пиоглитазон и плацебо [286].

Мета-анализ 2017 г. показал, что в популяции, включавшей пациентов с инсулиновой резистентностью, пре-диабетом и диабетом 2 типа ($n = 4980$) применение пиоглитазона значимо снижало риск повторного инсульта [287].

В большом клиническом исследовании ($n = 2885$) было показано, что пиоглитазон может быть эффективным для предотвращения повторного инсульта у пациентов с пре-диабетом [288].

Еще в одном исследовании ($n = 3876$) было показано, что пиоглитазон снижает риск транзиторной ишемической атаки, повторного инсульта, инфаркта миокарда и диабета у пациентов без диабета с выраженной инсулиновой резистентностью и историй ишемического инсульта [289], однако не влиял на когнитивную функцию [290].

Аналоги глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1) эксенатид и лираглутид широко применяются в лечение диабета 2 типа как гипогликемические агенты, действие которых связано с активацией рецептора GLP-1 снижением глюконеогенеза. Кроме того, эти агенты замедляют поступление глюкозы из пищи в кровотоки, дополнительно снижая уровень глюкозы в крови [291].

Сам GLP-1 вырабатывается в головном мозге вегетативными нейронами ствола мозга [292], а также кортикальной и гиппокампальной микроглией [293]. GLP-1 быстро метаболизируется, поэтому были разработаны более устойчивые к деградации аналоги эксенатид и лираглутид, которые способны проникать через ГЭБ [294] и связываться с рецепторами GLP-1 в мозге [295].

Несколько доклинических исследований с использованием экспериментальных моделей инсульта показали, что агонисты рецепторов GLP-1 могут уменьшать повреждение головного мозга, вызванное инсультом, как у здоровых грызунов, так и у грызунов с диабетом при введении до, в начале или сразу после инсульта [296, 297, 298, 299, 300]. Введение эксенатида мышам с ожирением и диабетом 2 типа с ишемическим инсультом, вызванным кратковременной окклюзией средней мозговой артерии, начиная с третьего дня после инсульта в течение 8 недель, вызвало восстановление силы захвата передней лапой, уменьшение активации микроглии, уменьшение атрофии парвальбумин-положительных интернейронов, восстановление плотности микрососудов, тогда как у мышей без диабета эффект эксенатида был незначительным [301].

1.14 Выводы по главе 1:

1. Источниками инсулина в мозге являются транспорт инсулина из кровотока в мозг через ГЭБ и синтез *de novo* в нейронах мозга, причем нейрональный инсулин высвобождается терминалами нейронов в ответ на деполяризацию.

2. Инсулиновый рецептор имеет две изоформы, А и В, распределение которых в организме зависит от типа клеток.

3. Инсулиновые рецепторы распространены по всей центральной нервной системе, с наибольшей плотностью в нейронах, где они преимущественно локализируются в постсинаптической плотности дендритных шипиков.

4. Нейроны экспрессируют исключительно изоформу А инсулинового рецептора, которая активируется двумя лигандами, инсулином и IGF2, в интервале их физиологически значимых концентраций.

5. Инсулиновый рецептор представляет собой тирозинкиназу, активируемую фосфорилированием остатков тирозина 1146, 1150 и 1151 (нумерация изоформы А) β -цепи рецептора, в ответ на связывание рецептора с лигандом, инсулином или IGF2.

6. Система инсулиновой сигнализации распространена по всему мозгу и включает не менее трех сигнальных путей: два канонических ИР/IRS1/PI3K/АКТ/mTORC1 и ИР/IRS-1/Grb2/Raf/Mek/Erk1,2, а также специфичный синаптический путь ИР-А/IRSp53, которые вместе опосредуют множество биологических ответов инсулина в ЦНС.

7. Биологические эффекты инсулина/IGF2 в ЦНС включают регуляцию процессов нейропластичности, в том числе активацию взрослого нейрогенеза, развитие нервной системы, рост аксонов и нейритов, регуляцию числа синапсов и синаптической пластичности, регуляцию пластичности дендритов, защиту нейронов к действию повреждающих факторов, регуляцию энергетического метаболизма мозга и регуляцию процессов формирования памяти.

8. Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах по остаткам тирозина в тирозинкиназном домене рецептора является критической посттрансляционной модификацией, приводящей к полной активации рецепторной тирозинкиназы в ответ на стимуляцию инсулином или IGF2.

9. Фосфорилирование рецептора инсулина зависит от сигнализации с участием G-белков, которые участвуют в ингибировании протеинтирозинфосфатаз, дефосфорилирующих инсулиновый рецептор.

10. Инсулиновая резистентность в ЦНС вызывается паталогическим снижением фосфорилирования (гипофосфорилированием) сигнальных молекул, включая инсулиновый рецептор, его субстраты IRS и нижележащие киназы Akt, mTOR, GSK3 β и ERK1/2, в ответ на инсулин.

11. Инсулиновая резистентность в ЦНС является паталогическим фактором ряда заболеваний, из которых наиболее изучены в этом аспекте болезнь Альцгеймера и черепно-мозговая травма.

12. Механизмы нейропластичности мозга отвечают за возможность реабилитации пациента после ишемического инсульта.

13. Существование периода максимальной нейропластичности мозга с 7 суток до 3 месяцев после инсульта формирует временное терапевтическое окно для вмешательств, направленных на эффективное восстановление функций после инсульта, в том числе для фармакотерапии в раннем восстановительном периоде инсульта.

14. Постинсультная инсулиновая резистентность возникает в острейшем и остром периодах инсульта, сохраняется по меньшей мере три месяца с начала инсульта, ухудшает неврологический и функциональный клинический результат на длительный период (до 7 лет), а также повышает риск повторного инсульта и риск смерти в течение года. Механизм возникновения постинсультной инсулиновой резистентности не известен.

15. Сравнение показывает сходство между процессами постинсультной нейропластичности и процессами нейропластичности, регулируемые инсулиновым рецептором в ЦНС.

16. Антидиабетические средства широко изучаются в отношении возможности их применения в лечении и профилактике ишемического инсульта, при этом инсулин, метформин и эксенатид показали эффективность в лечении ишемического инсульта на доклинических моделях.

17. Антидиабетические средства не изучались в рандомизированных клинических испытаниях как средства лечения ишемического инсульта, хотя было показано, что метформин и пиоглитазон при профилактическом применении могут снижать тяжесть ишемического инсульта и риск повторного инсульта, соответственно.

18. Ни одно из антидиабетических средств не используется для нейрореабилитации пациентов в раннем восстановительном периоде после ишемического инсульта.

19. В адипоцитах существует окислительная сигнализация инсулина, которая влияет на фосфорилирование инсулинового рецептора, 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

20. Перспективным направлением исследований механизмов инсулиновой резистентности в мозге является патологическое снижение фосфорилирования (гипофосфорилирование) инсулиновых рецепторов в нейронах, механизм возникновения которого недостаточно изучен.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Набор ELISA для рецептора инсулина PhosphoDetect™ (pTyr1162/1163; нумерация IP-B) и набор ELISA для рецептора инсулина (β -субъединица) были получены от Calbiochem. Уровни фосфопротеинов измеряли с помощью MILLIPLEX® MAP Akt/mTOR (EMD Millipore Corp. MA, США; номер по каталогу 48-611MAG). Уровни общих белков IR β , Akt, mTOR и GSK3 β измеряли с помощью панели общего белка MILLIPLEX® MAP Akt/mTOR (EMD Millipore Corp. MA, США; номер по каталогу 48-612MAG). Дихолинсукцинат был синтезирован как указано в главе 6. Другие материалы были приобретены у Sigma-Aldrich, Thermo fisher scientific, ICN, Gibco, Biosource, Invitrogen и Acros.

Лабораторные животные. Эксперименты с животными проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.), «Принципами ухода за лабораторными животными», сформулированными Национальными институтами здравоохранения, Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ №708н от 23.08.2010), Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. No 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и были одобрены локальным этическим комитетом при Институте нормальной физиологии им. Анохина, РАМН, локальным этическим комитетом при институте Химической физики РАН, локальным этическим комитетом при Научном центре здоровья детей РАМН, локальным этическим комитетом при Национальном медицинском исследовательском центре здоровья детей Минздрава РФ, в зависимости от места проведения эксперимента. Мыши самцы линии C57Bl/6 были получены из Лаборатории биологических исследований Пущинского филиала Института биоорганической химии имени Шемякина-Овчинникова (г. Пущино Московской области). Животные содержались по 4-5 особей в клетках в контролируемых условиях окружающей среды при

температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности 60–70% и естественно-искусственном освещении с циклом 12/12 или 14/10. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках до начала эксперимента. Животных содержали группами по 4 особи в клетке при постоянной температуре 21°C в помещении с контролируемым освещением при цикле свет-темнота 14/10. Животные имели свободный доступ к пище и воде.

Первичная культура гранулярных нейронов мозжечка крыс. Гранулярные нейроны мозжечка были приготовлены из 7-8-дневных крыс Вистар, как описано [354]. Мозжечок вырезали и помещали в ледяной буферный солевой раствор Хэнкса, не содержащий $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (HBSS) без фенолового красного (Gibco). После измельчения ткань помещали в HBSS без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ с феноловым красным и 0,1% трипсином на 15 мин при 36°C. Трипсин удаляли промыванием HBSS. Клетки осаждали в HBSS, затем ресуспендировали в среде Neurobasal Medium (Gibco) с добавкой B-27 (Gibco), 20 mM KCl, GlutaMax (Gibco) и пенициллином/стрептомицином, высевали с плотностью 5×10^6 клеток/мл на 35 × 10 мм стерильные чашки, предварительно покрытые поли-D-лизинном. Культуры содержали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 и 95% воздуха с добавлением среды Neurobasal. Культуры обрабатывали на 3-й день 5 мкМ цитозинарабинозида (Sigma) в течение 24 ч для предотвращения глиальной пролиферации, а затем меняли среду. Для экспериментов использовали нейроны на 7-9-е сутки.

Первичная культура нейронов коры мозга крыс. Первичные культуры нейронов получали из коры мозга одно- или двухдневных крыс линии Вистар. Крыс анестезировали, обезглавливали, кору удаляли и отделяли от мозговых оболочек. Извлеченные ткани промывали раствором Хэнкса, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} , помещали в раствор папаина на 15 мин при 36°C, промывали стандартным раствором Хэнкса с феноловым красным и культуральной средой Minimal Essential Medium (MEM) и диспергировали в свежей MEM. Однородную суспензию дважды осаждали на центрифуге при 200 g в течение 5 мин. Осажденные клетки ресуспендировали до концентрации 10^6 клеток/мл в нейробазальной среде (NBM),

дополненной добавкой B-27, GlutaMAX и пенициллином/стрептомицином. Суспензию (200 мкл) переносили на покровные стекла, прикрепленные к лункам 35-мм пластиковых чашек Петри (MatTek, Ashland, MA, USA), или по 400 мкл в каждую лунку 24-луночных пластиковых планшетов (Corning costar). Стеклообразные чашки и планшеты предварительно покрывали 10 мг/мл полиэтиленimina на 30 мин. Через час добавляли 1,5 мл NBM, содержащего 2% B-27 Supplement, 1% антибиотик-антимикотик и 1% GlutaMAX. Клетки хранили в инкубаторе при 37°C, 95% воздуха + 5% CO₂ и относительной влажности 100%. Цитозинарабинозид (AraC, 5 мкМ) добавляли в среду на двое-трое суток для предотвращения пролиферации глиальных клеток и получения культур с процентным содержанием нейронов более 90%. Каждые три дня клетки подкармливали, заменяя 1/3 старой среды новой средой. Культуры использовали в экспериментах через 10–12 дней после посева (10–12 дней в культуре, DIV). Перед каждым экспериментом дно с клетками и планшеты десять раз отмывали от добавки B27 буфером, содержащим 135 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 20 мМ HEPES, 5 мМ D-глюкоза; pH 7,4. Затем клетки выдерживали в этом буфере в течение часа перед каждым экспериментом.

Фенотипирование клеточных культур коры мозга крыс. Культуру фиксировали 4% PFA в течение 15 минут, промывали PBS. Специфические первичные антитела к белкам bIII Tubulin (PA5-85639) и GFAP (OPA1-06100) добавляли в раствор 2% BSA в PBS-T в разведениях 1:1000 и 1:100 соответственно и инкубировали в течение ночи при +4°C. После трехкратной промывки PBS в разведении 1:100 добавляли вторичные антитела, конъюгированные с FITC (QL230437) и AlexaFluor 594 (A-11005), и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. После трехкратной промывки PBS для окрашивания ядер добавляли раствор DAPI (D3571). Флуоресцентную микроскопию выполняли на многорежимном ридере Cytation 3 Cell Imaging от BioTek. Подсчет клеток проводили с использованием CellProfiler v. 3.1.8 и классификации CellProfiler Analyst v. 2.2.1. Процент клеток, экспрессирующих каждый маркер в каждом

биологическом повторе, рассчитывали относительно общего количества клеток с живой морфологией (DAPI-положительные клетки и bIII₂ или GFAP-положительные клетки).

Измерение скорости выделения H_2O_2 в срезах печени. Опыты с инсулином выполнены на срезах печени крыс-самцов линии Вистар. Под анестезией крыс декапитировали, печень извлекали, приготавливали срезы печени толщиной около 1 мм и тщательно промывали холодным раствором 0,15 М KCl перед введением в эксперимент. Концентрацию H_2O_2 оценивали в среде инкубации по окислению фенолового красного в присутствии пероксидазы хрена [350]. Для выяснения влияния добавок на скорость выделения H_2O_2 , срезы инкубировали 10 мин с 1 мкЕд/мл инсулина, 1 мЕд/мл инсулина плюс 2 мМ малоновой кислоты, 2 мМ янтарной кислоты, а также без добавок (контроль) при 37°C в 30 мМ трис-HCl (pH 7,4).

Измерение скорости выделения H_2O_2 митохондриями печени и сердца. Опыты с инсулином выполнены на срезах печени и сердца крыс-самцов линии Вистар. Под анестезией крыс декапитировали, печень извлекали. Срезы ткани толщиной около 1 мм тщательно промывали раствором 0,15 М KCl. Для определения влияния инсулина на скорость генерации H_2O_2 митохондриями, срезы инкубировали 1 мин с 1 мкЕд/мл инсулина или без инсулина (контроль) при 37°C в среде, содержащей 30 мМ трис-HCl (pH 7,4). Митохондрии немедленно выделяли из срезов методом дифференциального центрифугирования в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы и 0,1 М ЭДТА. При 600g удалялись ядра, при 10000g выделялись митохондрии. Изолированные митохондрии инкубировали 15 мин при 37°C в среде, содержащей 35 мМ трис-HCl (pH 7,6), и янтарную кислоту (сукцинат) в возрастающих концентрациях, после чего определяли концентрацию H_2O_2 в среде инкубации по окислению фенолового красного в присутствии пероксидазы хрена [350].

Измерение активности протеинтирозинфосфатаз. Общую активность ПТФ оценивали по высвобождению фосфата из фосфотиروزина по методу Кремерскотен и Барнеков [349]. Для определения зависимости активности ПТФ от времени

инкубации с инсулином срезы инкубировали с 1 мкЕд/мл инсулина при 37°C в среде, содержащей 30 мМ трис-НСl (рН 7,4). Для определения влияния добавок на активность ПТФ, срезы инкубировали 5 мин с 1 мкЕд/мл инсулина, 1 мкЕд/мл инсулина плюс 2 мМ малоновой кислоты (малонат), 2 мМ янтарной кислоты (сукцинат), а также без добавок (контроль) при 37°C в среде, содержащей 30 мМ трис-НСl (рН 7,4). Затем срезы отмывали раствором 0.15 М КСl, гомогенизировали, и определяли общую активность ПТФ.

Измерение активности протеинтирозинфосфатаз и скорости выделения H_2O_2 в гомогенатах печени крыс. Печень гомогенизировали в среде, содержащей 100 мМ трис-НСl (рН 7,4) и 1,15 % КСl. Гомогенат центрифугировали 10 мин. при 200 x g и декантировали. Жидкую клеточную фракцию (35,6 мг белка/мл) использовали в опытах. Для определения влияния каталазы на эффективность ингибирования ПТФ сукцинатом, гомогенат инкубировали 10 мин. при 37°C в среде, содержащей 30 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 4 мМ фосфотирозина с добавлением 2 мМ сукцината, 2 мМ сукцината плюс 7,6 Ед. каталазы, а также без добавок (контроль), после чего определяли активность ПТФ. Для определения зависимости активности ПТФ от концентрации сукцината, гомогенаты инкубировали 10 мин. при 37°C в среде, содержащей 30 мМ трис-НСl (рН 7,5), 4 мМ фосфотирозина, и сукцинат в возрастающих концентрациях.

Измерение перекиси водорода в культурах нейронов. Выход H_2O_2 из культур нейронов измеряли с помощью флуориметрии с использованием непроникающего в клетки красителя Amplex Red в присутствии пероксидазы хрена (набор Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit, кат. № A22188, Invitrogen). Культуры CGN предварительно инкубировали в течение 120 мин в солевом растворе, состоящем из 156 мМ NaCl, 3 мМ КСl, 2 мМ MgSO₄, 1,25 мМ КН₂РО₄, 2 мМ СаСl₂, 0,5 мМ глюкозы, 20 мМ НЕРЕС, и рН, доведенном до 7,4 с NaOH. Затем культуры подвергали воздействию указанного солевого раствора с добавлением 50 мкМ Amplex Red и 0,1 ЕД/мл пероксидазы хрена (среда инкубации). Выход H_2O_2 из нейронов регистрировали каждые 5 с в течение 2 мин. Инкубационную среду

быстро заменяли свежей средой, не содержащей инсулина (контроль) или 100 нМ инсулина, и выход H_2O_2 регистрировали каждые 5 с в течение 2 мин. Где указано, коклюшный токсин (pertussis toxin, РТХ) 2 мкг/мл добавляли за 120 мин до и во время стимуляции инсулином. Малонат 6 мМ добавляли за 5 мин до и во время стимуляции инсулином. Флуоресценцию измеряли с помощью эпифлуоресцентного инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного флюоритовым объективом 20X, с возбуждением при 550 ± 10 нм и регистрацией флуоресценции при 610 ± 30 нм. Все данные изображений были собраны и проанализированы с использованием программного обеспечения Metafluor 6.1 (Universal Imaging Corp., США). Стандартные кривые концентраций H_2O_2 были линейными до 1500 нМ и использовались для преобразования значений флуоресценции в значения концентраций H_2O_2 . Расчетный предел обнаружения анализа составил 7 нМ. Данные нормализовали к общему количеству клеточного белка и выражали как H_2O_2 нМ \cdot мкг⁻¹.

Анализ фосфорилирования рецептора инсулина. Количества аутофосфорилированной β -субъединицы рецептора инсулина (pYpY-IR) измеряли с помощью набора ELISA для рецептора инсулина PhosphoDetect™ (pTyr1162/1163; нумерация ИР-В) (Calbiochem), подходящего для исследований с рецептором инсулина крысы. Общее количество β -субъединицы рецептора инсулина (IR), измеряли с использованием набора ELISA для рецептора инсулина (β -субъединица) (Calbiochem). Культуры CGN инкубировали в солевом растворе, содержащем 145 мМ NaCl, 5,6 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 20 мМ HEPES, 0,5 мМ глюкозы при pH 7,4 в течение 30 мин с инкубацией без инсулина (контроль) или с инсулином в течение 10 мин при 37°C, с пре-инкубацией в течение 5–30 мин перед введением инсулина других добавок как указано в тексте. Эксперимент заканчивали, удаляя среду, промывая охлажденным льдом PBS и добавляя 200 мкл буфера для лизиса клеток (Biosource) на чашку, дополненного 1 мМ PMSF, 50 мМ набора ингибиторов протеаз III (Sigma) и 2 мМ ортованадата натрия в качестве ингибитор тирозинфосфатазы на льду в течение 10 мин. Лизаты центрифугировали при 12000

об/мин при 4°C в течение 12 мин. В каждом лизате измеряли количество аутофосфорилированных β -субъединиц рецептора и общее количество β -субъединиц рецептора, как описано производителем. Для каждого эксперимента значения аутофосфорилированных β -субъединиц были нормализованы к общему количеству β -субъединиц по Уравнению 1:

$$Y_i (\text{норм}) = \frac{Y_0 - Y_{ctr}}{Y_{ins} - Y_{ctr}} \quad (1)$$

где Y_0 представляет собой исходное значение фосфорилирования рецептора, Y_i (норм) – нормализованное значение фосфорилирования, Y_{ctr} – среднее значение фосфорилирования в нейронах в отсутствие стимуляции инсулином и Y_{ins} – среднее значение фосфорилирования в нейронах в ответ на 100 нМ инсулина.

Измерение $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$. Для измерения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) нейроны коры нагружали низкоаффинным индикатором Fura-FF (2 мкМ) в форме ацетоксиметилловых эфиров в течение 60 мин при 37 °C. Флуоресценцию Fura-FF возбуждали поочередно при 340 и 380 нм и регистрировали при 525 нм. Для одновременных измерений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ клетки загружали 2,5 мкг/мл родамина 123 (Rh123) в течение последних 15 минут периода загрузки Fura-FF в буфер при 37°C. Флуоресценцию Rh123 возбуждали и регистрировали при 485 и 525 нм, соответственно. Накопление Rh123 в поляризованных митохондриях гасит флуоресцентный сигнал, и, наоборот, деполяризация митохондрий вызывает рост флуоресценции Rh123 [362]. Измерения проводили при 25–27 °C в среде, содержащей 135 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 20 мМ HEPES, 5 мМ D-глюкоза; pH 7,4. 100 мкМ глутамата добавляли в не содержащую Mg²⁺ среду, содержащую 10 мкМ глицина, и затем клетки выдерживали при 37°C в течение 30 минут. В бескальциевых буферах CaCl₂ заменяли на 0,1 мМ EGTA и 2 мМ MgCl₂. Чтобы исследовать накопление митохондриального Ca²⁺ во время воздействия глутамата, митохондрии полностью деполяризовали добавлением 1 мкМ FCCP. Наконец, 1 мкМ иономицина (Iono) добавляли для калибровки максимальной реакции Fura-FF на повышение $[Ca^{2+}]_i$. Для измерения флуоресценции использовали инвертированный микроскоп Olympus IX-71, оснащенного

ксеноновой лампой, 20-кратным флюоритовым объективом, системой освещения Sutter Lambda 10-2 (Sutter Instruments, США) и ПЗС-камерой CoolSNAP HQ2, управляемой компьютерной программой MetaFluor (Molecular Device, США). Данные выражали как отношение F/F_0 сигнала флуоресценции, измеренного после воздействия добавок на нейроны, к исходному сигналу.

Измерение IR β pY^{1150/1151}, Akt pS⁴⁷³, mTOR pS²⁴⁴⁸ и GSK3 β pS⁹. Для измерения фосфопротеинов нейроны коры головного мозга крыс подвергали воздействию среды, с добавкой или без 100 мкМ глутамата в среде, не содержащей Mg²⁺, в присутствии 10 мкМ глицина, при 37° С в течение 30 минут. Затем среду заменяли буфером, содержащим 100 нМ инсулина, 130 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 5 мМ D-глюкозы, 20 мМ HEPES и pH 7,4, и клетки инкубировали при 37°С в течение 15 мин. Клетки лизировали, определяли уровни фосфопротеинов IR β pY^{1150/1151}, Akt pS⁴⁷³, mTOR pS²⁴⁴⁸ и GSK3 β pS⁹ в лизатах с помощью панели MILLIPLEX® MAP Akt/mTOR (EMD Millipore Corp. MA, США) и уровни общих белков IR β , Akt, mTOR и GSK3 β в лизатах измеряли с помощью панели общего белка MILLIPLEX® MAP Akt/mTOR (EMD Millipore Corp. MA, США) с использованием анализатора MAGPIX® (Merck Millipore, MA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные значения фосфопротеинов IR β pY^{1150/1151}, Akt pS⁴⁷³, mTOR pS²⁴⁴⁸ и GSK3 β pS⁹ нормализовали к уровням общего белка IR β , Akt, mTOR и GSK3 β , соответственно, и выражали в процентах от значений, полученных в обработанных инсулином клетках.

Мониторинг флуоресценции родамина 123. Изменения потенциала внутренней мембраны митохондрий в отдельных нейронах в ответ на добавки измеряли по флуоресценции родамина 123 (Rhodamine 123, Rh123), как описано ранее [356]. Культуры нейронов уравнивали 10 мкг/мл Родамина 123 в солевом растворе, забуференном HEPES, в течение 10 мин при 20°С. Клетки перед экспериментом промывали HBSS и затем подвергали воздействию инсулина, ротенона, малоната или FCCP в течение 10 минут и измеряли флуоресценцию (возбуждение 488 нм, эмиссия 530 нм). Данные выражали как отношение F/F_0

сигнала флуоресценции после воздействия добавок на нейроны к исходному сигналу.

*Измерения ^{31}P ЯМР *in vivo*.* На 8-е сутки крыс скальпировали под общим наркозом (40 мг/кг пентобарбитала), чтобы исключить вклад метаболитов мышцы, закрепляли в специальном стереотаксическом устройстве и помещали в датчик ЯМР спектрометра, сконструированного для регистрации спектров мозга ^{31}P *in vivo*. Датчик снабжен двухвитковой диаметром 14 мм поверхностной катушкой, локализация чувствительного объема, обеспечиваемая катушками, составляет полусферу радиусом, равным радиусу витка [403]. Крысу располагали так, чтобы центр черепа совпадал с центром окружностей витков катушек. Датчик помещали в магнит ЯМР – спектрометра Bruker AM-400 WB с напряженностью магнитного поля 9.4 Т и частотой 161.98 МГц для ядер ^{31}P . Однородность поля контролировали по полуширине сигнала протонов тканевой воды, который регистрировали катушкой, и оптимизировали шиммированием, добиваясь значений 100 – 150 Гц. Спектры мозга ^{31}P ЯМР *in vivo* снимали в одноимпульсном режиме, используя зондирующий импульс 40° и релаксационную задержку 0.3 с. Ширина спектрального диапазона составляла 7 кГц. Время снятия спектра – 1 мин. Сразу после регистрации исходного спектра прямо в датчике спектрометра у крысы моделировали глобальную ишемию, останавливая сердце переменным электрическим током 27 В, подаваемым 4 мин на пару игольчатых электродов, закрепленных под кожей на грудной клетке. Одновременно, с интервалом 1 мин регистрировали спектры ^{31}P мозга *in vivo* в течение 15 мин. Уровни фосфатных метаболитов в мозге перед моделированием ишемии определяли измерением интегральных интенсивностей соответствующих сигналов в спектрах, нормируя интенсивность каждого сигнала к сумме интегральных интенсивностей всех сигналов спектра. В каждой серии измерений динамики ишемии для индивидуального животного интенсивности сигналов нормировали к соответствующим исходным значениям, полученным из спектра данного животного перед остановкой сердца. Внутриклеточный рН определяли по

химическому сдвигу δ неорганического фосфата (Фн) от сигнала ФК, принимая $\delta\text{ФК} = 0$.

¹H ЯМР измерения in vivo. Спектры записывали на частоте ¹H 400 МГц с помощью спектрометра Bruker AM-400 WB (Bruker, Reinsretten, Germany) с вертикальным магнитом, снабженным зондом с внешним диаметром 70 мм. Животное под анестезией пентобарбиталом натрия (40 мг/кг, внутривенно) фиксировали в головке зонда, при этом поверхностную спираль (диаметром 14 мм для крыс) располагали непосредственно на черепе животного. Однородность магнитного поля оптимизировалась по сигналу воды. Обычно получали ширину линии от 40 до 90 Гц. Спектры ¹H ЯМР накапливались и обрабатывались, как описано [415, 416]. Отношения метаболитов NAA/Cr рассчитывали по измерениям относительной высоты пиков с использованием программного обеспечения спектрометра. Все измерения ¹H ЯМР проводились исследователем, «ослепленным» в отношении групп лечения.

Модель хронической церебральной гипоперфузии. Хроническую церебральную гипоперфузию индуцировали у крыс постоянной двусторонней окклюзией общих сонных артерий (2VO), как описано [424]. Крыс анестезировали пентобарбиталом натрия (40 мг/кг, внутривенно) и общие сонные артерии крысы отделяли от шейных симпатических и блуждающих нервов через вентральный шейный разрез. Затем артерии перевязывали шелковыми нитями. Та же хирургическая процедура была выполнена у ложноперитонизированных крыс, но без фактического перевязки.

Инъекция β -амилоидного пептида 25–35. Крыс анестезировали пентобарбиталом натрия (30 мг/кг, внутривенно), после чего β -амилоидный пептид 25–35 в виде стерильного раствора 2 мкг на 1 мкл физиологического раствора вводили билатерально в базальное ядро Мейнерта крысы с каждой стороны через проводниковую канюлю микрошприцем Hamilton по стереотаксическим координатам: AP -1,5, DL \pm 2,7 и H 8,1. Ложноперитонизированным

крысам вводили билатерально в базальное ядро Мейнерта 1 мкл физиологического раствора.

Тест условного рефлекса пассивного избегания у крыс. Установка для теста пассивного избегания состояла из светлого отсека, соединенного с темным отсеком контролируемой дверью. Сам тест состоял из двух испытательных сессий. В испытании на приобретение навыка крыс индивидуально помещали в светлое отделение, дверь в темное отделение открывали и регистрировали задержку по времени (задержку) до входа крысы в темное отделение. После того как крыса прошла через дверь, дверь закрывали и через решетчатое дно в течение 1 с подавали электрический ток силой 0,8 мА. После удара током крысу возвращали в домашнюю клетку. Испытание на удержание приобретенного навыка проводили через двадцать четыре часа после первого испытания. В этом испытании каждое животное помещали в светлый отсек и регистрировали задержку перехода в темный отсек до истечения 180 с.

Тест условного рефлекса пассивного избегания у мышей. Установка для нисходящего (step-down) теста пассивного избегания состояла из коробки (22 x 24 x 27 см) с решетчатым полом из нержавеющей стали. Круглая платформа из плексигласа (диаметр 8 см, высота 2 см) закреплялась в центре коробки. Во время обучения каждую мышь отдельно помещали на платформу. Когда мышь слезала с платформы и клала все четыре лапы на решетчатый пол, наносился удар током силой 1,0 мА в течение 3 с. Испытание на запоминание (retention) было проведено через двадцать четыре часа после тренировки таким же образом, как и тренировка, за исключением того, что через решетчатый пол не наносился удар электрическим током. Каждую мышь снова помещали на платформу и регистрировали задержку при понижении до истечения 180 с.

Тест водного лабиринта. Тест водного лабиринта проводили по методике Морриса [417]. Экспериментальная установка состояла из круглого бассейна с водой (диаметр 120 см, высота 60 см), содержащего воду при 24°C на глубину 40 см и сделанную непрозрачной путем добавления молока. Спасательная платформа

из оргстекла 8 x 8 см погружалась на 1,5 см ниже поверхности воды и располагалась в середине одного квадранта. Расположение платформы оставалось неизменным на протяжении всего периода обучения. Бассейн располагался в тестовой комнате с различными визуальными подсказками. Проводили 6 тренировочных проб в день с интервалом между пробами 2 мин. Животных помещали в бассейн в одном из шести исходных положений. В каждом тренировочном испытании записывались время и длина пути, необходимые для побега на скрытую платформу. Результаты шести тренировочных испытаний усреднялись для получения единого репрезентативного значения, а средние значения использовались для окончательной статистики. Животным, обнаружившим платформу, позволяли оставаться на платформе в течение 30 с, а затем возвращали в домашнюю клетку в течение перерыва между опытами. Животных, которые не находили платформу в течение 120 с, в конце опыта мягко направляли к платформе на 30 с. Все поведенческие эксперименты проводились исследователями, «ослепленными» в отношении групп лечения.

Тест открытое поле. Спонтанную двигательную активность мышей оценивали в тесте «открытое поле» в автоматическом режиме с использованием монитора активности Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, ОН) на основе фотоэлементов. Животных по отдельности помещали в монитор активности и регистрировали спонтанную двигательную активность (общее накопленное количество горизонтальных одиночных прерываний фотоэлемента) в течение 3-минутного периода.

Измерение активности холинацетилтрансферазы. Крыс декапитировали под анестезией пентобарбиталом натрия (40 мг/кг, внутрибрюшинно). Мозг быстро удаляли и гомогенизировали. Активность холинацетилтрансферазы (ХАТ) в гомогенатах коры головного мозга измеряли по методу, описанному Фоннумом [431]. Все измерения ХАТ проводились исследователем, «ослепленным» в отношении групп лечения.

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента, однофакторного ANOVA, однофакторного ANOVA с повторными измерениями, или двухфакторного ANOVA в зависимости от дизайна эксперимента. Параметры V_{max} и K_m уравнения Михаэлиса-Ментен, рассчитывали при помощи линейного регрессионного анализа данных, переведенных в двойные обратные координаты. Аппроксимация кривых функцией Хилла проводилась с помощью нелинейной регрессии, чтобы получить значения параметров в Уравнении 2:

$$Y = Start + (End - Start) \times \frac{X^n}{K^n + X^n} \quad (2)$$

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

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 $p < 0,05$.

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

3.1 Введение

С пионерских работ, опубликованных в 1978-79 гг., известно, что инсулин стимулирует образование перекиси водорода (H_2O_2) в клетках жировой ткани [88, 89]. Позднее было установлено, что роль инсулин-чувствительного источника H_2O_2 в адипоцитах играет НАДФН-оксидаза 4 (Nox4) [90], а функция образующейся H_2O_2 состоит в ингибировании чувствительного к окислению каталитического центра протеинтирозинфосфатаз [342, 343, 344], которые дефосфорилируют активную аутофосфорилированную форму рецептора инсулина, тем самым ограничивая время жизни активной фосфорилированной формы рецептора. Поэтому инсулин-индуцированная H_2O_2 играет важную роль в увеличении времени жизни активной аутофосфорилированной формы рецептора и выступает в роли сигнала инсулина (здесь и далее «окислительного сигнала инсулина»), который направлен на увеличение времени жизни рецептора инсулина в активном состоянии. Однако, неизвестно, является ли окислительная сигнализация инсулина общим механизмом для всех тканей или это тканеспецифичный механизм подавления активности протеинтирозинфосфатаз в адипоцитах. Неизвестно также, насколько общим источником инсулин-чувствительной H_2O_2 являются НАДФН-оксидазы. Предположительно митохондрии также могут выступать источником окислительного сигнала инсулина с учетом того, что митохондрии активно производят H_2O_2 при высоком значении мембранного потенциала [345]; янтарная кислота, субстрат сукцинатдегидрогеназы (СДГ), обеспечивает самую высокую скорость генерации H_2O_2 в сравнении с другими респираторными субстратами [346]; а инсулин оказывает почти немедленное (секунды) стимулирующее действие на окисление [2,3- ^{14}C]-сукцината в респираторной цепи митохондрий [347, 348].

Целью исследований, представленных в этой главе, было изучение насколько общим сигнальным механизмом является окислительная сигнализация инсулина в инсулин-чувствительных тканях, а также выявление роли митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и изучение связи между окислительным сигналом инсулина и активностью протеинтирозинфосфатаз.

3.2 Роль митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и ингибировании протеинтирозинфосфатаз

Цель исследования – выяснить, индуцирует ли инсулин образование H_2O_2 в образцах печени, взятых от здоровых крыс, участвует ли митохондрия в генерации окислительного сигнала инсулина и влияет ли окислительный сигнал инсулина на общую активность протеинтирозинфосфатаз (ПТФ) в печени.

Для выяснения влияния добавок на скорость выделения H_2O_2 в срезах печени, срезы инкубировали 10 мин с 1 мкЕд/мл инсулина, 1 мЕд/мл инсулина плюс 2 мМ малоновой кислоты, 2 мМ янтарной кислоты, а также без добавок (контроль). Инкубация срезов печени с инсулином более, чем в 10 раз увеличила скорость выделения H_2O_2 ($p < 0,001$), а также более, чем в три раза снизила активность ПТФ ($p < 0,001$) в сравнении с контролем (Таблица 5).

Таблица 5 - Влияние инсулина на скорость выделения H_2O_2 и активность протеинтирозинфосфатаз в срезах печени крыс ([91]).

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 ($n=10$).

Малонат, ингибитор СДГ, статистически значимо снизил эффекты инсулина на скорость выделения H_2O_2 ($p < 0,001$) и на ингибирование ПТФ ($p < 0,001$), а сукцинат сам по себе статистически значимо повысил скорость генерации H_2O_2

($p < 0,001$) и ингибировал активность ПТФ в печени ($p < 0,001$). В совокупности эти результаты указывают на то, что окислительный сигнал инсулина имеет место в печени, инсулин стимулирует быстрый выброс H_2O_2 в печени, функцию инсулин-чувствительного источника H_2O_2 выполняет респираторная цепь митохондрий, где СДГ играет ключевую роль в генерации H_2O_2 .

Для определения характеристик эффекта инсулина, была изучена временная зависимость ингибирования ПТФ инсулином в печени (Рисунок 5).

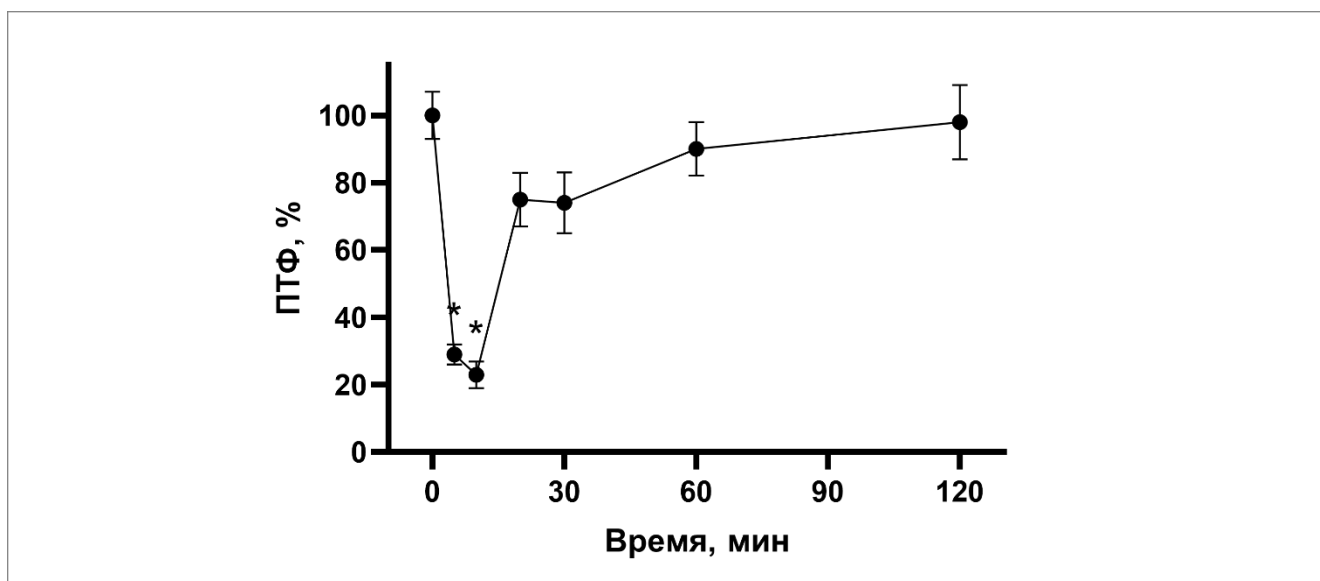


Рисунок 5 - Временная зависимость эффекта инсулина на активность ПТФ ([91]). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=10$). * $p < 0,05$ по сравнению с исходной величиной.

Было найдено, что инсулин быстро и обратимо снижал активность ПТФ в образцах печени здоровых крыс, причем максимальный эффект ингибирования достигался на временах 5-10 мин, что соответствует временам, на которых достигается максимальное фосфорилирование (активация) инсулинового рецептора после стимуляции инсулином.

В отсутствие стимуляции инсулином сукцинат дозозависимо подавлял активность ПТФ в печени, но этот эффект достигался только при высоких супрафизиологических дозах сукцината в миллимолярном диапазоне его концентраций (Рисунок 6).

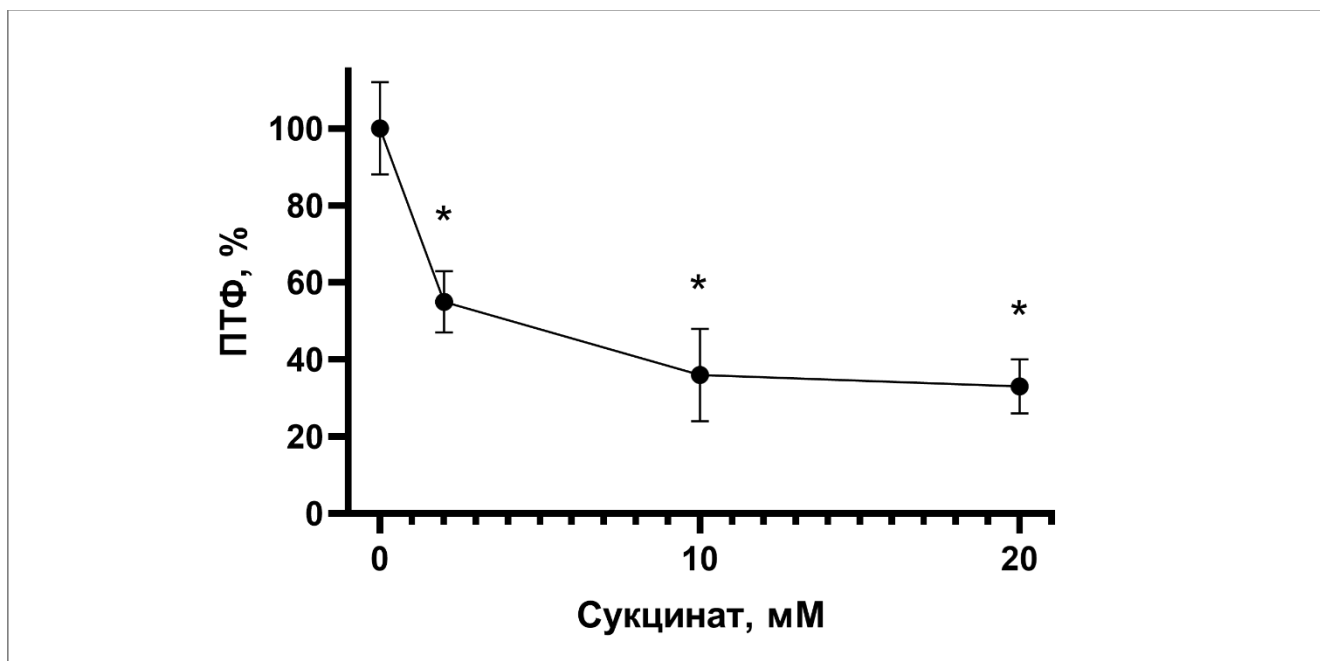


Рисунок 6 - Дозовая зависимость эффекта сукцината на активность ПТФ ([91]). Результаты представлены как $M \pm m$ ($n=10$). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Для того, чтобы выяснить, опосредуется ли ингибирующий эффект сукцината на активность ПТФ повышением генерации H_2O_2 , образцы печени инкубировали с сукцинатом в присутствии каталазы (Таблица 6).

Таблица 6 - 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 ($n=10$).

Было найдено, что каталаза полностью блокировала эффект инактивации ПТФ сукцинатом, из чего следует, что ингибирующие эффекты сукцината на активность ПТФ опосредуются H_2O_2 .

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показано, что окислительный сигнал инсулина не является тканеспецифичным для жировой

ткани, но имеет место по меньшей мере еще в одной инсулин-чувствительной ткани – в печени.

Кроме того, впервые показано, что митохондрия является источником окислительного сигнала инсулина. До этого, единственным известным источником окислительного сигнала инсулина были НАДФН-оксидазы адипоцитов.

Инсулин-стимулированный выброс H_2O_2 в печени имеет признаки сигнала, так как ингибирует ПТФ, негативный регулятор инсулиновой сигнализации. Значимость этого сигнала инсулина состоит в том, что, ингибируя ПТФ, он подавляет дефосфорилирование рецептора, обеспечивая тем самым поддержание высокой активности инсулинового рецептора в течение периода стимуляции инсулином. Максимальный эффект ингибирования ПТФ достигался на временах 5-10 мин, что соответствует временам, на которых достигается максимальное фосфорилирование инсулинового рецептора после начала стимуляции инсулином.

Впервые показано, что сукцинатдегидрогеназа комплекса II респираторной цепи митохондрий вовлечена в производство инсулин-индуцированного H_2O_2 сигнала, так как этот H_2O_2 сигнал ингибировался малонатом, конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Этот результат согласуется с известными данными, что в интервале физиологических и умеренно супрафизиологических концентраций сукцината <400 мкМ источником H_2O_2 является флавиновый сайт II_F комплекса II, который ингибируется малонатом [351].

Впервые показано, что сукцинат индивидуально может поддерживать генерацию H_2O_2 и ингибирование ПТФ в печени, однако этот эффект сукцината в отсутствие инсулина наблюдается только при высоких миллимолярных супрафизиологических концентрациях сукцината.

Предположительная схема взаимодействия окислительного сигнала инсулина и ПТФ в печени с учетом результатов настоящего исследования и литературных данных представлена на Рисунке 7.

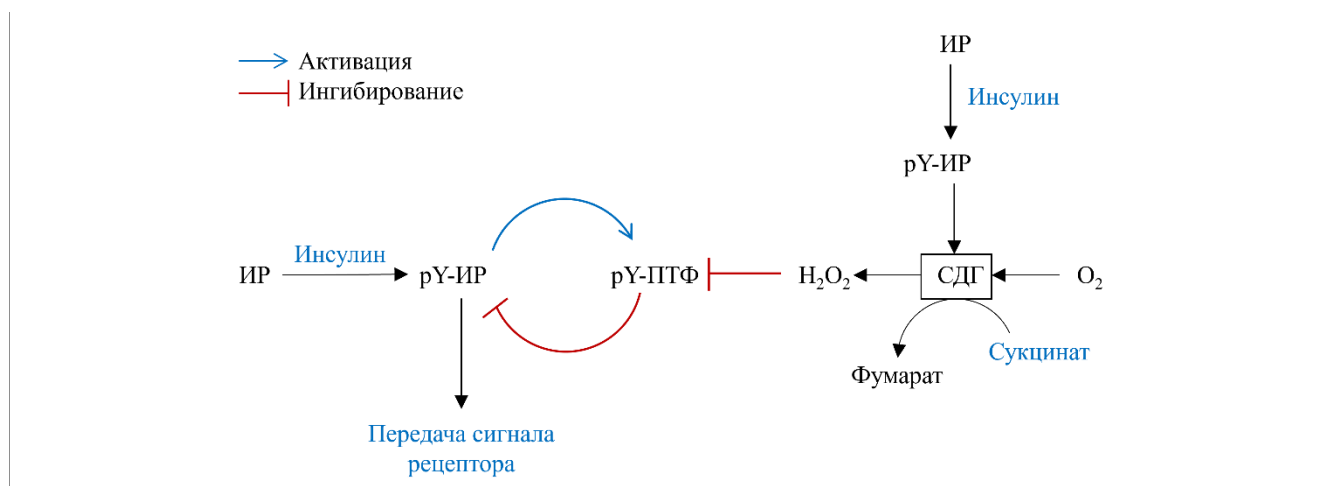


Рисунок 7 - Схема взаимодействия окислительного сигнала инсулина и протеинтирозинфосфатаз в печени в условиях стимуляции инсулином. Инсулин вызывает переход рецептора (ИР) в активную фосфорилированную форму (рУ-ИР), которая фосфорилирует и активирует протеинтирозинфосфатазу (рУ-ПТФ), которая в свою очередь дефосфорилирует и инактивирует рУ-ИР (см. главу 1). Настоящее исследование показывает, что инсулин вызывает выброс H₂O₂ в печени за счет реакции окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой (СДГ) митохондрий. Инсулин-индуцированная H₂O₂ ингибирует чувствительный к окислению каталитический сайт ПТФ, тем самым предотвращая дефосфорилирование и инактивацию рУ-ИР и поддерживая рецептор в активном состоянии.

3.3 Влияние инсулина на скорость генерации H₂O₂ митохондриями

Физиологический интервал концентраций сукцината в сыворотке крови человека, находящегося в покое, составляет 1–10 мкМ [352], хотя может повышаться до 125 мкМ при выполнении физических упражнений и задержке дыхания при нырянии [353].

Цель исследования – изучить влияние инсулина на кинетику генерации H₂O₂ митохондриями печени и сердца в интервале физиологически релевантных концентраций сукцината ≤80 мкМ.

Митохондрии, выделенные из тканей, предварительно обработанных инсулином в течение 1 мин, имели значимо более высокие скорости генерации H₂O₂

($p < 0,01$) по сравнению с контрольными при использовании сукцината в качестве респираторного субстрата в интервале его физиологически релевантных концентраций от 0 до 80 мкМ (Рисунок 8).

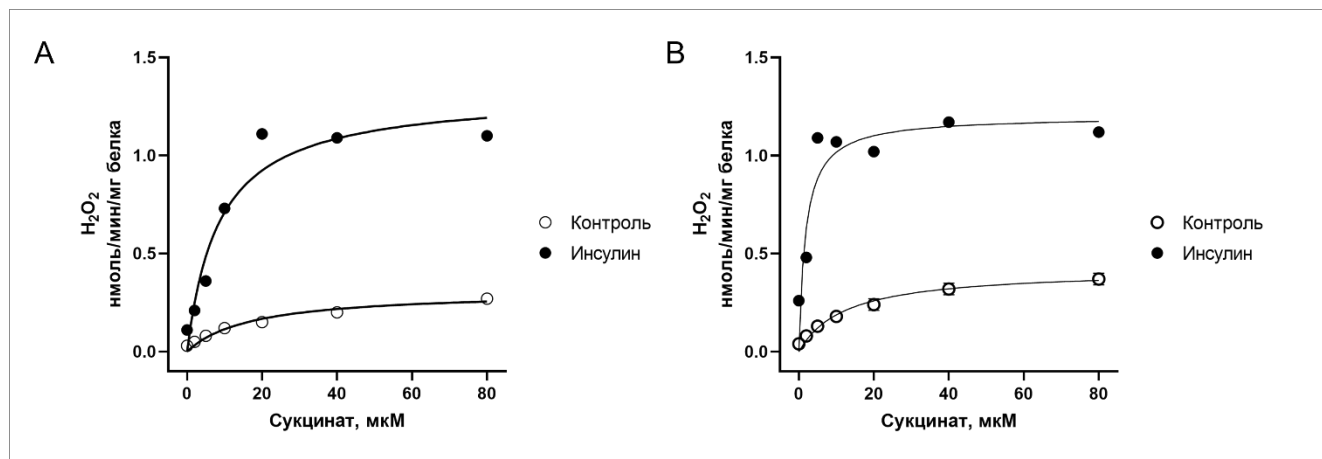


Рисунок 8 - Эффект инсулина на скорость генерации H_2O_2 митохондриями сердца (А) и печени (В) ([92]). Митохондрии были выделены из сердца и печени крыс без (контроль) или с предобработкой инсулином (инсулин). Символы – экспериментальные данные (среднее из трех независимых экспериментов); линии - расчетные кривые по уравнению Михаэлиса-Ментен.

Экспериментально наблюдаемая зависимость начальной скорости генерации H_2O_2 изолированными митохондриями печени и сердца от концентрации сукцината удовлетворительно описывалась уравнением Михаэлиса-Ментен (Уравнение 3):

$$V = V_{max} \times S / (K_m + S) \quad (3)$$

где V – начальная скорость генерации H_2O_2 ; S – начальная концентрация сукцината; V_{max} – максимальная скорость генерации H_2O_2 ; и K_m – константа Михаэлиса.

В терминах уравнения Михаэлиса-Ментен предобработка тканей инсулином многократно увеличила V_m по сравнению с контролем (Рисунок 9; Таблица 7).

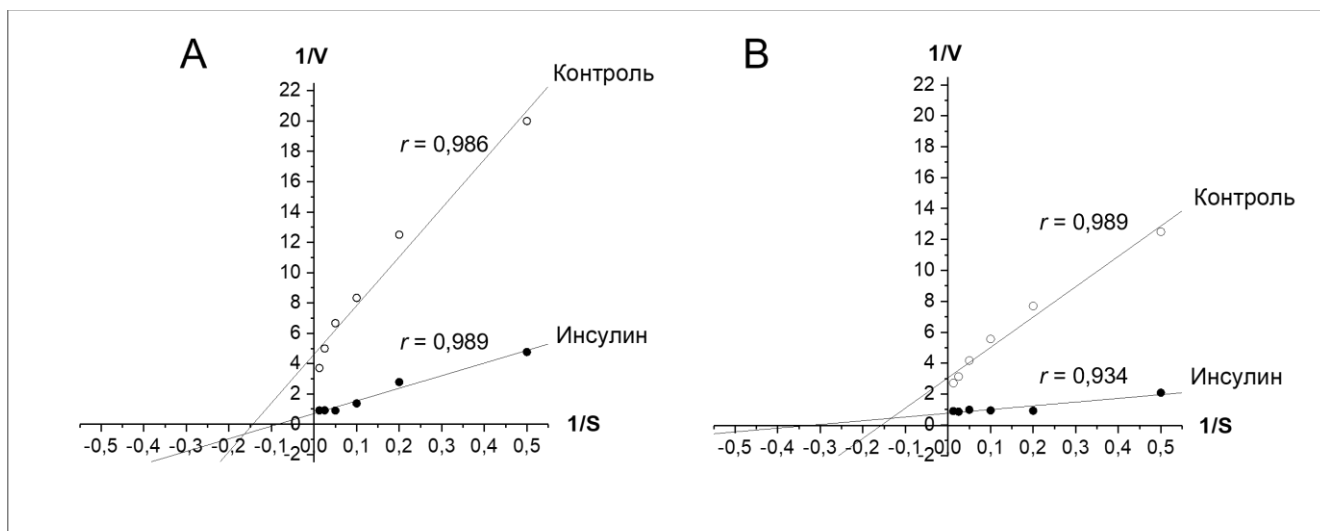


Рисунок 9 - Зависимость скорости генерации H_2O_2 митохондриями сердца (А) и печени (В) от концентрации сукцината в двойных обратных координатах. Митохондрии были выделены из тканей без (контроль) или с предобработкой инсулином (инсулин). Экспериментальные данные представлены как среднее из трех независимых экспериментов; V – скорость генерации H_2O_2 ; S – концентрация сукцината; r – коэффициент корреляции Пирсона.

Следует отметить, что эффект увеличения скорости генерации H_2O_2 митохондриями был кратковременным, и при увеличении времени обработки тканей инсулином до 5 мин наблюдаемые величины скорости генерации H_2O_2 выделенными из этих тканей митохондриями не отличались от контрольных значений.

Таблица 7 - Расчетные параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для зависимости скорости выделения H_2O_2 изолированными митохондриями от концентрации сукцината.

Предобработка ткани	V_{\max} , нмоль/мин на 1 мг белка	K_m , мкМ	Коэффициент корреляции r
Митохондрии сердца			
Нет (контроль)	0,22	7,0	0,986
Инсулин	1,41	11,7	0,989
Митохондрии печени			
Нет (контроль)	0,33	6,4	0,989
Инсулин	1,32	3,2	0,934

Инсулин не вызывал существенного повышения скорости генерации H_2O_2 в митохондриях, выделенных из жировой ткани, преинкубированной с инсулином в течение 1 мин. Более того, сами значения скорости выделения H_2O_2 с сукцинатом, взятым в качестве респираторного субстрата, были очень низкими. Для иллюстрации сравнение скоростей выделения H_2O_2 митохондриями, выделенными из жировой ткани, по сравнению с митохондриями, выделенными из сердца крыс показаны на Рисунке 10, а параметры V_{max} и K_m уравнений Михаэлиса-Ментен, удовлетворительно описывающих эти процессы, показаны в Таблице 8.

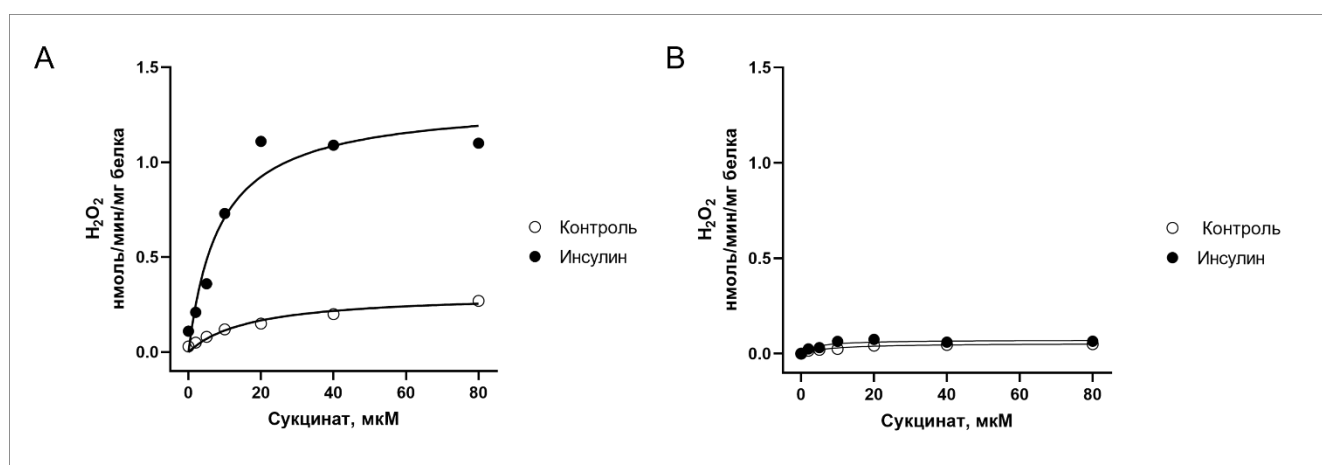


Рисунок 10 - Скорость генерации H_2O_2 митохондриями сердца (А) и жировой ткани (В). Митохондрии были выделены из соответствующих тканей без (контроль) или с предобработкой инсулином (инсулин). Символы – экспериментальные данные (среднее из трех независимых экспериментов); линии - расчетные кривые по уравнению Михаэлиса-Ментен.

Таблица 8 - Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для скорости выделения H_2O_2 митохондриями жировой ткани.

Предобработка ткани	V_{max} , нмоль/мин на 1 мг белка	K_m , мкМ
Нет (контроль)	0,054	7,8
Инсулин	0,071	3,5

В настоящем исследовании впервые показано, что окислительный сигнал инсулина не ограничивается жировой тканью и печенью, а имеет место по меньшей мере еще в одной инсулин-чувствительной ткани – в сердце.

Кроме того показано, что кратковременная предобработка инсулином многократно увеличивает скорость генерации H_2O_2 в митохондриях сердца и печени, и этот эффект достигается при физиологически релевантных концентрациях сукцината в интервале ≤ 80 мкМ. Дозовая зависимость окислительного сигнала инсулина от концентрации сукцината удовлетворительно описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, причем наибольший прирост сигнала обеспечивают концентрации сукцината менее 10 мкМ, что соответствует уровню сукцината в крови человека, находящегося в состоянии покоя [352].

В то же время инсулин не вызывает значимого изменения скоростей генерации H_2O_2 в митохондриях жировой ткани с сукцинатом в качестве респираторного субстрата. Более того, сами скорости выделения H_2O_2 митохондриями жировой ткани намного ниже, чем в печени и сердце. Это указывает на то, что окислительный сигнал инсулина в жировой ткани не имеет митохондриальной природы, что согласуется с литературными данными, где окислительный сигнал инсулина, вовлеченный в ингибирование ПТФ генерировался НАДФН-оксидазой Nox4 [90]. С учетом роли окислительного сигнала в поддержании высокой активности инсулинового рецептора наличие разных источников окислительного сигнала в разных тканях является предпосылкой для дифференциальной чувствительности тканей к инсулину.

Существование дозовой зависимости окислительного сигнала инсулина от концентрации сукцината в печени и сердце указывает на то, что сукцинат может быть использован для лечения локальной инсулиновой резистентности в этих тканях, как средство, поддерживающее инсулиновый рецептор в активном состоянии путем ингибирования ПТФ, дефосфорилирующих активную фосфорилированную форму инсулинового рецептора.

3.4 Выводы по главе 3:

1. Показано, что окислительный сигнал инсулина не является тканеспецифичным для адипоцитов, но имеет место в других инсулин-чувствительных тканях, по меньшей мере еще в печени и сердце.

2. Впервые показано, что 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.

3. Впервые показано, что ключевую роль в генерации окислительного сигнала инсулина играет реакция окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой комплекса II респираторной цепи митохондрий.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОНАХ

4.1 Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах

Инсулин вызывает фосфорилирование ИР в нейронах в дозо- и время-зависимой манере. Экспериментальная кривая зависимости фосфорилирования рецептора инсулина от концентрации инсулина в первичной культуре гранулярных нейронов мозжечка крысы представлена на Рисунке 11.

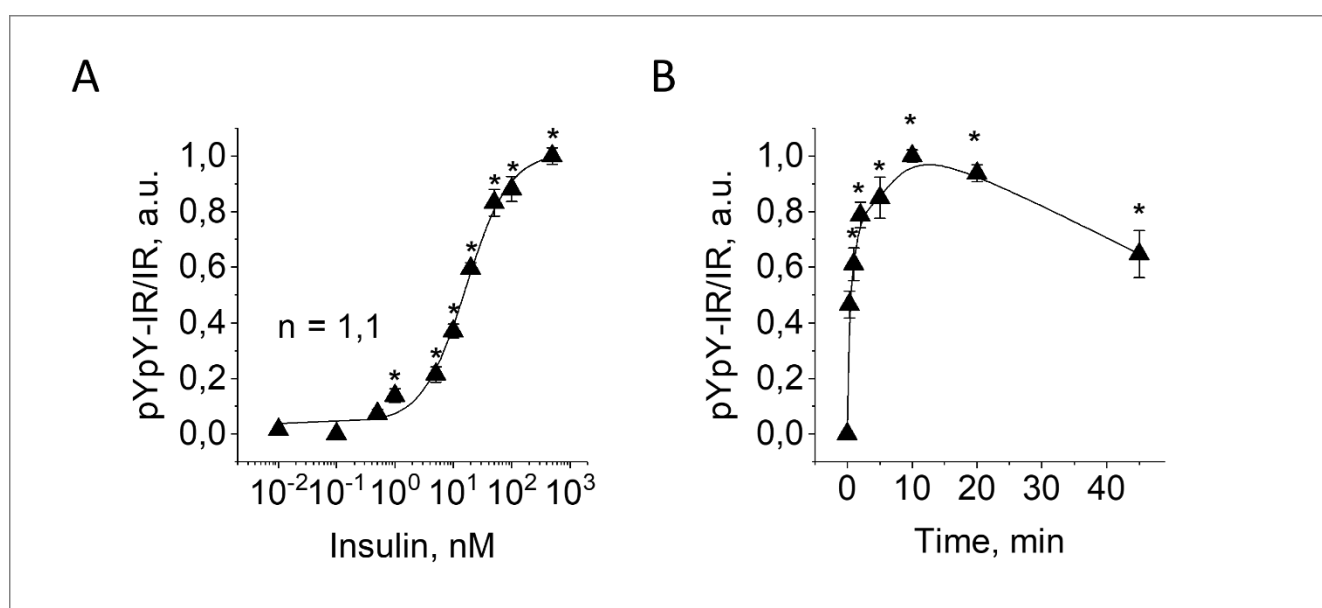


Рисунок 11 - Дозовая (А) и временная (В) зависимость фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах ([357]). (А) Культуры гранулярных нейронов мозжечка крыс инкубировали с 0,5 – 500 нМ инсулина в течение 10 минут и измеряли фосфорилирование рецептора (pYpY-IR/IR). Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR, полученных от пяти до девяти культур. * $p < 0,05$ в сравнении с нестимулированным контролем. (В) Культуры нейронов инкубировали с 100 нМ инсулина в течение 0 – 45 минут и измеряли фосфорилирование рецептора (pYpY-IR/IR). Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR, полученных от трех до четырех культур. * $p < 0,05$ в сравнении с исходным значением.

Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах удовлетворительно подчиняется базовой эмпирической модели фармакодинамики Emax, которая

описывает нелинейную зависимость ответа (в данном случае фосфорилирования) от концентрации агониста (в данном случае концентрации инсулина) с использованием четырех параметров, каждый из которых имеет эмпирически однозначную интерпретацию, Уравнение 3:

$$E = \frac{Emax \times [Ins]}{EC_{50} + [Ins]} \quad (3)$$

где E – фосфорилирование рецептора инсулина; $Emax$ – максимальное фосфорилирование рецептора инсулина; EC_{50} – концентрация инсулина, при которой достигается полумаксимальное фосфорилирование рецептора инсулина; $[Ins]$ – концентрация инсулина. Согласно полученным экспериментальным результатам полумаксимальное фосфорилирование рецептора достигается при концентрации инсулина $16,3 \pm 2,2$ нМ, а аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла дает Хилла $n = 1,1$ (коэффициент корреляции $R^2 = 0,99$), что указывает на постепенное увеличение фосфорилирования (т.е., активации) рецепторов с повышением дозы инсулина по гиперболическому закону ($n \sim 1$) при отсутствии отрицательной кооперативности, что характерно для изоформы А рецептора и совпадает с данными, что нейроны экспрессируют исключительно изоформу А рецептора инсулина. Максимальное фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах достигается в интервале 5 – 10 минут после стимуляции инсулином (Рисунок 11В).

Опираясь на полученные результаты, 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 Роль митохондрий в генерации окислительного сигнала инсулина и регуляции фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах

Инсулиновые рецепторы широко распространены в мозге [18, 19, 21, 22]. Фосфорилирование β -цепи инсулинового рецептора по трем остаткам тирозина

Y1146, Y1150 и Y1151 (нумерация ИР-А) в составе тирозинкиназного домена является ключевой посттрансляционной модификацией, приводящей к главному конформационному изменению, открывающему неограниченный доступ субстратов и АТФ к каталитическому сайту киназы и примерно 200-кратному увеличению тирозинкиназной активности рецептора [80, 81, 82]. В главе 3 показано, что митохондрия играет роль источника окислительного сигнала инсулина в печени и сердце, причем сигнал формируется за счет окисления сукцината в комплексе II митохондрий. Однако, неизвестно, существует ли окислительный сигнал инсулина в мозге и если да, неизвестно, насколько этот сигнал влияет на активность инсулинового рецептора в нейронах.

Поэтому цель исследования состояла в том, чтобы изучить, имеет ли место окислительная сигнализация инсулина в нейронах, участвует ли реакция окисления сукцината в респираторной цепи митохондрий в генерации инсулин-стимулированной сигнальной H_2O_2 в нейронах, и изучить роль окислительного сигнала инсулина в фосфорилировании инсулиновых рецепторов в нейронах.

Чтобы выяснить, стимулирует ли инсулин продукцию H_2O_2 в нейронах, было измерено накопление H_2O_2 в течение 1 мин в инкубационной среде культуры нейронов мозжечка в присутствии или в отсутствие 100 нМ инсулина.

Стимуляция инсулином вызвала многократное увеличение высвобождения H_2O_2 из нейронов до среднего уровня 66 ± 12 нМ, хотя базовое высвобождение H_2O_2 в отсутствие стимуляции инсулином было ниже предела обнаружения анализа (7 нМ). В этой же концентрации инсулин статистически значимо увеличил уровень фосфорилирования ИР ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 12).

N-ацетилцистеин (NAC), эффективная ловушка H_2O_2 , а также малонат, ингибитор СДГ комплекса II митохондрий, и протонифор FCCP, вызывающий деполяризацию митохондрий через диссипацию протонного градиента, уменьшали уровень инсулин-индуцированной H_2O_2 и статистически значимо снижали уровень фосфорилирования ИР ($pYpY-IR/IR$) в нейронах ($p < 0,05$) по сравнению с

контрольными нейронами, стимулированными той же концентрацией инсулина, но в отсутствие ингибиторов (Рисунок 12).

Таким образом, окислительный сигнал инсулина имеет место в нейронах, имеет митохондриальное происхождение и необходим для фосфорилирования рецепторов инсулина в нейронах.

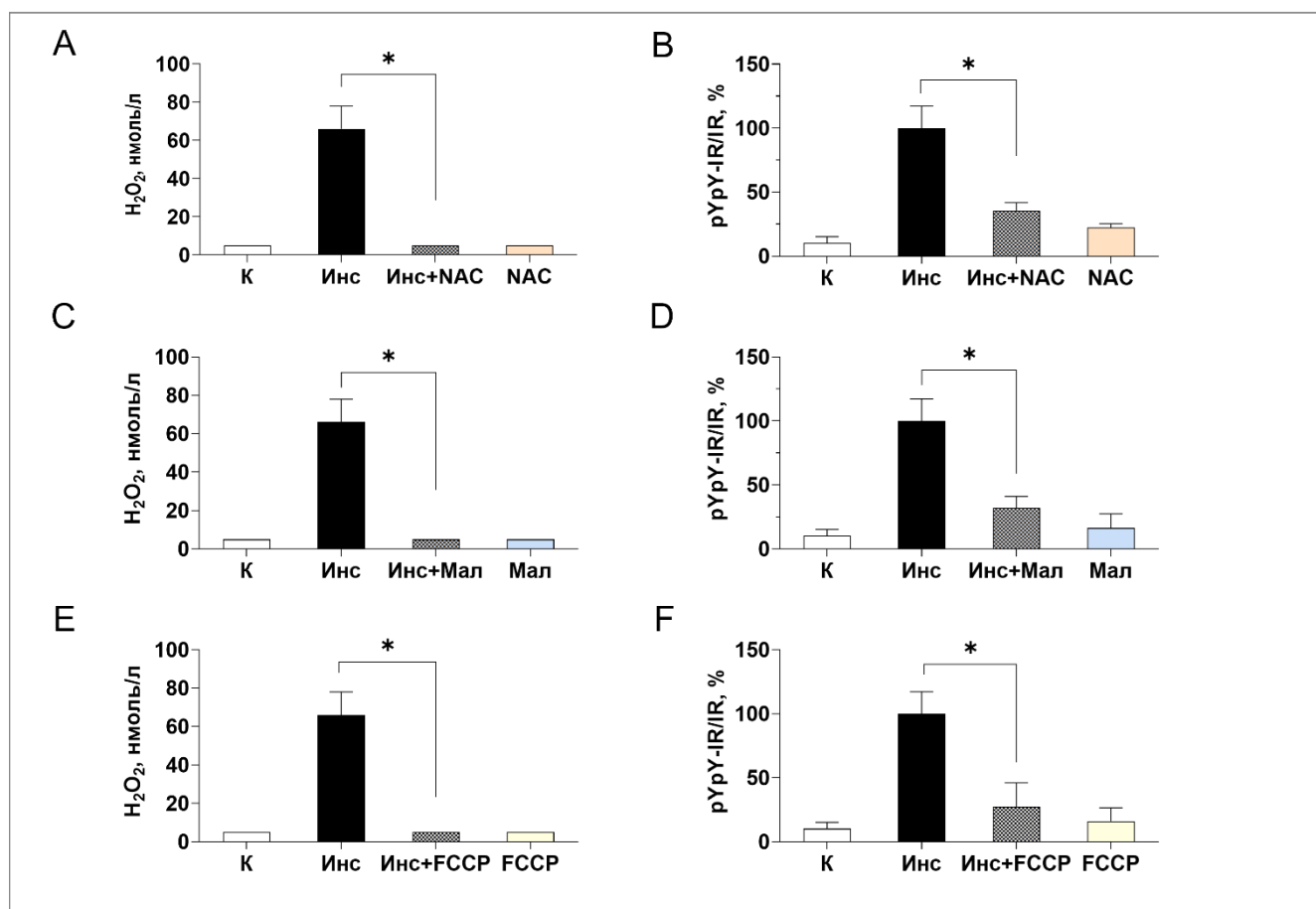


Рисунок 12 - Влияние ингибиторов на стимулированную инсулином продукцию H₂O₂ и фосфорилирование рецептора инсулина в нейронах ([355]). Культуры гранулярных нейронов мозжечка крыс инкубировали в отсутствие (К) или в присутствии 100 нМ инсулина (Инс) с добавками ингибиторов (А, В) 5 мМ N-ацетилцистеина (NAC), (С, D) 2 мМ малоната (Мал) или (Е, F) 0,5 мкМ FCCP (FCCP). Результаты представлены как M ± s концентраций H₂O₂ (А, С, Е) в среде инкубации через 1 мин после введения инсулина или как M ± s значений pYpY-IR/IR (В, D, F) через 20 мин после введения инсулина, полученных от четырех до девяти культур. Пунктирная линия указывает предел обнаружения анализа H₂O₂ (7

нМ). (B) * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. † $p < 0,05$ по сравнению с инсулином (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Чтобы подтвердить, что реакция окисления сукцината вовлечена в фосфорилирование ИР в нейронах, было изучено фосфорилирование ИР в ответ на физиологически релевантную концентрацию инсулина 5 нМ без или с физиологически релевантной концентрацией 50 мкМ сукцината, субстрата СДГ митохондрий. Было найдено, что сукцинат не влиял на фосфорилирование ИР в отсутствие инсулина, но статистически значимо более, чем в 2 раза повысил уровень фосфорилирования ИР в присутствии инсулина ($p < 0,05$) по сравнению с эффектом той же концентрации инсулина, но в отсутствие сукцината, тем самым подтверждая, что комплекс II митохондрий вовлечен в активацию рецептора инсулина в нейронах (Рисунок 13).

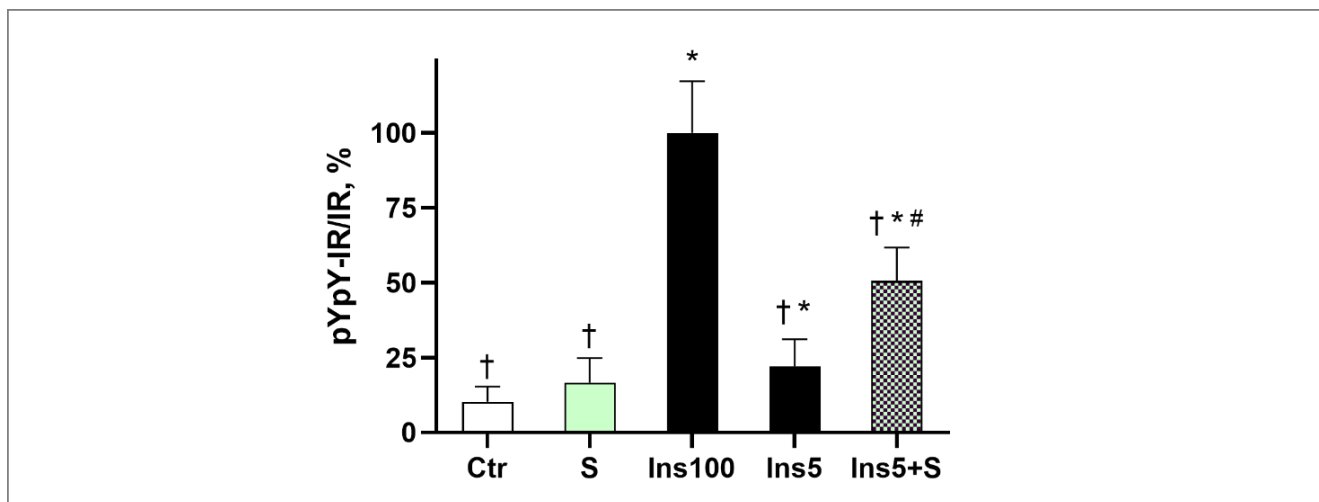


Рисунок 13 - Влияние сукцината на стимулированное инсулином фосфорилирование рецептора инсулина в культуре нейронов ([355]). Культуры нейронов мозжечка инкубировали с 5 нМ инсулина (Ins5), 100 нМ инсулина (Ins100), 50 мкМ сукцината (S), 5 нМ инсулина и 50 мкМ сукцината (Ins5+S), или без добавок (Ctr) в течение 20 минут. Результаты представлены как $M \pm s$ значений pYpY-IR/IR в % от ответа на 100 нМ инсулина, полученных от четырех до девяти культур. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем. † $p < 0,05$ по сравнению с 100 нМ инсулина. # $p < 0,05$ по сравнению с 5 нМ инсулина (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

В целом, эти результаты указывают на то, что сукцинатдегидрогеназа комплекса II митохондрий играет ключевую роль в генерации окислительного сигнала инсулина.

Известно, что белок $G\alpha_{12}$, чувствительный к ингибированию коклюшным токсином (РТХ), играет роль посредника между ИР и НАДФН-оксидазой, генерирующей окислительный сигнал инсулина в адипоцитах [363]. Для того, чтобы выяснить играет ли роль активность G-белков, ингибируемых коклюшным токсином (pertussis toxin, РТХ), в генерации окислительного сигнала инсулинов в нейронах, а также выяснить степень их влияния на фосфорилирование рецептора инсулина, были исследованы эффекты РТХ, на выработку H_2O_2 и фосфорилирование рецепторов в нейронах мозжечка.

Коклюшный токсин (РТХ), ингибитор G_i/o сигнализации, снижал выброс H_2O_2 и ингибировал фосфорилирование ИР в ответ на инсулин (Рисунок 14).

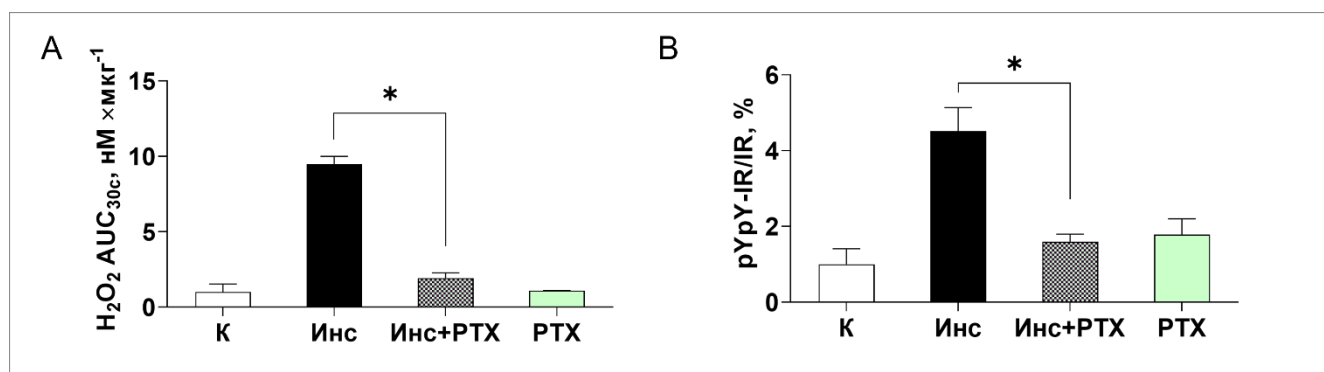


Рисунок 14 - Влияние РТХ на стимулированное инсулином фосфорилирование рецептора инсулина в культуре нейронов ([355]). Культуры гранулярных нейронов мозжечка крыс инкубировали в отсутствие (К) или в присутствии 100 нМ инсулина (Инс) с добавкой 2 мг/л коклюшного токсина (РТХ). Результаты представлены как $M \pm m$ концентраций H_2O_2 (А) в среде инкубации через 1 мин после введения инсулина или как $M \pm s$ значений pYpY-IR/IR (В) через 20 мин после введения инсулина, полученных от четырех до девяти культур. Пунктирная линия указывает предел обнаружения анализа H_2O_2 (7 нМ). (В) * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. † $p < 0,05$ по сравнению с инсулином (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Полученные результаты указывают на роль Gi-белковой сигнализации в генерации окислительного сигнала в нейронах, функция которой по аналогии с известной ролью $G\alpha_{i2}$ в адипоцитах может состоять в передаче сигнала инсулина от ИР к сайту генерации окислительного сигнала, в данном случае митохондрии.

Таким образом, настоящее исследование впервые указывает на существование неизвестного ранее сигнального пути в активации рецептора инсулина в нейронах, 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.

В настоящем исследовании впервые показано, что окислительный сигнал инсулина необходим для фосфорилирования нейронального инсулинового рецептора и ингибирование этого сигнала полностью запрещает активацию рецептора инсулина даже в присутствии наивысших эффективных концентраций инсулина. N-ацетилцистеин, эффективная ловушка перекиси водорода, полностью удалял сигнальную H_2O_2 и подавлял фосфорилирование инсулинового рецептора инсулином. Так же точно ингибиторы образования сигнальной H_2O_2 , малонат и FCCP, статистически значимо подавляли фосфорилирование инсулинового рецептора в ответ на инсулин.

Кроме того, в настоящем исследовании впервые показано, что фосфорилированием рецептора инсулина можно управлять не только варьируя концентрацию инсулина, но варьируя также концентрации сукцината, респираторного субстрата и метаболита цикла трикарбоновых кислот. Сукцинат в концентрации 50 мкМ почти в 3 раза повышал уровень фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах при стимуляции низкой дозой инсулина, релевантной концентрациям инсулина, вызывающим ответ в мозге человека [99].

4.3 Кинетика окислительного сигнала инсулина в нейронах

Цель исследования – изучить кинетические характеристики окислительного сигнала инсулина в нейронах.

Для того, чтобы определить кинетические характеристики окислительного сигнала инсулина, культуру нейронов мозжечка стимулировали инсулином и измеряли скорость высвобождения H_2O_2 из нейронов с использованием непроницающего флуоресцентного красителя Amplex Red в период 120 с до и 120 с после стимуляции инсулином. Исследование 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 (Рисунок 14А).

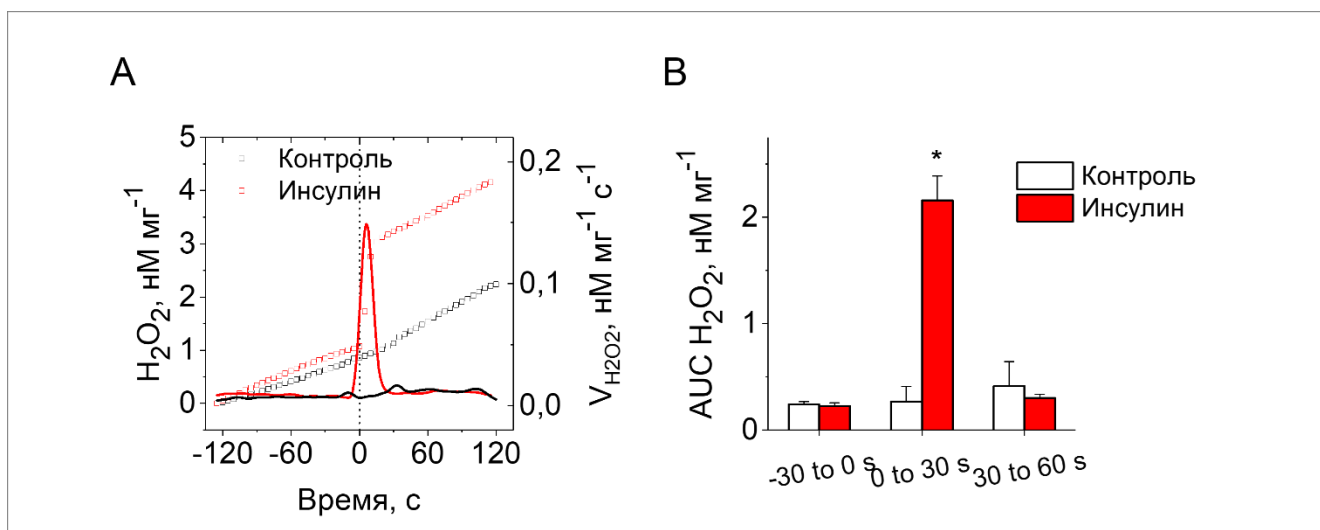


Рисунок 14 - Кинетика генерации окислительного сигнала инсулина в нейронах ([357]). (А) Средние значения концентрации H_2O_2 в среде инкубации (левая ось Y, символы) и скорости выделения H_2O_2 нейронами (правая ось Y, линии) без стимуляции (контроль) и со стимуляцией инсулином (инсулин); данные от десяти культур. (В) Площади под кривой для прироста концентраций H_2O_2 (AUC) в среде инкубации нейронов без (контроль) или с инсулином (инсулин) в указанные отрезки времени. Инсулин или среду (контроль) вводили в точке 0 с. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Известно, что H_2O_2 легко проникает через клеточные мембраны с временем формирования градиента <1 с [358], поэтому изменения концентраций H_2O_2 во внеклеточной среде быстро повторяет изменения концентраций H_2O_2 внутри клетки. Инсулин вызывает кратковременный одиночный всплеск H_2O_2 с пиком 5 – 10 с, причем сравнение площадей под кривыми концентраций H_2O_2 в период до стимуляции инсулином, в первые 30 с после стимуляции и в период от 30 до 60 с после стимуляции показывает, что все статистически значимые изменения происходят только в интервале первых 30 с после стимуляции инсулином (Рисунок 14В).

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 [374, 375], а длительность окислительного сигнала (<30 с) вполне согласуется с известными временами перехода между активным и неактивным состояниями СДГ [373, 376].

Сопоставление временных характеристик окислительного сигнала инсулина и фосфорилирования инсулинового рецептора показывает, что окислительный сигнал инсулина предшествует фосфорилированию рецептора. Максимум индуцированного инсулином сигнала H_2O_2 достигает пика через 5 – 10 с, тогда как фосфорилирование рецептора достигает пика через 10 минут после начала стимуляции инсулином. На 20-й секунде стимуляции инсулином, когда H_2O_2 сигнал

был завершен на 95%, фосфорилирование рецептора все еще продолжало нарастать (Рисунок 15).

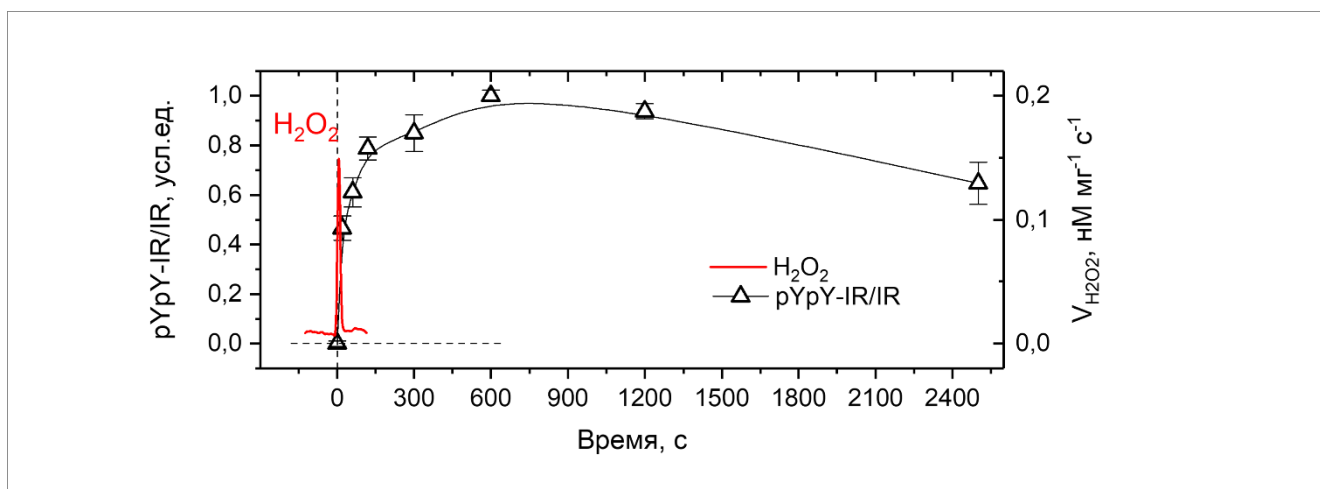


Рисунок 15 - Сравнение кинетики генерации окислительного сигнала инсулина и кинетики фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах ([357]). Кривая временной зависимости фосфорилирования инсулинового рецептора в ответ на стимуляцию 100 нМ инсулина (левая ось Y, черные символы и линия). Кривая скорости изменений концентраций H_2O_2 в среде инкубации (правая ось Y, красная линия).

Малонат и РТХ, ингибиторы СДГ и G_i/o сигнализации, соответственно, снижали амплитуду окислительного сигнала инсулина во временном интервале 0–30 с (Рисунки 16А и 16С).

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 и РТХ показывает, что ингибирование окислительного сигнала инсулина в первые 30 секунд стимуляции инсулином достаточно для того, чтобы вызвать статистически значимое гипофосфорилирование ИР (Рисунки 16В и 16D).

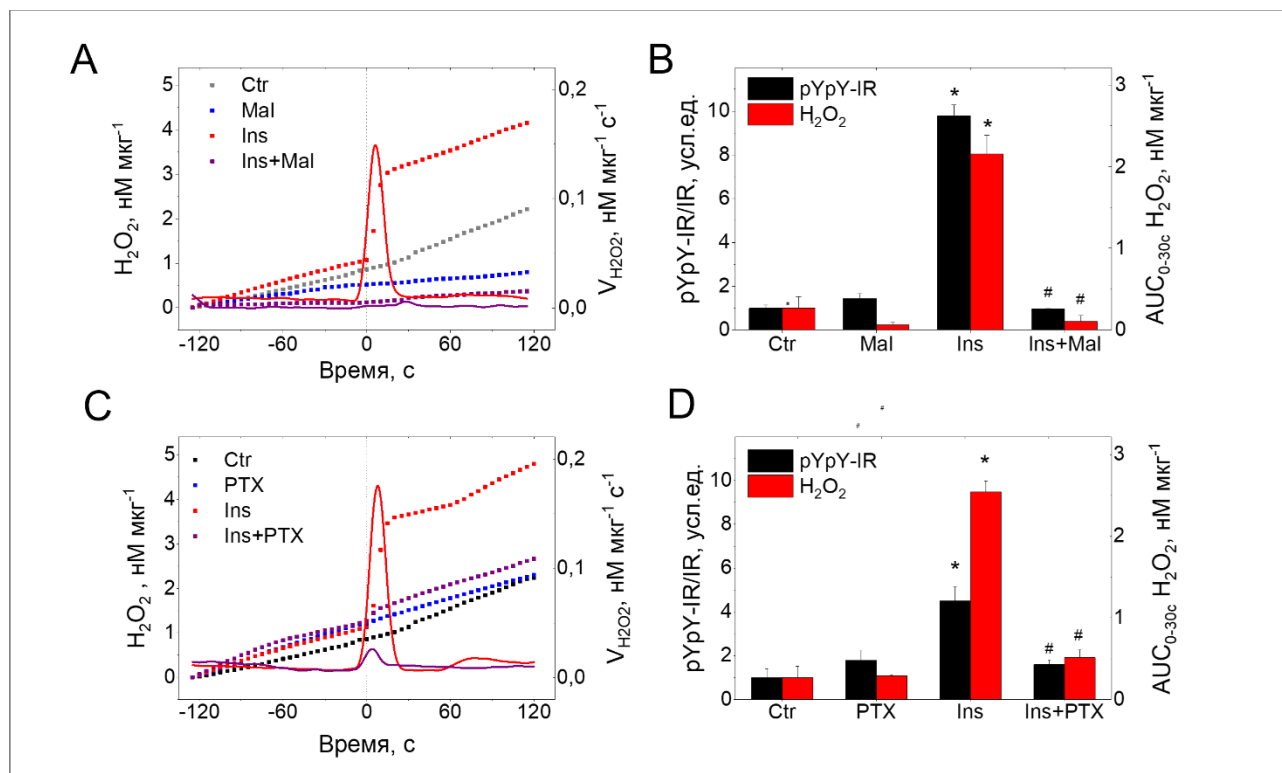


Рисунок 16 - Эффекты малоната и РТХ на кинетику генерации окислительного сигнала инсулина и фосфорилирование ИР в нейронах. Эффекты малоната (А) и РТХ (С) на концентрацию H_2O_2 в среде инкубации (левая ось Y, символы) и средние значения скорости выделения H_2O_2 (правая ось Y, линии) в гранулярных нейронах 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.

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 Сверхчувствительность фосфорилирования рецептора инсулина к окислительному сигналу инсулина в нейронах

Для того, чтобы выяснить характер зависимости фосфорилирования инсулинового рецептора от ингибирования окислительного сигнала инсулина, было изучено влияние возрастающих концентраций N-ацетилцистеина, ловушки H_2O_2 , на фосфорилирование рецептора инсулина в культурах нейронов мозжечка крыс в присутствии 100 нМ инсулина.

НАС в дозозависимой манере ингибировал фосфорилирование рецепторов инсулина (Рисунок 17).

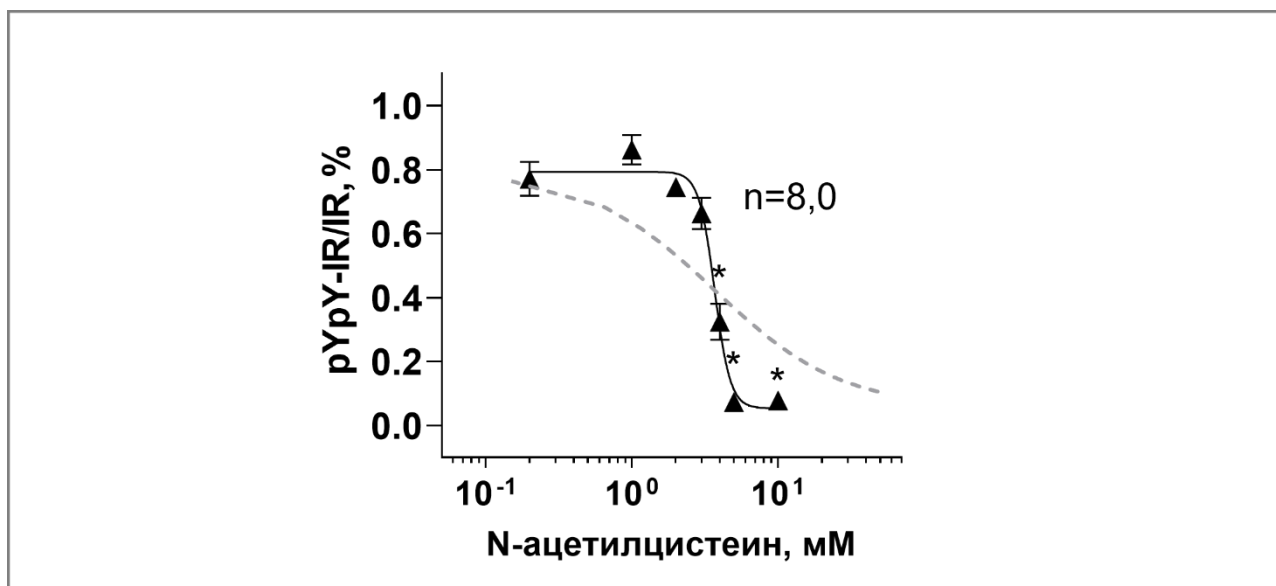


Рисунок 17 - Зависимость фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах от концентрации N-ацетилцистеина ([357, 359]). Нейроны мозжечка инкубировали с 100 нМ инсулина в течение 10 минут в присутствии N-ацетилцистеина. Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR (символы), полученных от трех до семи культур. * $p < 0,05$ в сравнении с 100 нМ инсулина. Сплошная линия — аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла ($n = 8,0$). Пунктирная линия — расчетная кривая при коэффициенте Хилла $n = 1,0$.

Аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла дает параметры уравнения IC_{50} $3,7 \pm 0,2$ мМ и коэффициент Хилла $n = 8,0 \pm 2,3$ ($R^2 = 0,97$). Необычно высокое значение коэффициента Хилла означает, что наблюдаемая зависимость «концентрация-ответ» является высоко сигмоидальной, то есть даже небольшое повышение НАС в окрестности полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} ведет к резкому и полному падению фосфорилирования рецептора. Такой тип ответа, наблюдаемый при значениях $n \gg 1$, т.е., согласно более чувствительный к изменению концентрации ингибитора, чем гиперболический ответ Михаэлиса-Ментен, в литературе определяют как «сверхчувствительность», а концентрация, в окрестностях которой происходит резкое изменение ответа, называется пороговой [360, 361]. Для сравнения на Рисунке 17 показана также расчетная кривая для случая постепенных изменений, наблюдаемых при обычном гиперболическом ответе Михаэлиса-Ментен (коэффициент Хилла $n = 1$).

Для выяснения характера зависимости фосфорилирования рецептора от ингибирования сукцинатдегидрогеназы, было изучено влияние малоната, ингибитора СДГ, на фосфорилирование рецептора инсулина в ответ на 100 нМ инсулина в культурах нейронов мозжечка (Рисунок 18).

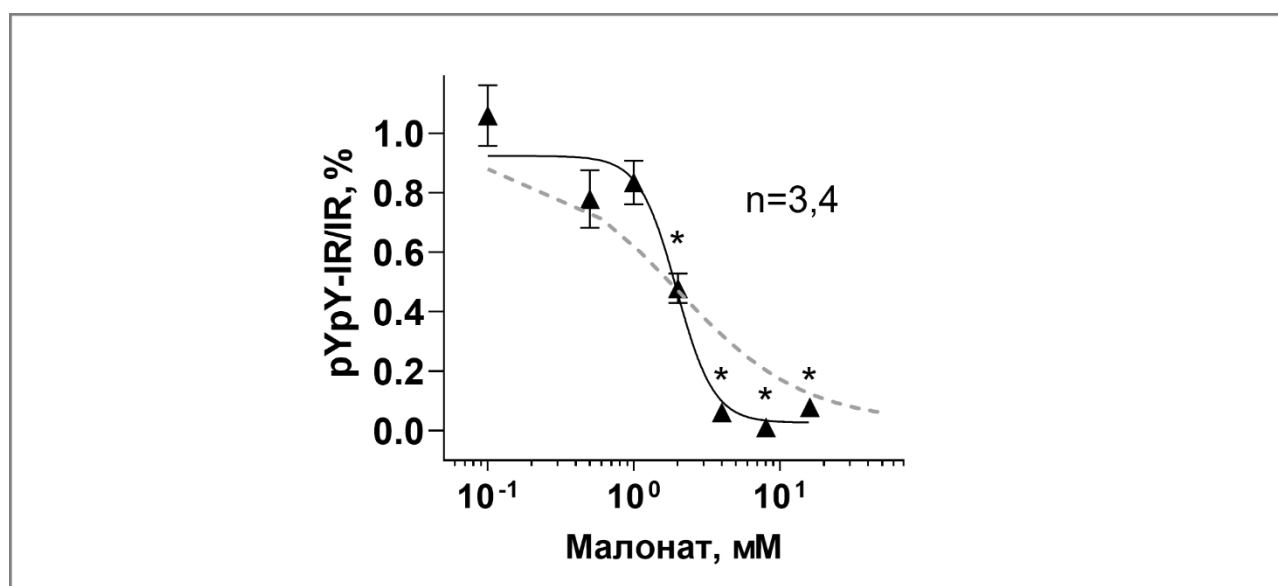


Рисунок 18 - Зависимость фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах от концентрации малоната ([357, 359]). Нейроны мозжечка инкубировали с 100 нМ инсулина в течение 10 минут в присутствии малоната. Результаты представлены как

$M \pm m$ значений $pYpY-IR/IR$ (черные символы), полученных от трех до семи культур. * $p < 0,05$ в сравнении с 100 нМ инсулина в отсутствие малоната. Сплошная линия – аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла ($n = 3,4$). Пунктирная линия – расчетная кривая при коэффициенте Хилла $n = 1,0$.

Малонат в дозозависимой манере ингибировал фосфорилирование рецепторов. Аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла дает параметры уравнения $IC_{50} 2,0 \pm 0,3$ мМ и коэффициент Хилла $n = 3,4$ ($R^2 = 0,92$). Высокое значение коэффициента Хилла указывает на сверхчувствительность фосфорилирования рецептора к ингибированию активности СДГ, то есть даже небольшое изменение активности СДГ около определенного порога может иметь драматический эффект на фосфорилирование рецептора инсулина и вызывать нейрональную инсулиновую резистентность из-за гипофосфорилирования инсулинового рецептора.

Полученные результаты предполагают, что фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах проявляет сверхчувствительность к окислительному сигналу инсулина, и даже небольшое снижение окислительного сигнала ниже порогового значения вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора в ответ даже на самую высокую дозу инсулина (здесь 100 нМ).

Для получения более полного представления, насколько высока чувствительность фосфорилирования инсулинового рецептора к ингибированию других возможных компонентов сигнального пути окислительного сигнала инсулина, были изучены эффекты ротенона, ингибитора комплекса I митохондрий, коклюшного токсина, ингибитора белковой G_i -сигнализации, и FCCP, протонофора, на фосфорилирование рецепторов в нейронах, стимулированных 100 нМ инсулина.

Эффект ротенона на фосфорилирование был статистически значимым, но неполным, и даже в присутствии самой высокой концентрации ротенона фосфорилирование ИР снижалось не более, чем на 50% (Рисунок 19).

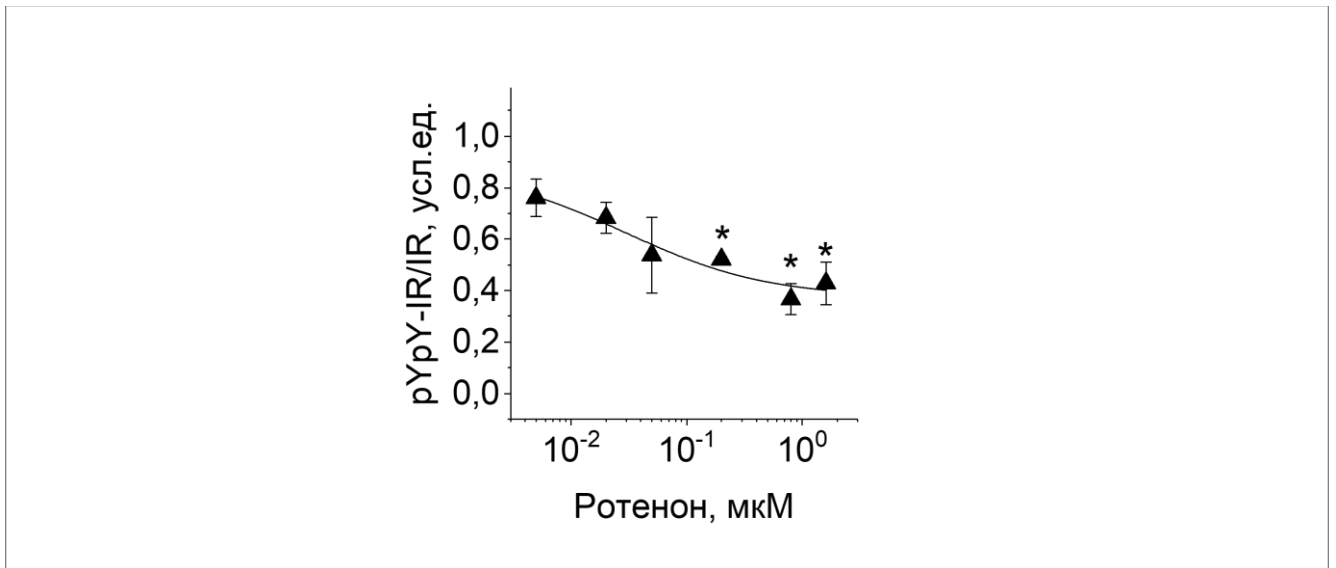


Рисунок 19 - Зависимость фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах от концентрации ротенона ([357]). Культуры гранулярных нейронов мозжечка были инкубированы с 100 нМ инсулина в течение 10 минут в присутствии ротенона. Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR, полученных от трех до четырех культур. * $p < 0,05$ в сравнении с 100 нМ инсулина в отсутствие ротенона.

Аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла дает коэффициент Хилла $n = 0,7$ ($R^2 = 0,83$), что указывает на низкую чувствительность фосфорилирования ИР в нейронах к ингибированию комплекса I митохондрий, ниже, чем обычный гиперболический ответ Михаэлиса-Ментен.

Таким образом, фосфорилирование ИР в нейронах в ответ на инсулин мало чувствительно к ингибированию комплекса I митохондрий.

FCCP вызывал статистически значимое снижение фосфорилирования рецептора инсулина в ответ на инсулин, причем эффект FCCP повышался с повышением его концентрации (Рисунок 20).

Аппроксимация экспериментальной кривой фосфорилирования ИР функцией Хилла дает значение $IC_{50} 0,07 \pm 0,02$ мкМ ($R^2 = 0,98$) и коэффициент Хилла $n = 1,5$ ($R^2 = 0,98$). Высокое значение коэффициента Хилла указывает на высокую чувствительность фосфорилирования рецептора к деполяризации митохондрий, выше, чем гиперболический ответ Михаэлиса-Ментен, то есть относительно небольшое падение протонного градиента через внутреннюю мембрану

митохондрий способно вызывать вызывать гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нейрональную инсулиновую резистентность.

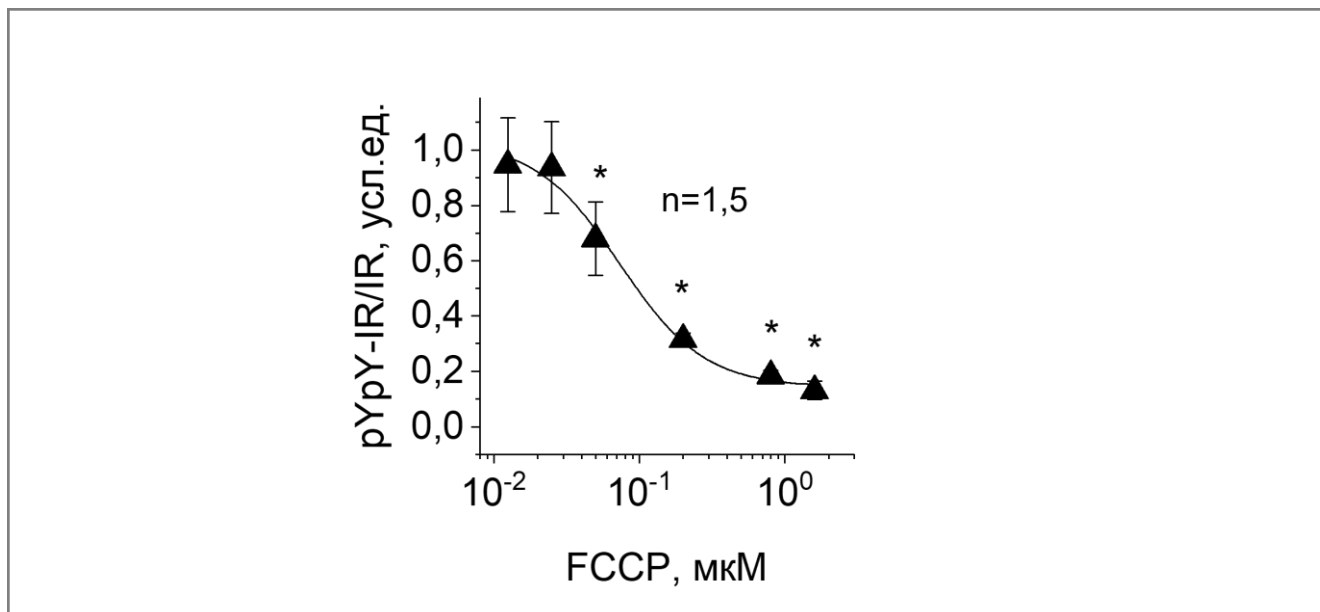


Рисунок 20 - Зависимость фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах от концентрации FCCP ([357]). Культуры гранулярных нейронов мозжечка были инкубированы с 100 нМ инсулина в течение 10 минут в присутствии FCCP. Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR, полученных от трех до четырех культур. * $p < 0,05$ в сравнении с 100 нМ инсулина в отсутствие FCCP.

Коклюшный токсин, ингибитор белковой Gi/o-сигнализации, вызывал статистически значимое снижение фосфорилирования рецептора инсулина в ответ на инсулин, причем эффект РТХ повышался с ростом его концентрации и при самой высокой исследованной концентрации практически полностью ингибировал фосфорилирование ИР (Рисунок 21).

Аппроксимация экспериментальной кривой функцией Хилла дает параметры уравнения $IC_{50} 0,16 \pm 0,06$ мг/л и коэффициент Хилла $n = 1,7 \pm 2,0$ ($R^2 = 0,96$). Высокое значение коэффициента Хилла $n > 1$ указывает на повышенную чувствительность фосфорилирования инсулиновых рецепторов в нейронах к активности белковой Gi/o-сигнализации, выше, чем гиперболический ответ Михаэлиса-Ментен, то есть относительно небольшое падение активности белковой

$G_{i/o}$ -сигнализации способно вызывать вызывать гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нейрональную инсулиновую резистентность.

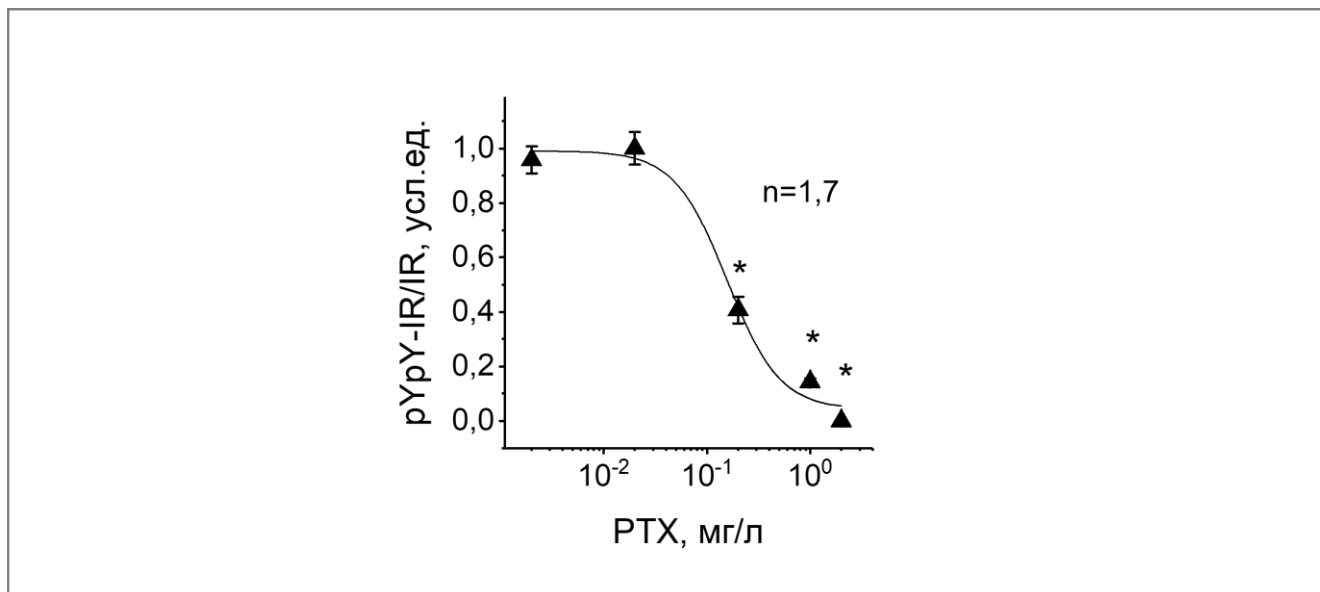


Рисунок 21 - Зависимость фосфорилирования рецептора инсулина в нейронах от концентрации РТХ ([357]). Культуры гранулярных нейронов мозжечка были инкубированы с 100 нМ инсулина в течение 10 минут в присутствии РТХ. Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR, полученных от трех до четырех культур. * $p < 0,05$ в сравнении с 100 нМ инсулина в отсутствие РТХ.

Эффекты ингибиторов окислительного сигнала инсулина на фосфорилирование ИР в нейронах в ответ на инсулин суммированы в Таблице 9.

Таблица 9 - Эффекты ингибиторов окислительного сигнала инсулина на фосфорилирование инсулинового рецептора.

Ингибитор	IC ₅₀	n	R ²	Интерпретация
НАС	3,7 мМ	8,0	0,97	Ловушка H ₂ O ₂
Ротенон	0,03 мкМ	0,7	0,83	Ингибитор комплекса I митохондрий
Малонат	2,0 мМ	3,4	0,92	Ингибитор комплекса II митохондрий
FCCP	0,07 мкМ	1,5	0,98	Протонофор
РТХ	0,16 мг/л	1,7	0,96	Ингибитор $G_{i/o}$ белков

Сокращения и обозначения: n – коэффициент Хилла; R – коэффициент корреляции нелинейной регрессии.

Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах проявляет высокую чувствительность к ингибиторам сигнального пути окислительного сигнала инсулина, за исключением ингибитора I комплекса митохондрий, что указывает на незначительную роль комплекса I в регуляции чувствительности инсулиновых рецепторов в нейронах.

Фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах проявляет сверхчувствительность к удалению самого окислительного сигнала ловушкой H_2O_2 , а также к ингибированию источника окислительного сигнала инсулина, сукцинатдегидрогеназы комплекса II митохондрий. 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 Эффект деполяризации митохондрий на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах

Согласно результатам настоящего исследования протонофор FCCP вызывал снижение фосфорилирования ИР вплоть до практически полного ингибирования последнего, из чего следует, что деполяризация митохондрий может быть одним из факторов, вызывающих гипофосфорилирование инсулинового рецептора.

Для того, чтобы выявить степень зависимости фосфорилирования рецептора инсулина от потенциала внутренней мембраны митохондрий $\Delta\Psi_m$, были изучены дозовые зависимости $\Delta\Psi_m$ от концентрации ротенона, ингибитора комплекса I

митохондрий, малоната, ингибитора комплекса II митохондрий, и FCCP, протонофора, вызывающего деполяризацию митохондрий через диссипацию протонного градиента. Флуоресценцию родамина 123 (F/F_0) использовали как меру, обратно пропорциональную величине $\Delta\Psi_m$ [362]. Полученные результаты показаны в сопоставлении с эффектами этих же ингибиторов на фосфорилирование ИР.

В предварительных опытах инсулин не оказывал влияния на флуоресценцию родамина 123 в нейронах.

Ротенон дозозависимо повышал как флуоресценцию родамина 123, т.е., снижал как $\Delta\Psi_m$, так и фосфорилирование инсулинового рецептора, но оба эти эффекта были относительно невелики, если сравнивать с эффектами малоната и FCCP (Рисунок 22А).

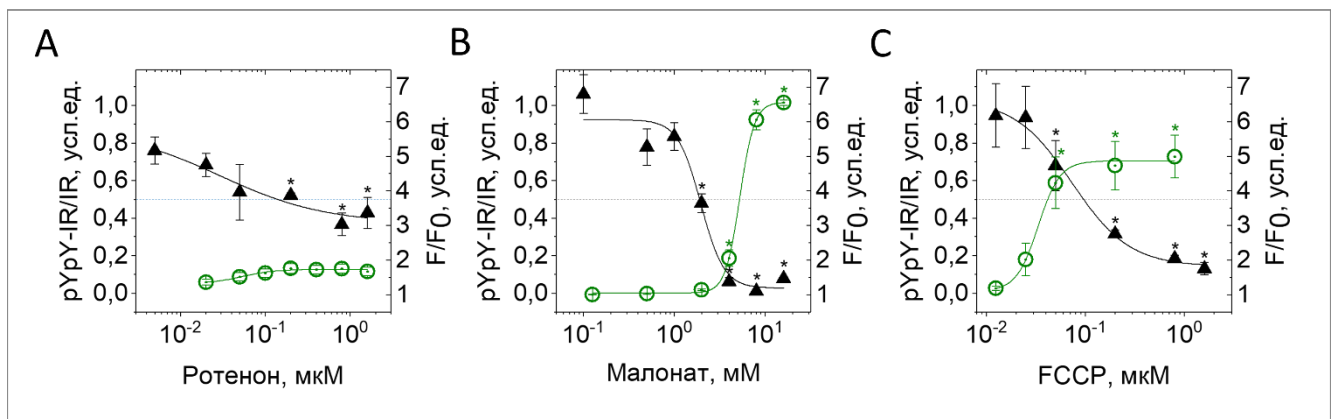


Рисунок 22 - Эффекты ротенона (А), малоната (В) и FCCP (С) на фосфорилирование ИР и $\Delta\Psi_m$ в нейронах в присутствии 100 нМ инсулина ([357]). Фосфорилирование ИР (левая ось Y, черные символы и линии). Флуоресценция родамина 123 (правая ось Y, зеленые символы и линии). Результаты представлены как $M \pm m$ значений pYpY-IR/IR и флуоресценции F/F_0 ($n=3-7$). * $p<0,05$ в сравнении с инсулином в отсутствие ингибиторов.

Малонат вызывал статистически значимое многократное увеличение флуоресценции родамина 123 (то есть падение $\Delta\Psi_m$) и снижение фосфорилирования рецептора инсулина с увеличением дозы (Рисунок 22В). Аппроксимация экспериментальной кривой флуоресценции функцией Хилла дает значение EC_{50} $5,2 \pm 0,1$ мМ и коэффициент Хилла $n = 5,4$ ($R^2 = 0,99$), что указывает

на сверхчувствительность потенциала внутренней мембраны митохондрий к ингибированию СДГ митохондрий. Сравнение кривых фосфорилирования и флуоресценции показывает, что при концентрации малоната 2 мМ, при которой происходит ингибирование фосфорилирования на 50%, митохондрии были деполяризованы менее чем на 1%. То есть ингибирование

фосфорилирования начинается при меньших концентрациях малоната, чем деполяризация митохондрий, из чего следует, что митохондриальная деполяризация не является причиной ингибирующего действия малоната на фосфорилирование рецепторов.

FCCP, являясь протонофором, индуцирует митохондриальную деполяризацию через диссипацию протонного градиента, поэтому исследование эффектов FCCP позволяет оценить влияние именно деполяризации митохондрий на фосфорилирование рецепторов инсулина. В настоящем исследовании FCCP вызывал статистически значимое многократное увеличение флуоресценции родамина 123 (падение $\Delta\Psi_m$) инсулина с увеличением концентрации (Рисунок 22С). Аппроксимация экспериментальной кривой флуоресценции к уравнению Хилла дает значение $EC_{50} 0,030 \pm 0,003$ мкМ ($R^2 = 0,99$) и коэффициент Хилла $n = 3,95$ ($R^2 = 0,99$), т.е., потенциал внутренней мембраны митохондрий сверхчувствителен к диссипации протонного градиента. При концентрации FCCP 0,07 мкМ, которая приводила к практически полной деполяризации митохондрий (>95%), фосфорилирование рецептора снижалось только на 50%, из чего следует, что эффект деполяризации в случае FCCP первичен по отношению к фосфорилированию. Существенное ингибирование фосфорилирования рецептора 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 инсулинового рецептора в ответ на инсулин и развития инсулиновой резистентности в нейронах.

4.6 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 сукцинатдегидрогеназа комплекса II митохондрий (Рисунок 23).

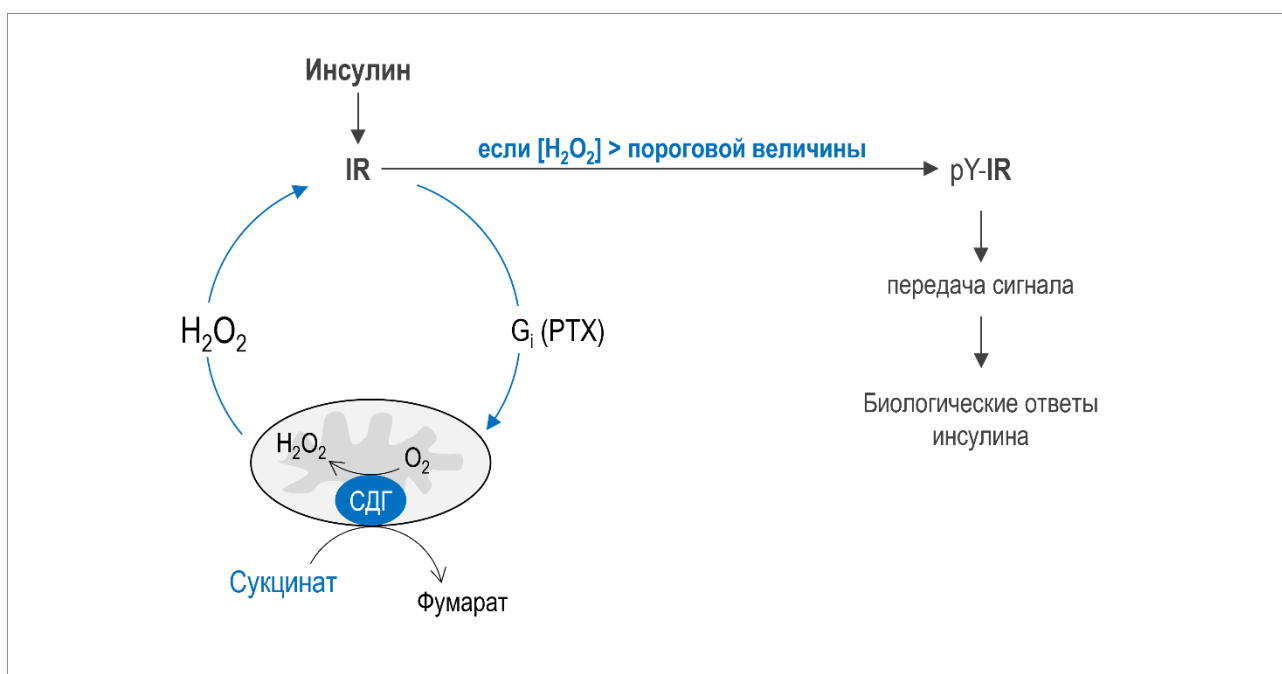


Рисунок 23 - Схема регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах окислительным сигналом инсулина ([357]). Связывание инсулинового рецептора (ИР) с инсулином вызывает кратковременное (<30 с) повышение скорости генерации окислительного сигнала инсулина (H_2O_2) в нейронах с участием реакции окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой (СДГ) комплекса II митохондрий, причем роль посредника между ИР и сайтом генерации H_2O_2 играет активность $G_{i/o}$ -белка (G_i), чувствительного к ингибированию коклюшным токсином (PTX). Фосфорилирование ИР 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).

Представленная схема регуляции чувствительности инсулинового рецептора в нейронах не противоречит уже известным данным о функциях отдельных элементов выявленного сигнального пути, но находится в согласии и дополняет эти данные.

Согласно научной литературе окисление способствует фосфорилированию инсулинового рецептора по критическим тирозинам, что необходимо для активации рецепторной тирозинкиназы. Окислители повышают фосфорилирование инсулинового рецептора через окисление цистеинов в составе β -цепи рецептора, эффект известный как “окислительное праймирование” рецептора []. Кроме того, окислители инактивируют каталитический сайт протеинтирозинфосфатаз, дефосфорилирующих и инактивирующих инсулиновый рецептор, тем самым повышая фосфорилирование инсулинового рецептора []. Существует сигнальный путь в адипоцитах, где инсулин-индуцированная эндогенная H_2O_2 ингибирует протеинтирозинфосфатазу PTP1B, тем самым способствуя повышению фосфорилирования инсулинового рецептора, причем элементами этого сигнального пути являются оксидаза Nox4, генерирующая H_2O_2 в ответ на инсулин, и G-белок $G\alpha_{i2}$, опосредующий передачу сигнала от рецептора к Nox4 [93, 363]. Таким образом, выявленный в настоящем исследовании сигнальный путь расширяет существующие представления о роли окислительной сигнализации в регуляции фосфорилирования инсулинового рецептора на новый тип клеток – нейроны.

Участие G-белковой сигнализации в передаче сигналов рецептора инсулина известно из научной литературы. Изоформа $G\alpha_{i2}$ из класса G-белков, способна к ассоциации с инсулиновым рецептором и влияет на фосфорилирование рецептора пропорционально степени такой ассоциации [93, 94, 95] и, кроме того, генерация окислительного сигнала инсулина с участием НАДФН-оксидаз в мембранах адипоцитах опосредуется изоформой $G\alpha_{i2}$ [93, 363], которая наряду с другими белками $G\alpha_{i/o}$ ингибируется коклюшным токсином [364]. В настоящем исследовании показано, что генерация окислительного сигнала инсулина в нейронах также ингибируется коклюшным токсином, что указывает на участие в процессе генерации сигнала неустановленного G-белка, вероятнее всего $G\alpha_{i2}$. Ранее считалось, что вся сигнализация с участием G-белков происходит в окрестности цитоплазматической мембраны, но к настоящему времени накопились данные о существовании так называемой неканонической внутриклеточной G-белковой сигнализации [365]. В частности, длинный вариант $G\alpha_{i2}$, так называемый $sG\alpha_{i2}$, который формируется за счет альтернативного сплайсинга, широко распространен в мозге млекопитающих, где обнаруживается в аксонах и в дендритах, на пресинаптических и постсинаптических участках нейронов, и во многих внутриклеточных компартментах, включая митохондрии [366].

Настоящее исследование показывает, что сукцинатдегидрогеназа играет роль источника окислительного сигнала инсулина в нейронах и окисление сукцината является источником окислительного сигнала инсулина в нейронах. Это согласуется с известным фактом, что инсулин оказывает почти немедленное (секунды) стимулирующее действие на окисление $[2,3-^{14}\text{C}]$ -сукцината в респираторной цепи митохондрий [347, 348], а также с тем фактом, что образование инсулин-индуцированной H_2O_2 митохондриями зависит от концентрации сукцината (см. раздел 3).

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) является частью митохондриального комплекса II, известного также как сукцинат-убихиноноксидоредуктаза, где происходит окисление сукцината до фумарата на флавиновом сайте II_F и восстановление

кофермента Q (CoQ) на сайте P_Q с образованием восстановленной формы CoQH_2 [367]. Генерация H_2O_2 в интервале физиологических и умеренно супрафизиологических концентраций сукцината (<200 мкМ) происходит на сайте P_F комплекса [351]. Во время окисления сукцината два электрона передаются от сукцината к флавину сайта P_F , а затем через сайт P_Q к CoQ и далее в респираторную цепь. Известно, что еще одним сайтом генерации митохондриальной H_2O_2 при патофизиологических миллимолярных концентрациях сукцината может быть комплекс I митохондрий за счет, как полагают, обратного трансфера электрона от комплекса II митохондрий [351]. С учетом этих обстоятельств наиболее вероятным сайтом формирования окислительного сигнала инсулина с участием сукцината является сайт F_{II} комплекса II митохондрий.

Функциональную роль выявленного в настоящем исследовании механизма регуляции чувствительности ИР в нейронах еще предстоит оценить. Предположительно, этот механизм может обеспечить избирательную активацию ИР только в работающих синапсах, не затрагивая остальные. Инсулин синтезируется в нейронах [28, 29, 30, 31] и хранится в синаптических везикулах, откуда выделяется в синаптическую щель в ответ на деполяризацию [32, 36]. Нейрональные инсулиновые рецепторы с наибольшей плотностью расположены в постсинаптической плотности дендритных шипиков в составе преимущественно возбуждающих синапсов [11]. При этом только меньшинство дендритных шипиков ($<10\%$) содержит митохондрии [390], что исключает массовую активацию ИР 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 [390], что создает условия для избирательной активации ИР только в синапсах, непосредственно вовлеченных в нейротрансмиссию, тем более, что инсулин также высвобождается

пресинаптическими нервными терминалами в ответ на нейрональную активность [32, 36].

4.7 Возможные причины гипофосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах

Выявленная в настоящем исследовании сверхчувствительность фосфорилирования инсулинового рецептора 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 окислением-восстановлением. Восстановленная форма СДГ является активной формой фермента, которая стабилизируется связыванием с сукцинатом, а неактивная, окисленная форма СДГ, стабилизируется в виде комплекса 1:1 с оксалоацетатом, продуктом последовательного превращения сукцината в фумарат, малат и, наконец, в оксалоацетат в цикле трикарбоновых кислот [368]. 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 [369]. Физиологическими активаторами-восстановителями СДГ являются сукцинат [370] и восстановленная форма кофермента CoQH_2 [371], 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 [372]; снижение концентрации CoQH_2 при окислении CoQH_2 комплексом III, которое происходит при низком

отношении АТФ/АДФ и в присутствии протонофоров, вызывающих деполяризацию митохондрий [373]; а также действие окислителей (H_2O_2), увеличивающих связывание оксалоацетата с СДГ митохондрий [374, 375].

С учетом критической роли окислительного сигнала инсулина в активации рецептора инсулина в нейронах, все факторы, негативно влияющие на условия генерации H_2O_2 сукцинатдегидрогеназой митохондрий, могут вызывать гипофосфорилирование инсулинового рецептора и развитие нейрональной инсулиновой резистентности в условиях, когда нет недостатка в инсулине (Рисунок 24).

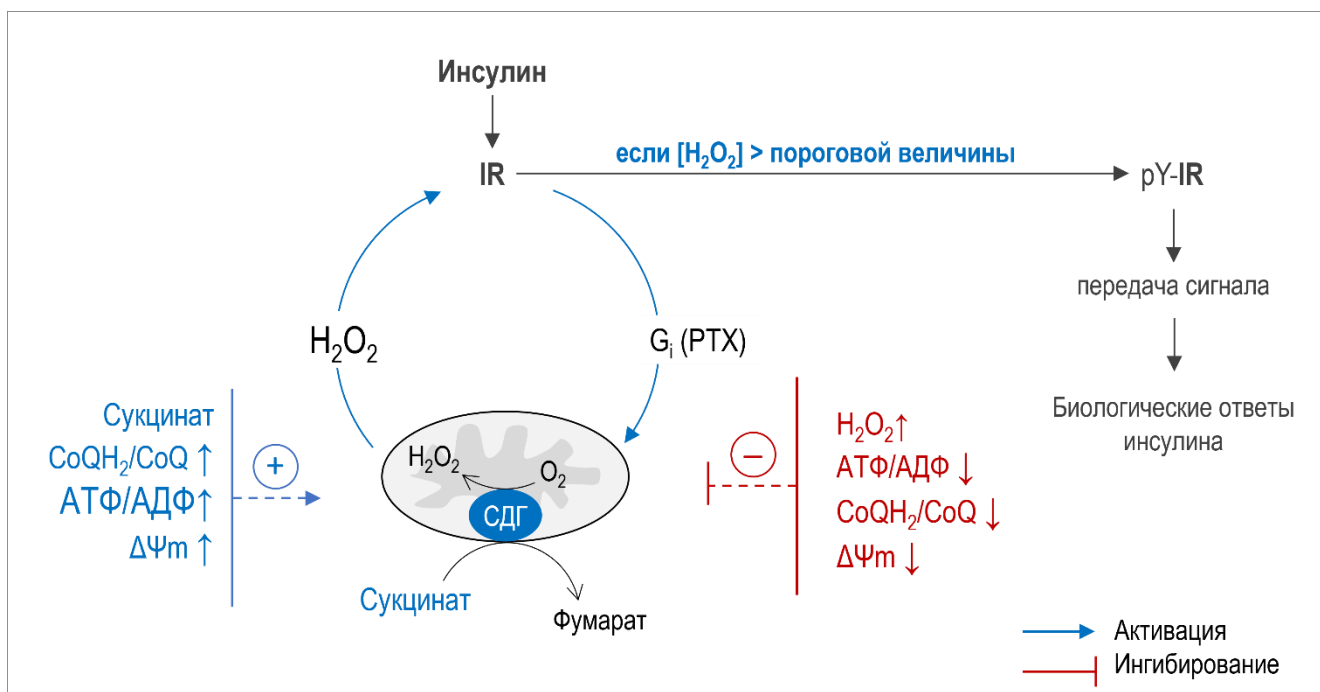


Рисунок 24 - Факторы, влияющие на активность сукцинатдегидрогеназы ([122]). Синим и красным показаны факторы, влияющие положительно и отрицательно на активность СДГ, и предположительно способные влиять на генерацию окислительного сигнала инсулина.

К таким факторам относятся окислительный стресс, низкое отношение АТФ/АДФ, низкое отношение $CoQH_2/CoQ$, деполяризация митохондрий и утечка протона через внутреннюю мембрану митохондрий. К противоположным факторам, положительно влияющим на чувствительность инсулинового рецептора в нейронах, относятся высокое отношение АТФ/АДФ, высокое отношение

CoQH₂/CoQ, высокий потенциал внутренней мембраны митохондрий и повышение концентраций сукцината в пределах физиологически релевантных концентраций С учетом сверхчувствительности фосфорилирования инсулинового рецептора к окислительному сигналу инсулина антиоксидантная система организма может вызывать гипофосфорилирование инсулиновых рецепторов в нейронах.

Кинетические характеристики окислительного сигнала инсулина в нейронах, а именно кратковременное действие в течение секунд и относительно низкая концентрация H₂O₂ даже в пике сигнала, фактически делают его «невидимым» для большинства эндогенных антиоксидантов, за исключением пероксиредоксинов (Prx) и глутатионпероксидазы (Gpx1), которые способны метаболизировать индуцированный инсулином H₂O₂ согласно кинетическим оценкам, основанным на опубликованных константах скорости второго порядка $\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ и данных об их количественном содержании в митохондрии и цитозоле [377, 378, 379]. Соответственно, Gpx1 и Prx как наиболее быстрые и эффективные антиоксидантные системы для элиминации H₂O₂ могут представлять собой барьер для окислительного сигнала инсулина, способствуя снижению активации инсулинового рецептора в нейронах в ответ на инсулин.

Использование в настоящем исследовании антиоксиданта N-ацетилцистеина для ингибирования окислительного сигнала инсулина было основано на том, что, хотя NAC малоэффективен в прямой неферментативной реакции с перекисью водорода, но, будучи субстратом Gpx1, он способен обеспечить высокие скорости удаления сигнальной H₂O₂ в ферментативной реакции [380].

Результаты настоящего исследования, указывающие на необходимость окислительного сигнала для активации инсулинового рецептора, согласуются с результатами опубликованных исследований *in vivo*, в которых показано, что повышение активности Gpx1 может приводить к инсулиновой резистентности. Мыши со сверхэкспрессией Gpx1 являются резистентными к инсулину, страдают ожирением и наряду с гиперинсулинемией демонстрируют 70% снижение стимулированного инсулином фосфорилирования рецепторов инсулина по

сравнению с контрольными мышами дикого типа [381]. Напротив, мыши, лишенные Gpx1, защищены от резистентности к инсулину, вызванной диетой с высоким содержанием жиров, в то время как введение N-ацетилцистеина, делает их еще более резистентными к инсулину [382].

Повышенная экспрессия Gpx1 и пероксиредоксинов обнаружена в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера, что является, как полагают, компенсаторной реакцией на окислительный стресс [383, 384]. По сравнению с возрастной нормой мозг этих пациентов характеризуется гипофосфорилированием рецептора инсулина [89] при значительной гиперэкспрессии Gpx1 [385, 386] и пероксиредоксинов Prx1 и Prx2 [387, 388, 389].

Существуют данные, что повышенная экспрессия Prx1 и пероксиредоксинов наблюдается и при других нейродегенеративных заболеваниях, таких как синдром Дауна, болезнь Хантингтона и болезнь Паркинсона [122], хотя связь между повышением экспрессии этих антиоксидантов и инсулиновой резистентностью пока не установлена.

В целом, сверхчувствительность фосфорилирования инсулиновых рецепторов в нейронах к ингибированию окислительного сигнала инсулина создает условия для гипофосфорилирования рецептора и возникновения нейрональной инсулиновой резистентности. Наиболее общими факторами, которые влияют на фосфорилирование рецептора инсулина в нейронах, являются деполяризация митохондрий и окислительный стресс. К деполяризации митохондрий могут приводить любые нарушения ионного гомеостаза, в том числе те, что развиваются в условиях церебральной ишемии. Влияние глутаматной эксайтотоксичности на инсулиновую сигнализацию в нейронах будет рассмотрено в следующей главе.

4.8 Выводы по главе 4:

1. 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).

2. Впервые показано, что митохондрия играет роль источника окислительного сигнала инсулина в нейронах, что позволяет по-новому оценить роль митохондрий в развитии нейрональной инсулиновой резистентности.

3. Впервые показано, что окислительный сигнал инсулина в нейронах представляет собой однократный выброс H_2O_2 с пиком 5 – 10 с и длительностью не более 30 с, генерируемый окислением сукцината в комплексе II митохондрий в ответ на инсулин.

4. Впервые показано, что окислительный сигнал инсулина предшествует фосфорилированию рецептора и необходим для фосфорилирования инсулинового рецептора в нейронах.

5. Впервые показано, что фосфорилирование рецептора инсулина проявляет сверхчувствительность к ингибированию окислительного сигнала инсулина, выражающуюся в резком падении фосфорилирования рецептора при достижении пороговой концентрации ингибитора даже в присутствии максимально эффективной концентрации инсулина, что является предпосылкой для гипофосфорилирования рецептора и развития нейрональной инсулиновой резистентности в условиях подавления окислительного сигнала.

6. Впервые показано, что фосфорилирование рецептора инсулина проявляет сверхчувствительность к ингибированию сукцинатдегидрогеназы комплекса II митохондрий, что является предпосылкой для нарушения активации инсулинового рецептора вследствие гипофосфорилирования в условиях снижения по какой-либо причине активности СДГ.

7. Впервые показано, что фосфорилирование рецептора инсулина ингибируется в условиях деполяризации внутренней мембраны митохондрий, что является предпосылкой для нарушения активации инсулинового рецептора вследствие гипофосфорилирования в этих условиях.

9. Обнаруженная в настоящем исследовании ультрачувствительность фосфорилирования инсулинового рецептора к действию модельных митохондриальных токсинов дает направление поиска патологических факторов, которые приводят к гипофосфорилированию рецептора инсулина и развитию нейрональной инсулиновой резистентности в условиях заболеваний ЦНС, в том числе при ишемическом инсульте.

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

5.1 Введение

Глутаматная эксайтотоксичность возникает при массовом выбросе глутамата синапсами в ответ на так называемую аноксическую деполяризацию, которая имеет место в острейшем периоде ишемического инсульта. Центральным событием в развитии эксайтотоксичности считается активация глутаматом NMDAR, что вызывает массовый приток Ca^{2+} в пост-синаптические терминалы нейронов в виде двух волн, быстрой обратимой первой волны, за которой следует вторая волна более значительного увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с одновременным падением потенциала внутренней мембраны митохондрий [169, 171, 174, 175, 176, 177]. С учетом ультрачувствительности фосфорилирования рецептора инсулина к деполяризации митохондрий, глутаматная эксайтотоксичность представляет собой фактор, потенциально способный приводить к гипофосфорилированию инсулинового рецептора и нарушению активации инсулинового рецептора вследствие деполяризации митохондрий нейронов.

Цель исследования – изучить эффект эксайтотоксических концентраций глутамата на инсулин-индуцированное фосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих сигнальных молекул в каскаде передачи сигнала рецептора инсулина Akt, mTOR и GSK3 β в нейронах.

5.2 Динамика $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в нейронах коры мозга крыс

Для исследования использовали клетки коры мозга крыс, имевший преимущественно нейрональный фенотип. Нейроны (bIII Tub -положительные и GFAP-отрицательные клетки) составляли $90,5 \pm 13,8$ % ($n = 10$), а глиальные клетки (GFAP-положительные и bIII Tub -отрицательные клетки) составляли $9,5 \pm 5,4$ % от общего числа клеток (Рисунок 25).

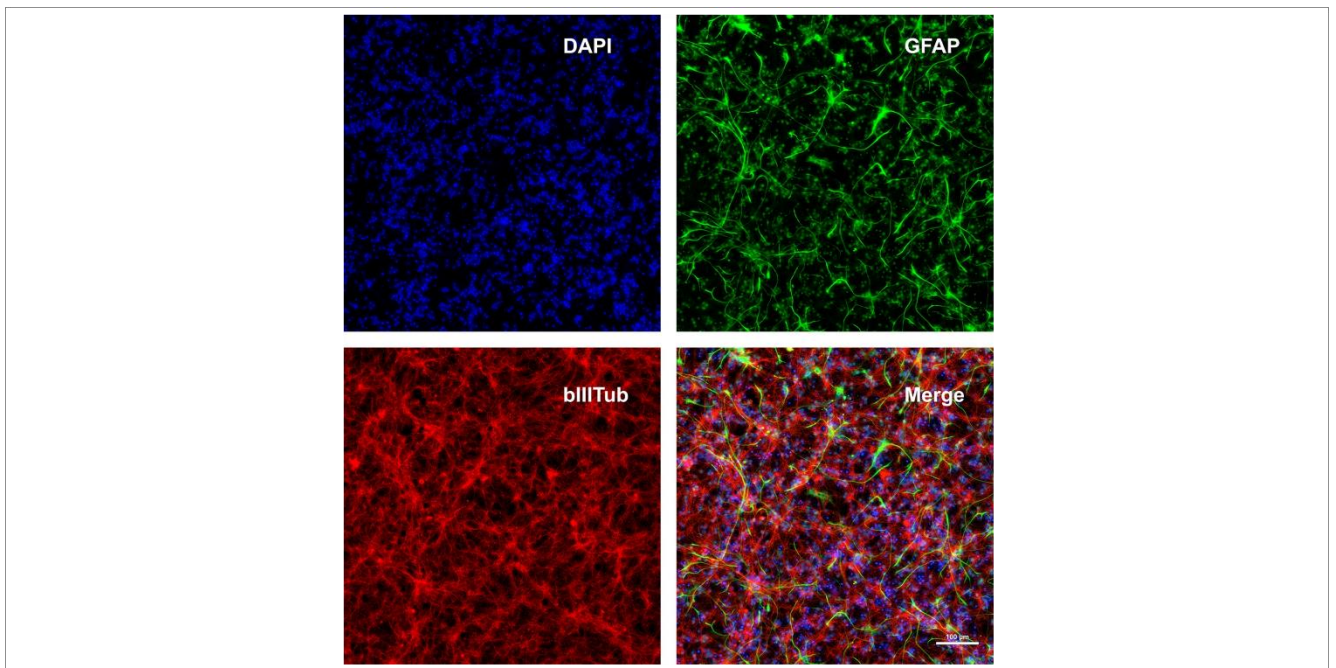


Рисунок 25 - Репрезентативные изображения флуоресцентного окрашивания клеточной культуры коры мозга крыс. Шкала 100 мкм ([391]).

Динамику изменений внутриклеточных концентраций $[Ca^{2+}]_i$ и мембранного потенциала $\Delta\Psi_m$ в индивидуальных нейронах оценивали во времени с целью определения временного интервала, достаточного для статистически значимого снижения $\Delta\Psi_m$. Для этого кортикальные нейроны мозга крыс подвергались воздействию 100 мкМ глутамата, и изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ отслеживались в течение 60 минут. Как и ожидалось, глутамат вызывал быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ с последующим снижением $\Delta\Psi_m$ в клетках. Через 30 мин после начала воздействия глутамата среднее значение $[Ca^{2+}]_i$ увеличилось в 2,4 раза выше исходного уровня ($F_{148,8732} = 44,8$, $p < 0,0001$), а среднее значение $\Delta\Psi_m$ достоверно уменьшилось в 1,6 раза ниже исходного уровня ($F_{148,8732} = 182,8$, $p < 0,0001$). Таким образом, на 30-й минуте воздействия глутамата наблюдалась статистически значимая деполяризация митохондрий. Соответственно, для последующих экспериментов с инсулином был выбран именно 30-минутный интервал воздействия глутамата (Рисунок 26).

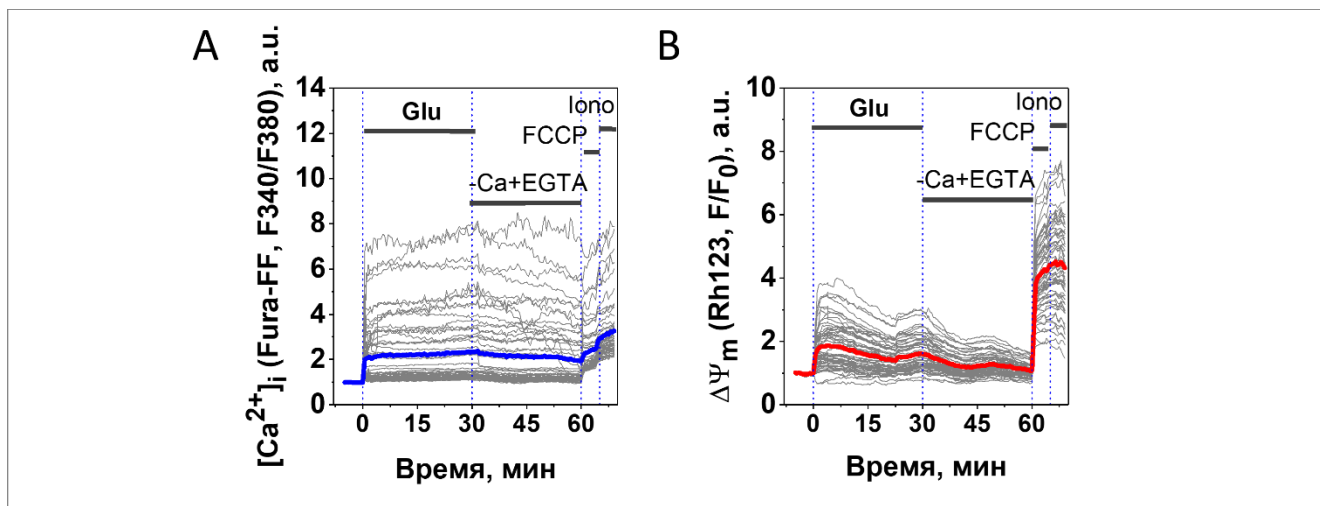


Рисунок 26 - Влияние 100 мкМ глутамата на динамику $[Ca^{2+}]_i$ (A) и $\Delta\Psi_m$ (B) в нейронах коры мозга крыс ([391]). Концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и $\Delta\Psi_m$ в индивидуальных нейронах определяли с использованием флуоресцентных зондов Fura-FF и родамин 123 (Rh123), учитывая, что флуоресценция Rh123 обратно пропорциональна величине $\Delta\Psi_m$ [362]. 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.

5.3 Эффект глутамата на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах коры мозга крыс

Для того, чтобы изучить эффект глутамата на инсулиновую сигнализацию в нейронах, культуры нейронов коры мозга крыс последовательно подвергали воздействию 100 мкМ глутамата в течение 30 минут, а затем 100 нМ инсулина в течение 15 минут и определяли долю фосфорилированных молекул: β -субъединицы IR (IR β pY^{1150/1151}), киназы Akt (Akt pS⁴⁷³), киназы mTOR (mTOR pS²⁴⁴⁸) и киназы гликогенсинтазы 3 β (GSK3 β pS⁹) (Рисунок 27).

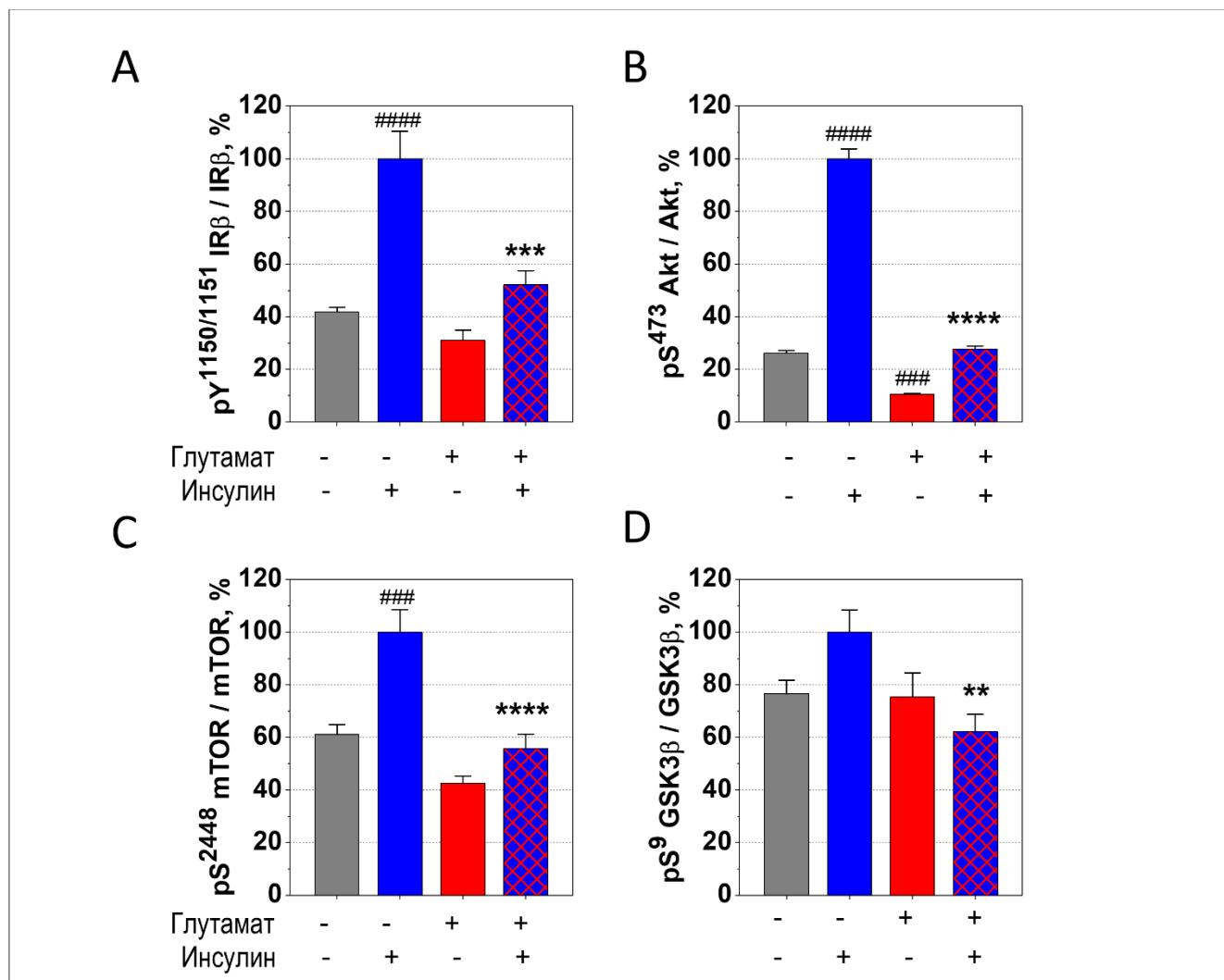


Рисунок 27 - Глутамат в эксайтотоксической концентрации ингибирует инсулиновую сигнализацию в нейронах коры мозга крыс ([391]). Уровни фосфорилирования IRβ pY^{1150/1151} (A), Akt pS⁴⁷³ (B), mTOR pS²⁴⁴⁸ (C) и GSK3β pS⁹ (D) в нейронах коры мозга крыс, инкубированных 30 мин с 100 мкМ глутамата и 15 мин с 100 нМ инсулина. Гистограммы показывают уровни фосфопротеинов, нормализованные относительно общих уровней соответствующих белков и выраженные в процентах от уровней фосфопротеинов в клетках, обработанных инсулином в отсутствие глутамата. Каждое значение представляет собой $M \pm m$ для шести независимых культур (популяции клеток, полученные от двенадцати отдельных крыс, по две на культуру). ###p<0,001, #####p<0,0001 по сравнению с необработанным контролем; **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 по сравнению с

инсулином (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки для множественных сравнений).

Однофакторный анализ ANOVA выявил значительную разницу между группами для IR β pY^{1150/1151} (Рисунок 27А. $F_{3,20} = 23,62$, $p < 0,0001$), Akt pS⁴⁷³ (Рисунок 27В. $F_{3,20} = 388,6$, $p < 0,0001$), mTOR pS²⁴⁴⁸ (Рисунок 27С. $F_{3,20} = 19,69$, $p < 0,0001$) и GSK3 β pS⁹ (Рисунок 27D. $F_{3,20} = 4,48$, $p = 0,0146$). Апостериорный тест Тьюки показал, что стимуляция 100 нМ инсулина приводит к значительному увеличению IR β pY^{1150/1151} ($p < 0,0001$), Akt pS⁴⁷³ ($p < 0,0001$) и mTOR pS²⁴⁴⁸ ($p < 0,001$) по сравнению с соответствующими контролями. Однако, в нейронах, предобработанных глутаматом в течение 30 мин, та же концентрация инсулина вызывала существенно меньший ответ. Так, фосфорилирование рецептора по остаткам тирозина pY^{1150/1151} было снижено на 48% ($p < 0,001$), фосфорилирование Akt по остатку серина pS⁴⁷³ было снижено на 72% ($p < 0,0001$), фосфорилирование mTOR по остатку серина pS²⁴⁴⁸ было снижено на 44% ($p < 0,0001$) и фосфорилирование GSK3 β по остатку серина pS⁹ было снижено на 38% ($p < 0,01$) по сравнению с нейронами необработанными глутаматом. Известно, что инсулиновый рецептор становится полностью активным после фосфорилирования по Y^{1150/1151} [70, 71, 72], что запускает передачу сигналов далее через Akt/mTOR и Akt/GSK3 β , причем фосфорилирование Akt по остатку серина S⁴⁷³ [392] и mTOR по остатку S²⁴⁴⁸ [393] имеют решающее значение для их активации, тогда как фосфорилирование GSK3 β по остатку S⁹ приводит к ингибированию GSK3 β [394].

Таким образом, глутамат в эксайтотоксической концентрации вызывал гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих сигнальных молекул Akt, mTOR и GSK3 β . 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 (Рисунок 28).

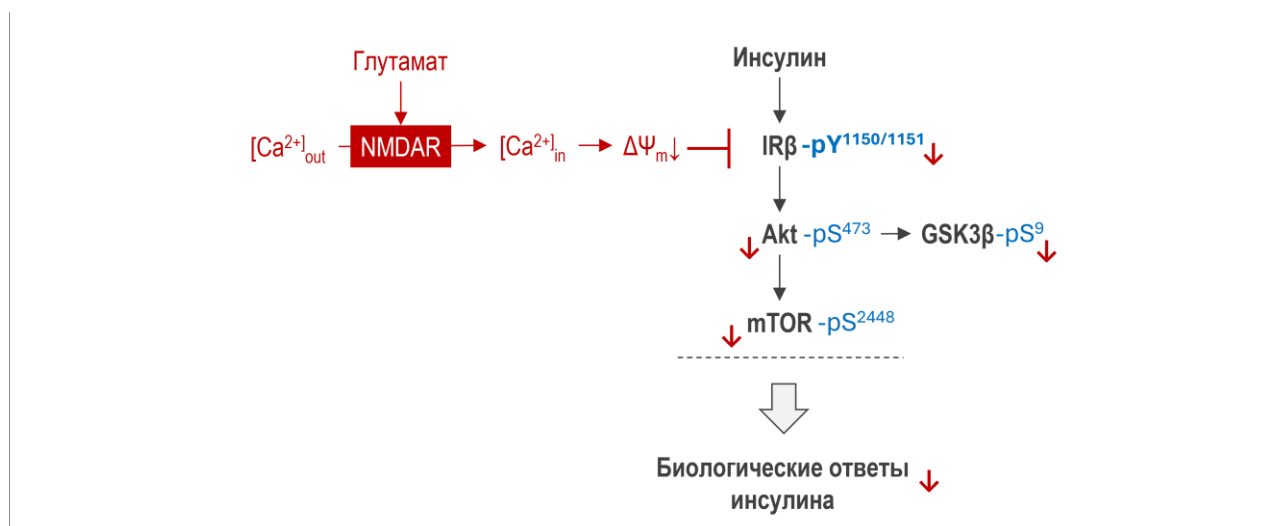


Рисунок 28 - Влияние глутамата на инсулиновую сигнализацию в нейронах ([391, 395]). Инсулин индуцирует окислительный сигнал (H_2O_2) в нейронах путем кратковременного повышения скорости окисления сукцината СДГ митохондрий. Окислительный сигнал разрешает фосфорилирование ИР и фосфорилирование нижележащих киназ каскада внутриклеточной передачи сигнала ИР, опосредующего все биологические ответы инсулина в нейронах. Глутамат активирует NMDA рецептор (NMDAR) в постсинаптических терминалах нейронов, где концентрируются ИР [11], что ведет к немедленному входу внеклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_{out}$), повышению внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i \uparrow$) и деполяризацией митохондрий ($\Delta\Psi_m \downarrow$). Глутамат-индуцированная деполяризация ведет к гипофосфорилированию рецептора ($pYpY^{1150/1151} \downarrow$) и нижележащих киназ в каскаде передачи сигнала Akt ($pS^{473} \downarrow$), mTOR ($pS^{2448} \downarrow$) и GSK3 β ($pS^9 \downarrow$), что в целом ведет к снижению биологического ответа на инсулин, то есть развитию инсулиновой резистентности.

Полученные результаты позволяют сделать обоснованное предположение о природе нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, в которых глутаматная эксайтотоксичность является поражающим фактором, в частности при черепно-мозговой травме и ишемическом инсульте. Деполяризация митохондрий, широко известное следствие глутаматной эксайтотоксичности [169, 171, 174, 175, 176, 177], вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих киназ каскада инсулиновой сигнализации, что ведет к развитию

нейрональной инсулиновой резистентности как раннего поражающего фактора глутаматной эксайтотоксичности.

5.4 Выводы по главе 5:

1. Впервые показано, что глутаматная эксайтотоксичность через деполяризацию митохондрий вызывает гипофосфорилирование инсулинового рецептора и нижележащих киназ Akt, mTOR и GSK3 β , что объясняет развитие острой нейрональной инсулиновой резистентности в состояниях, где глутаматная эксайтотоксичность является поражающим фактором.

2. С учетом того, что глутаматная эксайтотоксичность является основным фактором поражения мозга в острейшей фазе ишемического инсульта, гипофосфорилирование инсулинового рецептора представляет собой патогенетически обоснованную биомишень для лечения ишемического инсульта.

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

6.1 Введение

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, на основе солей янтарной кислоты или других доноров сукцината. Основным ограничением использования сукцината как средства, улучшающего чувствительность инсулиновых рецепторов в ЦНС, является неспособность дикарбоксилатов, к которым относится сукцинат, проходить через гематоэнцефалический барьер и через плазматические мембраны большинства клеток млекопитающих при обычных физиологических значениях pH из-за того, что дикарбоксилаты при этих значениях pH находятся в ионизированной форме [396]. Сукцинат представляет собой дикарбоновую кислоту с константами диссоциации pK_{a1} 4,20 и pK_{a2} 5,69, из чего следует, что при pH 7,4 сукцинат существует в основном в форме дианиона и только 1,9% сукцината находится в монопротонированной форме моноаниона, способной транспортироваться через монокарбоксилат-транспортеры МСТ1 и МСТ2 плазматических мембран. Условием транспорта сукцината через плазматические мембраны является подкисление внутриклеточной среды, например при гипоксии или тяжелой физической работе, например, до pH 6,6, когда доля монопротонированного сукцинат-аниона увеличивается до 10,6% [397]. Эту проблему удалось преодолеть, используя новую соль холина и янтарной кислоты 2:1 – дихолинсукцинат, 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.

Моделирование болезней на животных играет центральную роль в исследованиях доказательства концепции в доклинических биомедицинских исследованиях для определения перспектив кандидатов на роль лекарственного средства в клинических испытаниях. Эффективность моделирования ишемического инсульта на мелких лабораторных животных является проблемой несмотря на наличие моделей и множества публикаций в этой области по причине крайне низкого соответствия между результатами, получаемыми в доклинических и клинических исследованиях. Несмотря на то, что более чем 1000 экспериментальных кандидатов на роль средства для лечения ишемического инсульта успешно прошли доклинические испытания на моделях инсульта, только единицы были зарегистрированы в качестве лекарственного средства [5], что отражает кризис в биомоделировании инсульта и дефицит в новых подходах к лечению ишемического инсульта [6].

В настоящем исследовании оценка эффективности дихолинсукцината проводилась на моделях церебральной ишемии и старения (фактора риска инсульта), допускающих объективную оценку эффектов дихолинсукцината с использованием инструментальных методов ^1H и ^{31}P магнитно-резонансной спектроскопии *in vivo*.

В исследовании использовали такие биомодели, как модель глобальной ишемии у крыс Вистар, вызванной электрофибрилляцией сердечной мышцы, с измерением спектра ^{31}P ЯМР в мозге *in vivo* для определения динамики изменения концентраций макроэргов АТФ и фосфокреатина; модель хронической церебральной гипоперфузии, вызванной перманентной окклюзией двух сонных артерий у крыс Вистар, с измерением ^1H ЯМР спектров в мозге *in vivo*; модель хронологического старения у мышей C57Bl/6 с измерением ^1H ЯМР спектров в мозге *in vivo*; а также модель токсичности β -амилоида, с учетом, что деменция по типу болезни Альцгеймера встречается среди пациентов, перенесших инсульт. Дополнительно проводили оценку когнитивных функций животных с

использованием батареи поведенческих тестов и сопоставляли полученные результаты с данными инструментальных измерений.

6.2 Дихолинсукцинат – общая информация

Название: дихолинсукцинат

Химическое название: бис[(2-гидроксиэтил)триметиламмоний] сукцинат

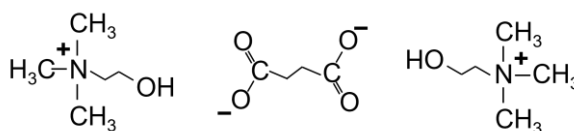
Предпочтительное название IUPAC: бис(2-гидрокси-N,N,N-триметилэтан-1-аминия) бутандиоат

Регистрационный номер CAS: 109438-15-5

Молекулярная формула: C₁₄H₃₂N₂O₆

Молекулярный вес: 324,41 г/моль

Структура:



Получение:

К раствору 121 г (1 моль) основания холина в метаноле добавляют 59 г (0,5 моля) янтарной кислоты. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 20 мин, по окончании выдержки добавляют 1,6 г активного угля, нагревают до 70°C и перемешивают при этой температуре 5-10 минут. Реакционную массу фильтруют на фильтре Шотта, уголь на фильтре промывают, фильтрат упаривают и концентрируют при температуре 40-50°C в вакууме до кристаллизации. Янтарнокислый бис(2-гидрокси-N,N,N-триметилэтанаминий) получают с количественным выходом: Т. пл. 135-137°C (из трет-бутанола). Вычислено (C₁₄H₃₂O₆), %: С 51,83; Н 9,94. Найдено, %: С 51,66; Н 9,86.

Анализ и проверка подлинности с помощью ВЭЖХ:

Метод анализа и проверки идентичности ДХС представляет собой градиентный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой с использованием LiChrospher 100 CN; 125 мм x 4 мм (5 мкм). Подвижные фазы: А) вода/ацетонитрил/трифторуксусная кислота 10/90/0,075 (об./об.) В) вода/ацетонитрил/трифторуксусная кислота 20/80/0,075 (об./об.).

Детектор – ELSD. Температура колонки 25°C, скорость потока 0,6 мл/мин, время анализа 15 минут, объем ввода 10 мкл. Типичная хроматограмма ДХС представлена на Рисунке 29.

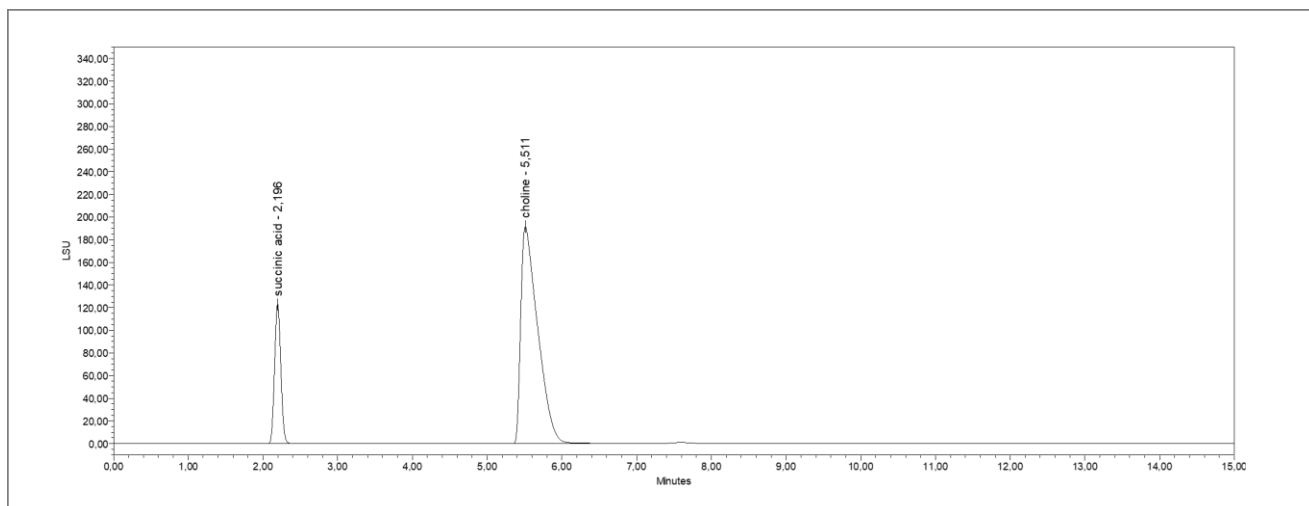


Рисунок 29 - ВЭЖХ хроматограмма дихолинсукцината.

^1H ЯМР спектр водного раствора ДХС записывали в ДМСО с добавлением трифторуксусной кислоты, чтобы сместить сигнал воды в более низкое поле (Рисунок 30; Таблица 10).

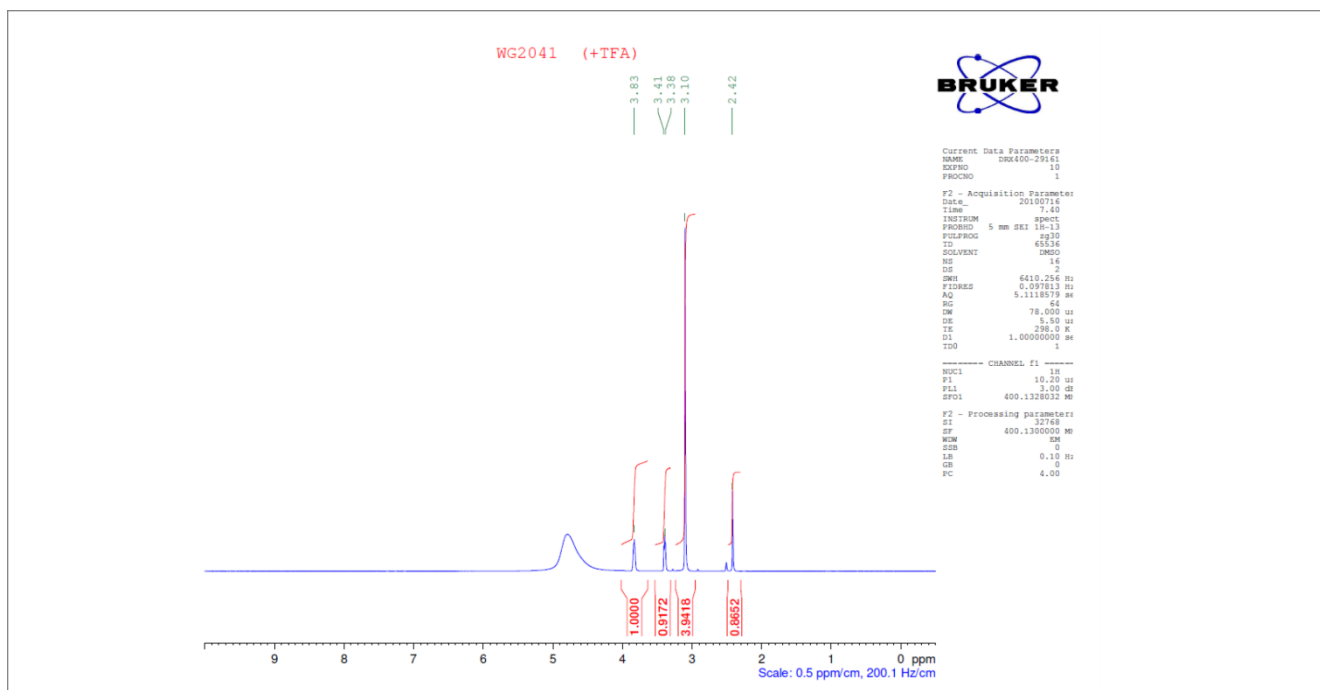
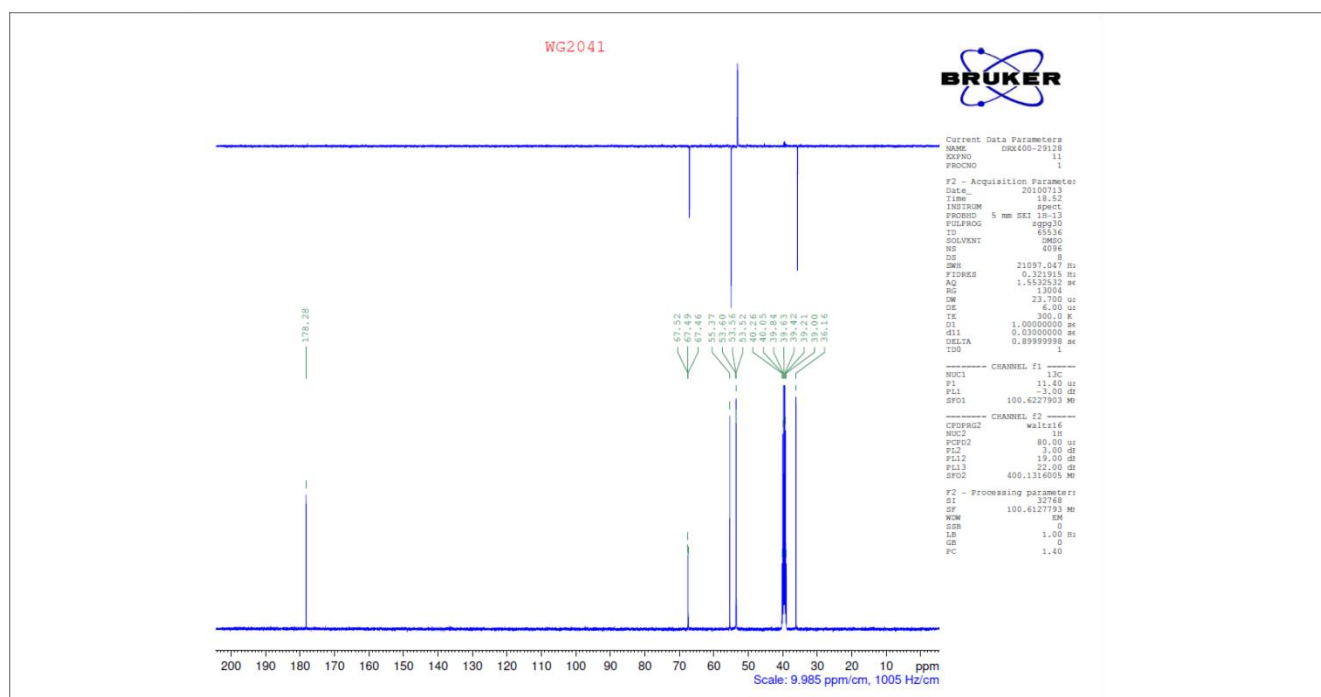


Рисунок 30 - ^1H ЯМР спектр дихолинсукцината.

Таблица 10 - Отнесение сдвигов ^1H ЯМР.

Химический сдвиг δ		Интеграл	Отнесение сигнала
2.42 ppm	s	4	сукцинат CH_2
3.10 ppm	s	18	холин NCH_3
3.40 ppm	m	4	холин CH_2
3.83 ppm	m	4	холин CH_2

^{13}C ЯМР спектр ДХС записывали в ДМСО (Рисунок 31; Таблица 11).

Рисунок 31 - ^{13}C ЯМР спектр дихолинсукцината.Таблица 11 - Отнесение сдвигов ^{13}C ЯМР.

Химический сдвиг δ		Отнесение сигналов
36.2 ppm	s	CH_2
53.6 ppm	t, $J(C,N) = 3.0$ Hz	холин NCH_3
55.4 ppm	s	CH_2
67.5 ppm	t, $J(C,N) = 4.0$ Hz	холин CH_2
178.3 ppm	s	$\text{C}=\text{O}$

Препарат дихолинсукцината с параметрами качества, указанными в Таблице 12, использовался для дальнейших исследований на биомоделях.

Таблица 12 - Спецификация дихолинсукцината.

Параметр	Метод	Спецификация
Внешний вид	Органолептический	Белый кристаллический порошок
Подлинность	ЯМР	Соответствует референсному спектру
Содержание холина	ВЭЖХ	642 мг/г
Содержание сукцината	ВЭЖХ	358 мг/г
pH	Ph. Eur.	8,0-9,5

6.3 Дихолинсукцинат – нейрональный инсулин-сенситайзер

Цель настоящего исследования – изучить эффекты дихолинсукцината в интервале концентраций 10 – 100 мкМ на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах мозжечка крыс в ответ на инсулина 5 нМ, физиологически релевантную концентрацию инсулина в мозге [99] (Рисунок 32).

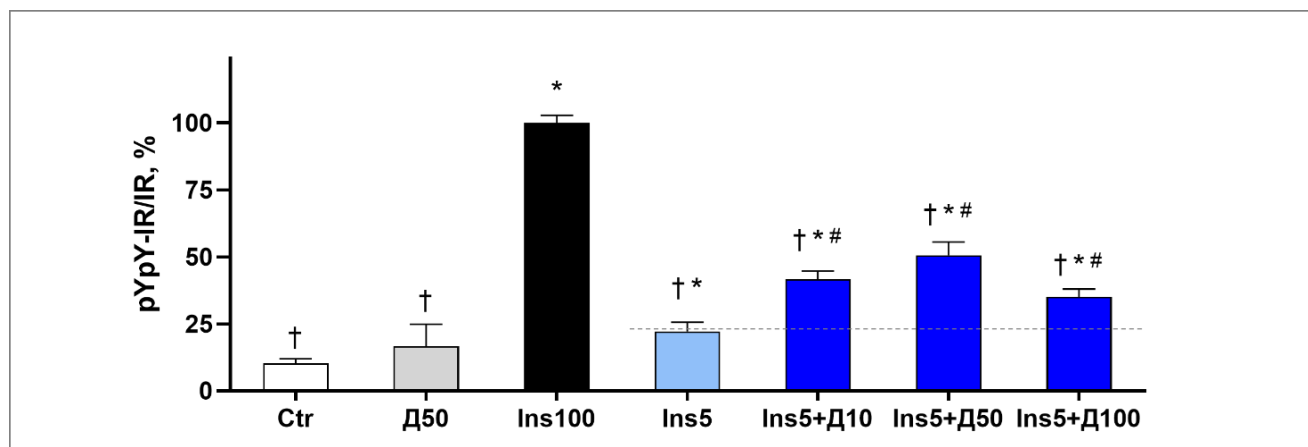


Рисунок 32 - Эффект ДХС на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах ([398]). Гранулярные нейроны мозжечка крыс инкубировали без добавок (Ctrl), с ДХС 50 мкМ (D50), с инсулином 100 нМ (Ins100), инсулином 5 нМ (Ins5) или инсулином 5 нМ с добавкой ДХС в концентрациях 10 мкМ (Ins5+D10), 50 мкМ (Ins5+D50) или 100 мкМ (Ins5+D100) мкМ в течение 20 мин, после чего измеряли фосфорилирование рецептора. Результаты представлены как $M \pm s$ значений pYpY-IR/IR в %, полученных от пяти до девяти культур. * $p < 0,05$ 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).

Дихолинсукцинат в интервале концентраций 10 – 100 мкМ статистически значимо повышал фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах в ответ на низкие, физиологически релевантные концентрации инсулина. Стимуляция нейронов инсулином в концентрации 5 нМ обеспечивает одну пятую повышения фосфорилирования инсулинового рецептора от максимального значения, достигаемого с концентрацией 100 нМ инсулина. Однако, повышение достигаемое с 5 нМ является статистически значимым ($p < 0,05$) по сравнению с нестимулированным контролем. ДХС сам по себе не вызывает статистически значимого повышения фосфорилирования рецептора ($p > 0,05$) относительно контроля, но значимо повышает фосфорилирование инсулинового рецептора в присутствии 5 нМ инсулина, увеличивая эффект 5 нМ инсулина в 1,87, 2,27 и 1,58 раза при концентрациях ДХС 10, 50 и 100 мкМ ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с нейронами, стимулированными только 5 нМ инсулина.

Концентрация инсулина 5 нМ, выбранная в настоящем исследовании, находится в интервале концентраций инсулина 1 – 10 нМ, которые эффективно повышают фосфорилирование рецепторов инсулина в мозге человека [99]. С учетом того, что физиологически релевантный диапазон концентраций сукцината в плазме крови человека составляет около 10 мкМ в состоянии покоя и может повышаться при физических нагрузках до 125 мкМ [352, 353], а концентрация свободного холина в плазме (или сыворотке) у взрослых людей поддерживается на уровне около 10 мкМ и может увеличиваться до 50 мкМ после приема пищи, обогащенной холином [399, 400, 401], эти результаты означают, что статистически значимые эффекты ДХС на фосфорилирование инсулинового рецептора в нейронах реализуются в интервале физиологических концентраций инсулина, сукцината и холина.

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.

6.4 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели глобальной ишемии мозга у крыс методом ^{31}P ЯМР *in vivo*

Регуляция энергетического метаболизма является одной из функций инсулина в мозге и проявляется, в том числе в повышении уровней макроэргов – АТФ и фосфокреатина в мозге в ответ на введение интраназального инсулина, что было продемонстрировано в пилотных клинических исследованиях на здоровых добровольцах методом магниторезонансной спектроскопии ^{31}P *in vivo* [116].

Церебральная ишемия ведет к падению синтеза АТФ в митохондриях нейронов вследствие падения парциального давления кислорода и прекращения поступления глюкозы в зону ишемии [159]. В то же время АТФ потребляется ионными насосами, встроенными в плазматические мембраны и мембраны внутриклеточных органелл нейронов для того, чтобы поддерживать или восстанавливать ионные ингредиенты между различными компартментами в периоды нейрональной активности [159, 160, 161, 162, 163]. Нарушение баланса синтеза и потребления АТФ ведет к снижению концентрации АТФ и фосфокреатина (ФК), коллапсу ионных градиентов, массивному выбросу глутамата во внеклеточное пространство и каскаду событий, приводящих к гибели нейронов и формированию зоны некроза или инфаркта мозга.

Магниторезонансная спектроскопия на ядрах ^{31}P *in vivo* (^{31}P ЯМР *in vivo*) – это неинвазивный метод, позволяющий оценить динамику уровней АТФ и фосфокреатина в мозге, непрерывно и без экспериментальных ошибок, связанных с необходимостью выделения этих метаболитов из тканей [402].

Цель исследования – изучить эффекты дихолинсукцината на динамику уровней макроэргов АТФ и ФК в мозге крыс в условиях глобальной ишемии, вызванной электрофибрилляцией сердечной мышцы.

Для того, чтобы оценить эффекты 7-дневного в/б введения физ. раствора, ДХС, холина хлорида (ХХ), калия сукцината (КС) и натрия сукцината (НС) на энергетический метаболизм в мозге, у крыс на 8-й день вызывали глобальную ишемию и измеряли динамику изменений уровней АТФ, ФК и других фосфатов в мозге методом ^{31}P ЯМР спектроскопии *in vivo*. Предварительное введение физ. раствора или препаратов в течение 7 дней не влияет на содержание фосфатных метаболитов АТФ, ФК, фосфомоноэфиров (ФМЭ), неорганического фосфата (Фн) и уровни рН в мозге ($p > 0,05$) по сравнению с контролем (физ. раствор), если все измерения проводились через сутки после последнего введения препаратов, но до начала ишемии (Таблица 13).

Таблица 13 - Средние значения интегральных интенсивностей сигналов фосфатов (в % от суммы интегральных интенсивностей всех сигналов спектра) и внутриклеточного рН в мозге крыс через сутки после окончания 7-дневного курса введения ДХС, ХХ, КС и физ. раствора (К).

Группа (n)	Содержание фосфатов в мозге, % (M ± s)				
	ФМЭ	Фн	ФК	АТФ	рН
ДХС (8)	9,7 ± 0,27	11,2 ± 0,25	19,9 ± 0,25	13,4 ± 0,25	7,12 ± 0,0001
ХХ (8)	10,0 ± 0,25	11,0 ± 0,29	20,2 ± 0,30	13,0 ± 0,25	7,11 ± 0,0002
КС (8)	10,2 ± 0,26	10,9 ± 0,26	20,7 ± 0,25	12,7 ± 0,25	7,10 ± 0,0002
Физ.рр (23)	10,5 ± 0,25	10,7 ± 0,25	20,9 ± 0,24	12,3 ± 0,25	7,10 ± 0,0001

Однако, после начала глобальной ишемии, индуцированной через 24 часа после последнего введения препаратов, происходит быстрое изменение концентраций фосфометаболитов в мозге. Глобальная ишемия вызывает быстрое падение интенсивностей сигналов β АТФ и ФК при увеличении интенсивности сигналов ФМЭ и Фн в мозге крыс (Рисунок 33).

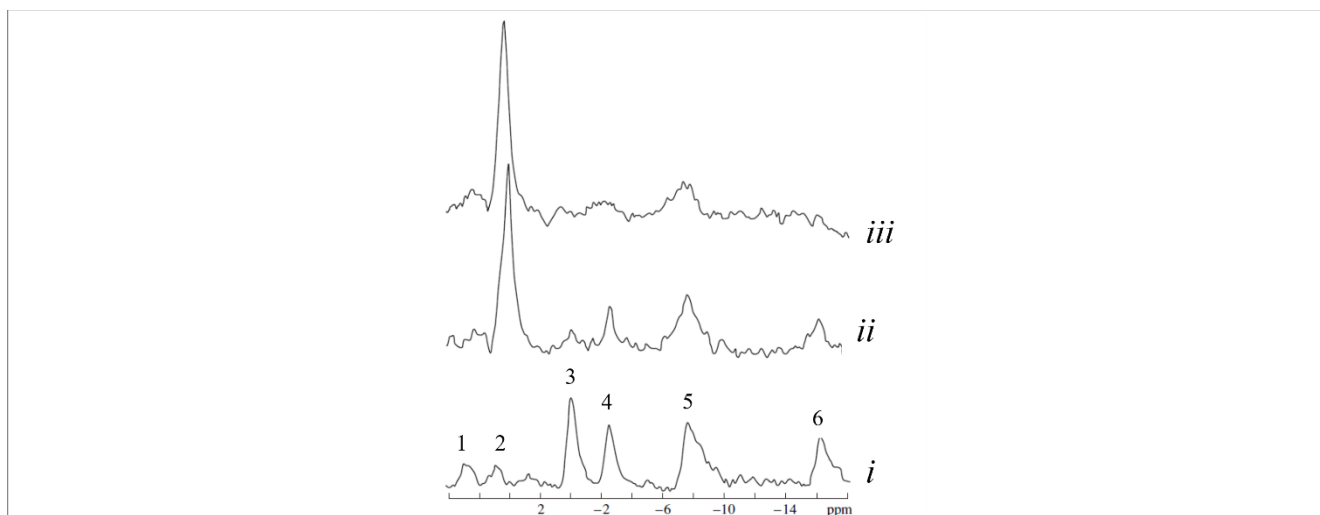


Рисунок 33 - Репрезентативные ^{31}P ЯМР спектры мозга крыс *in vivo* ([357]). Спектр мозга до ишемии (i) и на 15 мин ишемии у крыс, получавших 7 дней ДХС в/б (ii) или физ. раствор (iii). 1 – ФМЭ, 2 – Фн, 3 – ФК, 4 – $\gamma\text{АТФ}+\beta\text{АДФ}$, 5 – $\alpha\text{АТФ}+\alpha\text{АДФ}+\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, 6 – $\beta\text{АТФ}$.

Динамика уровней АТФ и ФК в мозге крыс в периоде глобальной ишемии по данным ^{31}P ЯМР спектроскопии *in vivo* представлена на Рисунке 34.

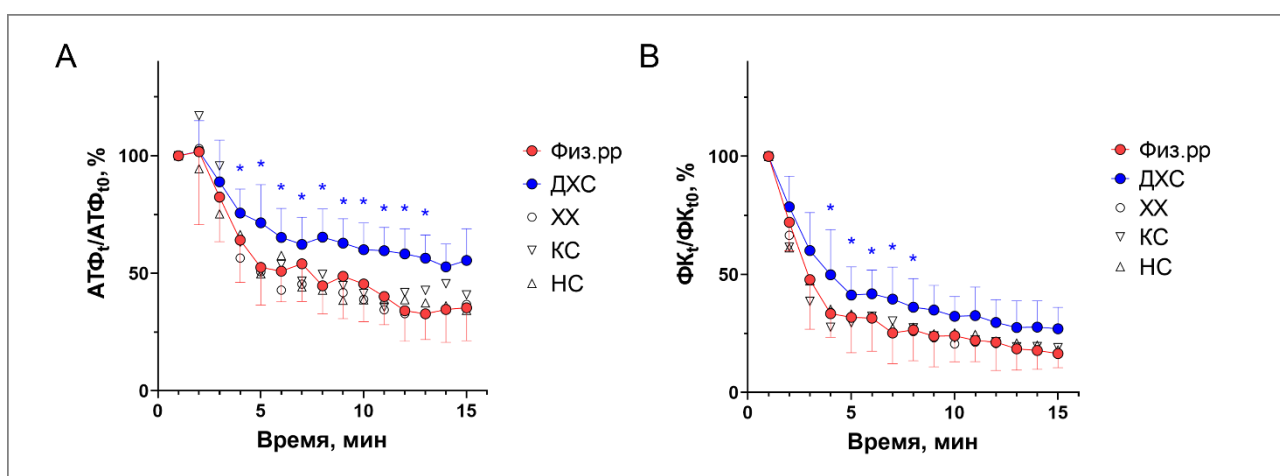


Рисунок 34 - Динамика изменений концентраций АТФ (А) и ФК (В) в мозге крыс в период глобальной ишемии через 24 часа после окончания введения препаратов ([357]). Глобальную ишемию вызывали электрофибрилляцией мышцы сердца через сутки после окончания 7-дневного в/б введения препаратов. Результаты представлены как $M \pm s$ $\text{АТФ}_t/\text{АТФ}_{t_0}$; $\text{ФК}_t/\text{ФК}_{t_0}$; и рН в целом мозге в каждый момент времени (t) относительно исходного момента (t_0), и выражены в %. Время 0 мин

соответствует началу глобальной ишемии. В опытных группах было по 8 животных, в контроле – 23 животных. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем (Физ. рр).

Динамика изменения уровней фосфатов во времени имеет общие закономерности во всех группах. Падение уровней ФК и АТФ происходит синхронно, при этом временные зависимости имеют бифазный характер с резким снижением уровней макроэргов в первые 4 мин после остановки сердца, и последующим медленным снижением. Анализ показал, что статистически значимое отличие от контроля (физ. раствор) было достигнуто только в группе животных, получавших в/б ДХС в течение 7 суток ($p < 0,05$), но не между остальными группами и контролем ($p > 0,05$).

Значения энергетического статуса мозга оценивали по общепринятому индексу АТФ/Фн, величина которого характеризует способность клеток совершать работу (Таблица 14).

Таблица 14 - Средние значения АТФ/Фн в группах, рассчитанные из спектров ^{31}P ЯМР мозга крыс в период глобальной ишемии.

Время, мин	АТФ/Фн, усл. ед., $M \pm s (n)$			
	К (23)	ДХС (8)	ХХ (8)	КС (8)
0	$1,23 \pm 0,17$	$1,25 \pm 0,26$	$1,23 \pm 0,26$	$1,22 \pm 0,20$
2	$0,43 \pm 0,13$	$0,48 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,18$	$0,37 \pm 0,10$
4	$0,17 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,04^*$	$0,19 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,06$
6	$0,19 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,04^*$	$0,18 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,06$
8	$0,19 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,04^*$	$0,19 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,06$
10	$0,13 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03^*$	$0,13 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,06$
12	$0,11 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,04$
15	$0,13 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,04^*$	$0,13 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,04$

Примечание: * $p < 0,05$ в сравнении с физ. раствором (К).

Для того, чтобы выяснить продолжительность защитного эффекта ДХС на энергетический метаболизма при ишемии, глобальная ишемия была индуцирована через 8 суток после последнего введения ДХС или физ. раствора и динамика изменения уровней АТФ и рН в мозге оценивалась с помощью ^{31}P ЯМР спектроскопии *in vivo*, как описано в разделе материалы и методы (Рисунок 35).

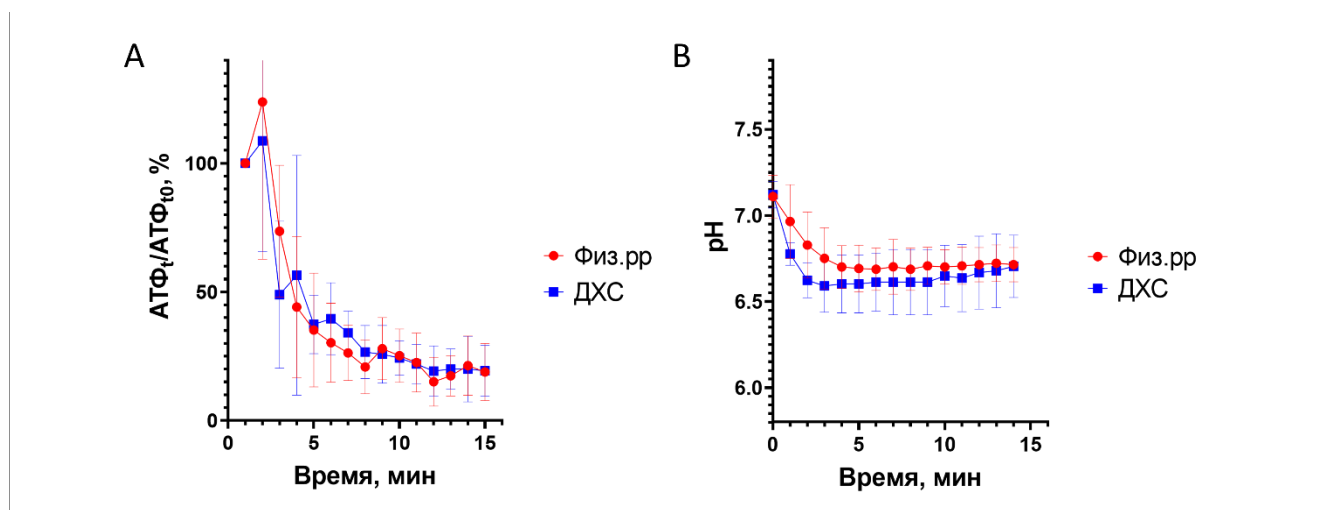


Рисунок 35 - Динамика изменений концентраций АТФ (А) и рН (В) в мозге крыс в период глобальной ишемии через 8 суток после окончания введения препаратов. Глобальную ишемию вызывали через 8 суток после окончания 7-дневного в/б введения ДХС или физ. раствора. Результаты представлены как $M \pm s$ ATP_t/ATP_{t_0} и рН в каждый момент времени (t) относительно исходного момента (t_0), выраженное в %. В группах было по 8 животных. * $p < 0,05$ в сравнении с физ. раствором.

Анализ показал отсутствие статистически значимых отличий между группами ($p > 0,05$) в период глобальной ишемии, если ишемия индуцировалась через 8 суток после окончания 7-дневного курса в/б введения ДХС и физ. раствора.

Таким образом, впервые показано, что профилактическое курсовое в/б введение ДХС обеспечивает статистически значимое снижение скорости падения макроэргов АТФ и фосфокреатина в мозге по сравнению с контролем (физ. раствор) при глобальной ишемии, индуцированной электрофибрилляцией сердечной мышцы через 24 часа после последнего введения препаратов. Индивидуальное профилактическое введение в том же режиме эквимолекулярных количеств холина (в виде холина хлорида) или сукцината (в виде сукцината калия или натрия) не отличалось по влиянию на скорость изменения концентрации макроэргов в мозге при ишемии от контрольного физ. раствора, из чего следует, что дихолинсукцинат обладает синергическим эффектом и, таким образом, является наиболее перспективным кандидатом на роль средства-кандидата для лечения ишемических поражений мозга.

Индекс АТФ/Фн показывает способность клеток совершать работу. В настоящем исследовании показано, что значения этого индекса в группе животных получавших дихолинсукцинат статистически значимо выше в 1,3 – 1,8 раза, чем в контроле.

Следует отметить, что курсовое 7-дневное в/б введение ДХС не влияет на уровни фосфат-содержащих метаболитов и рН в мозге в отсутствие ишемии, причем эти уровни вполне соответствуют величинам для фосфат-содержащих метаболитов и значений внутриклеточного рН в мозге интактных крыс [404]. Таким образом, эффекты профилактического введения ДХС реализуются только в период ишемии, при этом эффект профилактического введения ДХС на динамику макроэргов в мозге при ишемии является относительно кратковременным – его действие продолжается не менее 24 часов, но не более 8 суток, когда защитный эффект уже не наблюдается.

Профилактическое введение дихолинсукцината превосходит индивидуальные эффекты его составляющих, холина и сукцината, взятых в эквимолекулярных количествах, что позволяет выбрать дихолинсукцинат в качестве соединения-лидера для дальнейшего изучения в биомоделях ишемии.

6.5 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели церебральной гипоперфузии у крыс методом ^1H ЯМР *in vivo* и в тестах когнитивной функции

Сосудистая деменция или отсроченные когнитивные нарушения, связанные со снижением церебральной перфузии, развиваются у 25-30% выживших после ишемического инсульта в течение трех лет [419, 420]. Снижение когнитивных функций может быть связано со снижением мозгового кровотока [421], а снижение кровотока связано с инсулиновой резистентностью [422].

Постоянная двусторонняя окклюзия общих сонных артерий (2VO) у крыс вызывает снижение мозгового кровотока наполовину и рассматривается как модель церебральной гипоперфузии, подходящая для тестирования средств-кандидатов

для лечения и профилактики сосудистой деменции и отсроченных когнитивных нарушений, связанных с хронической гипоксией [423].

N-Ацетиласпартат (NAA) – уникальный метаболит, специфичный для ЦНС и обнаруживаемый в необычно высокой концентрации около 10 мМ в мозге человека, составляя при этой концентрации одну тысячную сырого веса мозга [406]. NAA обнаруживается в спектре ^1H ЯМР мозга как главный пик, наблюдаемый при 2,02 ppm (CH_3 -группа), что делает его неинвазивным маркером при исследованиях мозга методом ^1H магнитно-резонансной спектроскопии *in vivo*, обычно в виде отношения с креатином (NAA/Cr). NAA синтезируется исключительно в митохондриях нейронов по реакции L-аспартата и ацетилкоэнзима-A, катализируемой L-аспартат-N-ацетилтрансферазой. Из-за исключительно нейронального происхождения NAA рассматривается как валидный нейрональный маркер в неинвазивных исследованиях мозга.

Биосинтез NAA прямо связан с митохондриальным циклом трикарбоновых кислот и биоэнергетикой [407]. NAA синтезируется из L-аспартата, который в свою очередь образуется из оксалоацетата, субстрата цикла, поэтому концентрация оксалоацетата прямо влияет на скорость синтеза NAA. Синтез NAA, синтез АТФ, и потребление кислорода снижаются синхронно при ингибировании дыхательной цепи митохондрий, как было показано на изолированных митохондриальных препаратах головного мозга [408]. В этом контексте уровни NAA в головном мозге служат надежными маркерами для мониторинга нарушений биоэнергетики нейронов.

N-ацетиласпартат относится к дикарбоновым кислотам и при физиологических значениях pH находится почти исключительно в форме дианиона, который имеет низкую способность к неспецифической диффузии через плазматические мембраны. Поэтому NAA концентрируется в нейронах и его потеря при острых поражениях мозга, таких как черепно-мозговая травма и инсульт отражает гибель нейронов. Так, NAA быстро снижается в острейшей фазе ишемического инсульта у человека или при моделировании ишемического инсульта

на животных [409] и, наоборот, повышается при прогрессе в восстановлении после инсульта [410, 411]. Снижение уровней NAA/Cr в лобной доле у пациентов после инсульта предсказывает будущее снижение когнитивных функций [412].

Цель исследования – изучить эффекты в/б введения дихолинсукцината (ДХС) на общие уровни N-ацетиласпартата в мозге крыс с хронической церебральной гипоперфузией с использованием ^1H ЯМР *in vivo* и сопоставить эти результаты с результатами тестирования когнитивной функции у этих животных.

Все животные были распределены по экспериментальным группам, минимум по 9 животных в группе, случайным образом с использованием сгенерированных компьютером случайных чисел. Животные получали один раз в день, семь дней подряд, в/б инъекции ДХС в дозе 1 мг/кг (группа 1), 10 мг/кг (группа 2), 25 мг/кг (группа 3), физ. раствор (группа 4, контроль), или холина хлорид в дозе 10 мг/кг (группа 5). Группа ложнооперированных животных (контроль) получала физ. раствор в/б в течение 7 дней. Животных тестировали с использованием батареи когнитивных тестов и снимали ^1H ЯМР спектр мозга в дни, указанные в плане исследований (Рисунок 36).

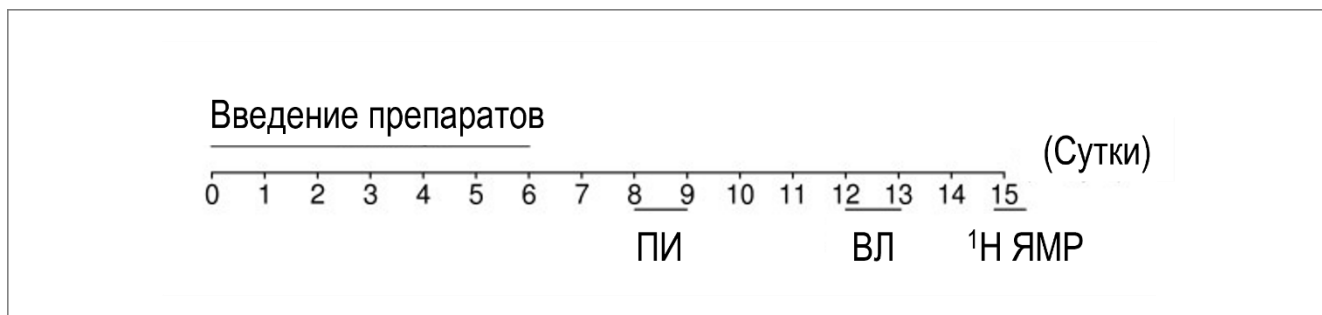


Рисунок 36 - План исследований. ПИ – тест пассивного избегания; ВЛ – водный лабиринт Морриса; ^1H ЯМР – ^1H ЯМР *in vivo*.

Тестирование условного рефлекса пассивного избегания показало отсутствие статистически значимой разницы между всеми группами животных в задержке перехода из светлого в темный отсек в первый день тестирования (Рисунок 37).

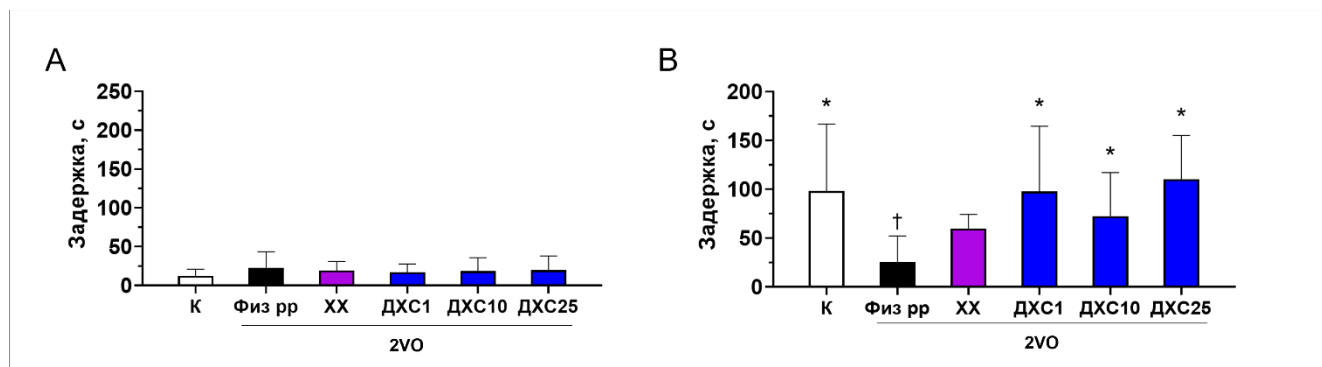


Рисунок 37 - Эффект ДХС в тесте пассивного избегания у крыс с окклюзией двух сонных артерий (2VO) ([398, 425]). Ложнооперированные животные (К) получали в/б физ. раствор. Оперированные крысы получали в/б физ. раствор (Физ.рр), 10 мг/кг холина хлорида (ХХ) или ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). Животных тестировали в первый день (А) и через 24 часа (В). Столбцы представляют $M \pm m$ задержки перехода в темный отсек (с), ($n \geq 9$). * $p < 0,05$ по сравнению с Физ.рр 2VO. † $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными животными.

Однако, через 24 часа в повторном тесте у крыс с перманентной перевязкой двух сонных артерий, получавших физ. раствор, наблюдалось значительное уменьшение задержки перехода в темный отсек по сравнению с ложнооперированными крысами ($p < 0,01$), что указывает на дефицит обучения, вызванный хронической церебральной гипоперфузией. ДХС при введении в дозах 1–25 мг/кг статистически значимо увеличивал задержку перехода в темный отсек у крыс с хронической церебральной гипоперфузией ($p < 0,05$) по сравнению с 2VO контролем, получавшим физ. раствор. Таким образом, ДХС значительно улучшал долговременную память оборонительного поведения у крыс с хронической церебральной гипоперфузией.

В качестве еще одного теста для оценки эффектов ДХС на обучение и память использовали тестирования животных в водном лабиринте Морриса (Рисунок 38).

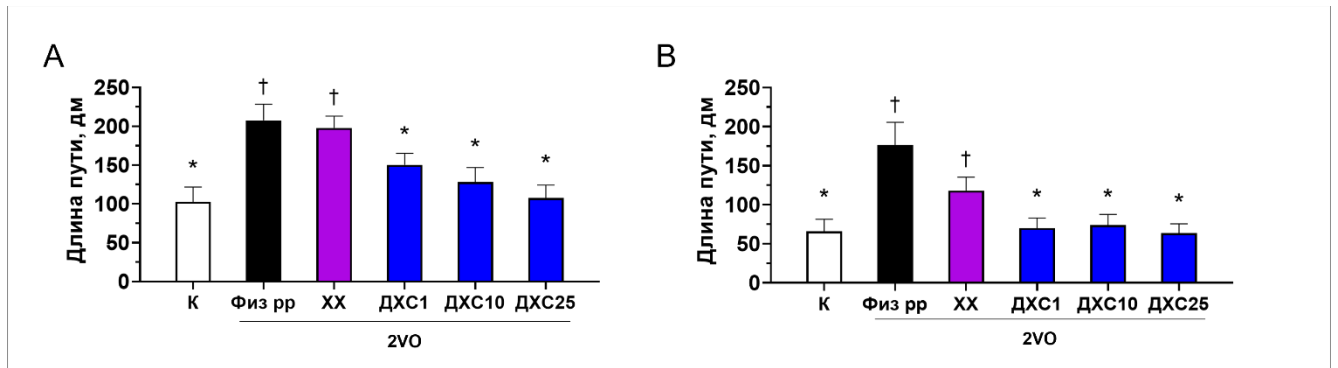


Рисунок 38 - Эффект ДХС на обучение в водном лабиринте у крыс с перманентной окклюзией двух сонных артерий (2VO) ([398, 425]). Ложнооперированные животные (К) получали в/б физ. раствор. Оперированные крысы получали в/б физ. раствор (Физ.рр), 10 мг/кг холина хлорида (XX) или ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). Животных обучали в первый день (А) и через 24 часа (В). Столбцы представляют $M \pm m$ длины пути до скрытой платформы (с), ($n \geq 9$). * $p < 0,05$ по сравнению с Физ.рр 2VO. † $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными животными.

Анализ показал наличие статистически значимой разницы между ложнооперированными и оперированными крысами, получавшими физ. раствор в длине пути к скрытой платформе в водном лабиринте Морриса в первый и второй день обучения ($p < 0,01$), что указывает на нарушения пространственного обучения, вызванного хронической церебральной гипоперфузией. ДХС в дозах 1–25 мг/кг статистически значимо снижал длину пути до скрытой платформы у крыс с перманентной окклюзией двух сонных артерий ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными 2VO животными, получавшими физ. раствор. Таким образом, ДХС значительно улучшил пространственное обучение у животных с хронической церебральной гипоперфузией.

Эффект ДХС на уровни N-ацетиласпартата в мозге показан на Рисунке 39.

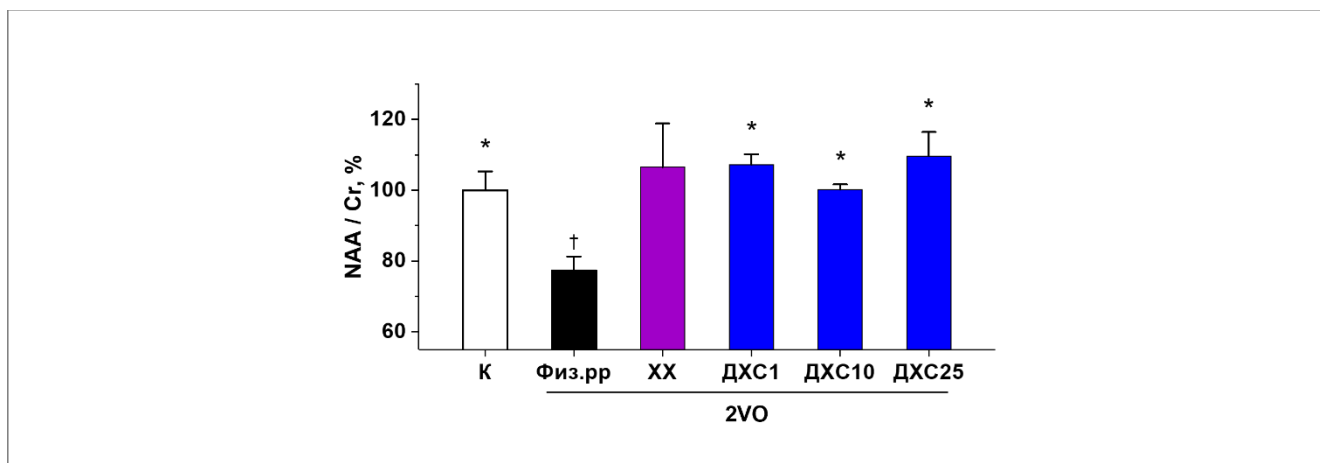


Рисунок 39 - Эффект ДХС на уровни NAA/Cr в головном мозге крыс с перманентной окклюзией двух сонных артерий по данным ^1H ЯМР *in vivo* ([398, 425]). Ложнооперированные (К) получали в/б физ. раствор. Оперированные крысы получали в/б физ. раствор (Физ.рр), 10 мг/кг холина хлорида (XX) или ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). В столбцах представлены $M \pm m$ значений NAA/Cr ($n \geq 9$). * $p < 0,05$ по сравнению с Физ.рр 2VO; † $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными животными.

Для того, чтобы изучить эффекты дихолинсукцината на общие уровни N-ацетиласпартата в мозге животных с хронической церебральной гипоперфузией, крысам с перманентной окклюзией двух сонных артерий вводили 7-дневным курсом ДХС в/б в трех дозах и через 9 дней после последнего введения измеряли уровни N-ацетиласпартата в мозге методом ^1H ЯМР *in vivo*, после чего нормировали полученные значения на общие уровни креатина, измеренные тем же способом. Индекс NAA/Cr использовали в качестве меры NAA в мозге.

Средняя величина NAA/Cr в мозге у оперированных животных, получавших физ. раствор (Физ.рр / 2VO), была на 22% ниже, чем у ложнооперированных (К), что указывает на снижение биоэнергетики нейронов вследствие хронической церебральной гипоперфузии. При курсовом введении ДХС в дозах 1–25 мг/кг статистически значимо увеличивал уровни NAA/Cr в мозге у животных с хронической церебральной гипоперфузией ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными 2VO животными, получавшими физ. раствор, что указывает на улучшение

биоэнергетики нейронов при хронической церебральной гипоперфузии у животных, получавших ДХС.

В настоящем исследовании крысы с хронической церебральной гипоперфузией, вызванной перманентной окклюзией двух сонных артерий, проявляют признаки когнитивного снижения, выражающегося в снижении долговременной памяти оборонительного поведения в тесте пассивного избегания и снижении пространственного обучения в водном лабиринте Морриса в сравнении ложнооперированными животными. Это когнитивное снижение у 2VO животных сопровождалось значимым 22% снижением общемозгового уровня N-ацетиласпартата в сравнении с ложнооперированными животными. NAA – исключительно нейрональный маркер, снижение которого характеризует сниженную работоспособность митохондрий в нейронах, так как синтез NAA привязан к синтезу оксалоацетата в цикле трикарбоновых кислот и варьирует синхронно с уровнем АТФ и потреблением кислорода нейронами [407, 408]. В этом контексте хроническая церебральная гипоперфузия, вызывающая в этой модели двукратное снижение мозгового кровотока [423], снижает общемозговые уровни NAA у крыс предположительно через снижение биоэнергетики в нейронах.

Дихолинсукцинат при коротком курсовом введении существенно улучшил когнитивные функции у животных с церебральной гипоперфузией с одновременным повышением уровней N-ацетиласпартата в мозге.

С учетом того, что сосудистая деменция или отсроченные когнитивные нарушения, связанные со снижением церебральной перфузии, развиваются в течение трех лет у 25-30% выживших после ишемического инсульта [419, 420], полученные в настоящем исследовании результаты указывают на возможность использования дихолинсукцината как средства-кандидата для снижения риска развития сосудистой деменции в периоде реабилитации после инсульта.

Таким образом, впервые показано, что дихолинсукцинат повышает уровни N-ацетиласпартата в мозге, сниженные вследствие хронической церебральной гипоперфузии. Курсовое введение дихолинсукцината обеспечивает статистически

значимое улучшение когнитивных функций у животных с хронической церебральной гипоперфузией с одновременным повышением уровней N-ацетиласпартата в мозге. Полученные результаты показывают перспективу использования дихолинсукцината как средства-кандидата для повышения уровней N-ацетиласпартата и снижения риска развития сосудистой деменции при хронической церебральной ишемии, в том числе в постинсультном периоде.

6.6 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели нормального старения у мышей методом ^1H ЯМР *in vivo* и в тестах когнитивной функции

Старение является наиболее устойчивым фактором риска возникновения инсульта, который удваивается каждые 10 лет после достижения возраста 55 лет, причем примерно три четверти всех инсультов происходят у лиц в возрасте ≥ 65 лет, что связано с многими факторами, в том числе возрастными структурными и функциональными изменениями сосудистого русла головного мозга и наличием бессимптомных цереброваскулярных заболеваний [405].

Нормальное старение сопровождается постепенным снижением уровней NAA в мозге примерно на 0,5% в год [413]. У лиц старшего возраста (средний возраст ~ 74 года, диапазон 60 – 90 лет) общий уровень NAA в мозге ниже примерно на 35%, чем у молодых людей (средний возраст ~ 38 лет). Дополнительное снижение уровней NAA в мозге примерно на 25 – 29% наблюдается при переходе от нормального старения к мягкому когнитивному снижению и болезни Альцгеймера [414].

В целом, NAA является полезным неинвазивным нейрональным маркером, снижение которого отражает процессы нейрональной дисфункции при различных состояниях, включая старение, переход к деменции, а также постинсультный неврологический дефицит и постинсультные когнитивные нарушения. Повышение NAA, наоборот, связано с восстановлением нейрональных функций, в том числе с восстановлением после инсульта.

Цель исследования – изучить эффекты в/б введения дихолинсукцината на общие уровни N-ацетиласпартата в мозге 16-месячных пожилых мышей в сравнении с 5-месячными молодыми взрослыми животными с использованием ^1H ЯМР *in vivo* и сопоставить эти результаты с результатами тестирования когнитивной функции.

Все 16-месячные животные были распределены по экспериментальным группам, минимум по 8 животных в группе, случайным образом с использованием сгенерированных компьютером случайных чисел. Животные получали один раз в день, семь дней подряд, в/б инъекции ДХС в дозе 1 мг/кг (группа 1), 10 мг/кг (группа 2) и 25 мг/кг (группа 3) или физ. раствор (группа 4, контроль). Группа 5-месячных животных получала физ. раствор в/б в течение 7 дней. Затем животных тестировали в батарее когнитивных тестов и снимали ^1H ЯМР спектр мозга в дни, указанные в плане исследований (Рисунок 40).

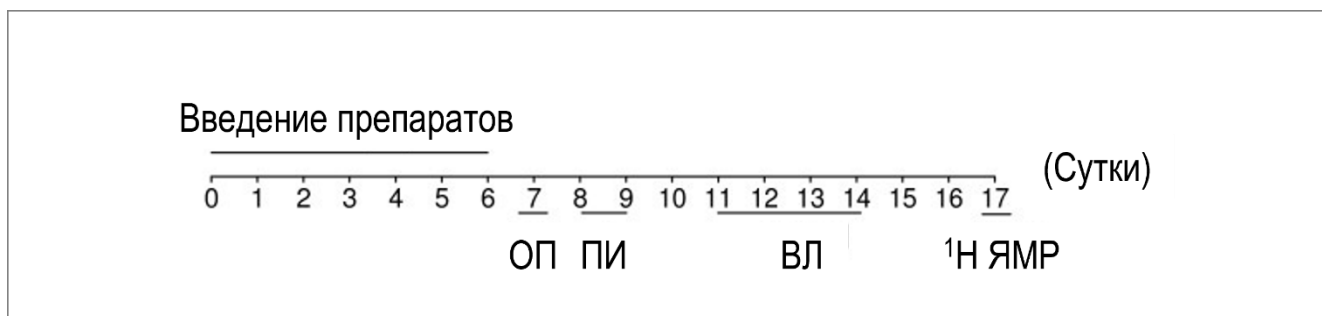


Рисунок 40 - План исследований. ОП – тест открытое поле; ПИ – тест пассивного избегания; ВЛ – водный лабиринт Морриса; ^1H ЯМР – ^1H ЯМР *in vivo*.

Тест «открытое поле» показал значимую разницу в спонтанной двигательной активности между 5-месячными и 16-месячными мышами ($p < 0,001$). Курсовое в/б введение ДХС в дозах 1–25 мг/кг статистически значимо повысило спонтанную двигательную активность пожилых 16-месячных мышей ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных того же возраста (Рисунок 41).

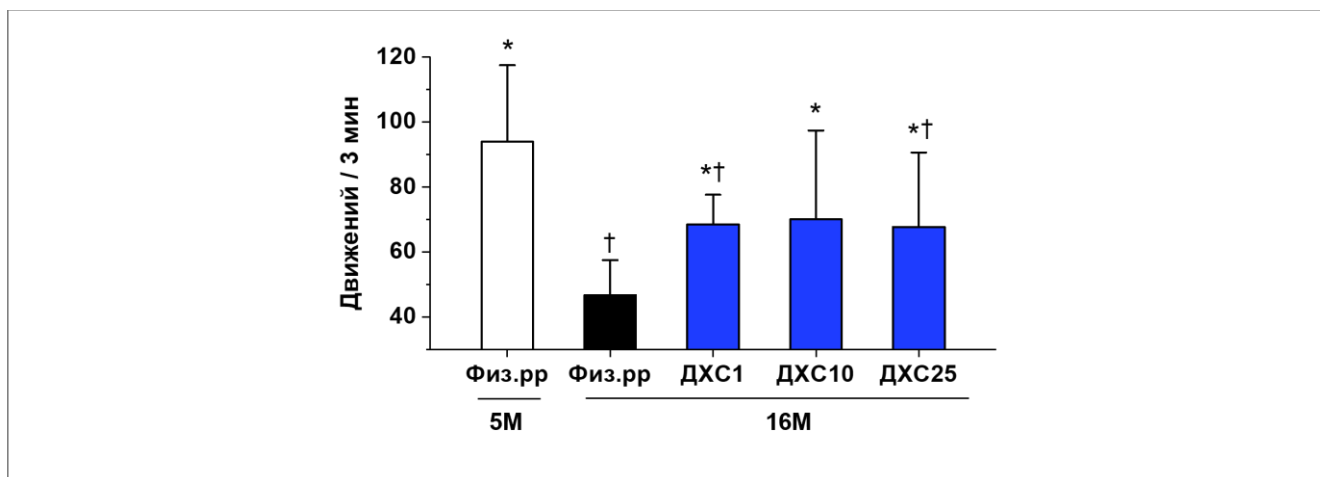


Рисунок 41 - Эффект ДХС на спонтанную двигательную активность у 16-месячных мышей ([398]). Контрольные 5-месячные (5М) и 16-месячные (16М) животные получали в/б физ. раствор. В опытных группах 16-месячные животные получали в/б ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). В столбцах представлены $M \pm m$ подсчета двигательной активности ($n \geq 8$). * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными 16-месячными животными (Физ.рр / 16М); † $p < 0,05$ по сравнению с контрольными 5-месячными животными (Физ.рр / 5М).

Тест пассивного избегания показал отсутствие значимых отличий между всеми группами животных в задержке спуска на платформу в первый день исследования ($p > 0,05$), но во второй сессии через 24 часа наблюдалось статистически значимое отличие между 16-месячными и 5-месячными мышами ($p < 0,05$) из-за возрастного снижения способности к обучению. ДХС в дозах 10 и 25 мг/кг увеличил время задержки перед спуском у 16-месячных мышей ($p < 0,05$) по сравнению с контролем того же возраста, что указывает на положительное влияние ДХС на обучение и память у пожилых мышей (Рисунок 42).

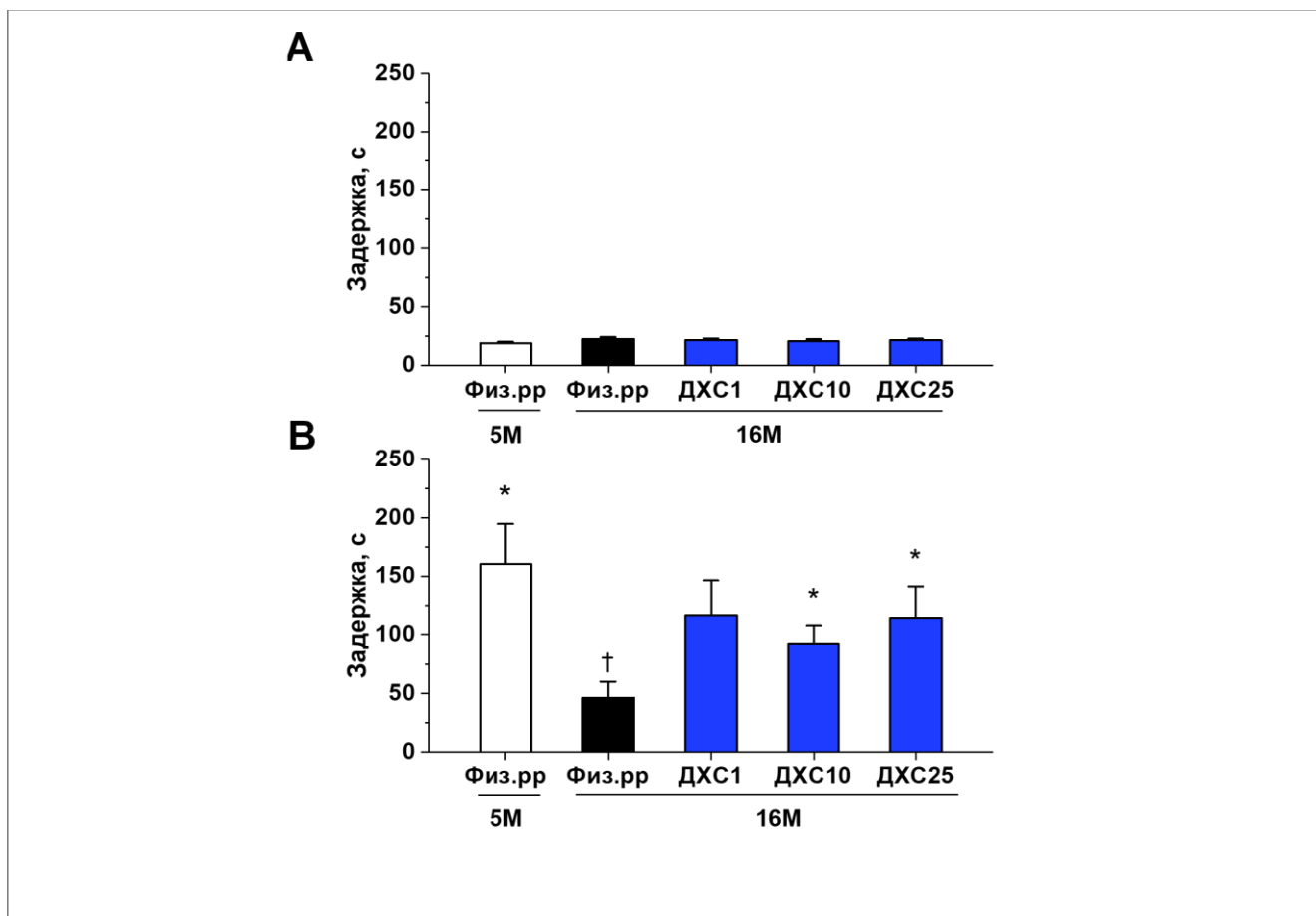


Рисунок 42 - Эффект ДХС на обучение и память в тесте пассивного избегания у 16-месячных мышей ([398]). Контрольные 5-месячные (5М) и 16-месячные (16М) животные получали физ. раствор в/б. В опытных группах 16-месячные животные получали ДХС в/б в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). Животных тестировали в первый день (А) и через 24 часа (В). Столбцы представляют $M \pm m$ задержки спуска с платформы (с), ($n \geq 8$). * $p < 0,05$ по сравнению с Физ.рр 16М; † $p < 0,05$ по сравнению с по сравнению с Физ.рр 5М.

Тестирование в водном лабиринте Морриса показало, что длина пути и время до обнаружения скрытой платформы (задержка) уменьшались от сессии к сессии в течение 4-дневного периода обучения во всех группах мышей (Рисунок 43).

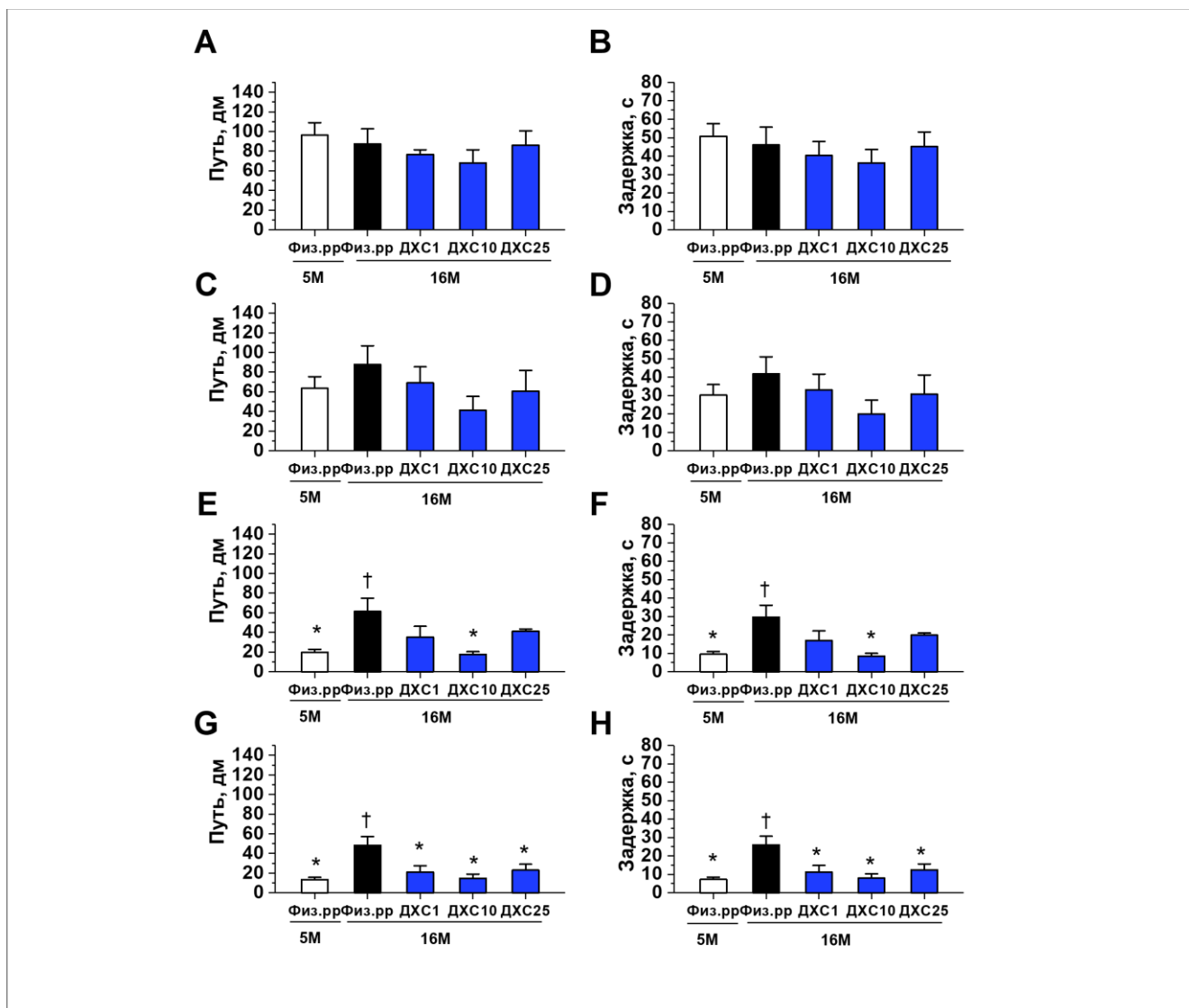


Рисунок 43 - Эффект ДХС на обучение 16-месячных мышей в водном лабиринте ([398]). Контрольные 5-месячные (5М) и 16-месячные (16М) животные получали в/б физ. раствор. В опытных группах 16-месячные животные получали ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). В столбцах представлены $M \pm m$ длины пути до платформы и задержки до обнаружения скрытой платформы в первый (А, В), второй (С, D), третий (Е, F) и четвертый (G, H) день тестирования ($n \geq 8$). * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными 16-месячными животными (Физ.рр 16М); † $p < 0,05$ по сравнению с контрольными 5-месячными животными (Физ.рр 5М).

Двухсторонний дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый эффект дня тестирования во всех экспериментальных группах ($p < 0,01$), при этом наблюдалась значимая разница между 16-месячными мышами и 5-

месячными мышами на третий день ($p < 0,01$) и четвертый день ($p < 0,001$) обучения по показателям длины пути до платформы и задержке до обнаружения платформы, что указывает на более медленное пространственное обучение более пожилых мышей в сравнении с более молодыми животными. Двусторонний ANOVA выявил также значительные отличия между группами по дням тестирования ($F_{1,16} = 26,9$; $p < 0,01$) и взаимодействие группы \times день ($F_{1,3,70} = 7,51$; $p < 0,05$), когда группы 5- и 16-месячных мышей сравнивались. ДХС статистически значимо снизил задержку до обнаружения платформы у 16-месячных мышей ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой того же возраста на четвертый день обучения при введении в дозах 1–25 мг/кг. Двусторонний дисперсионный анализ выявил статистически значимые групповые эффекты для доз ДХС 1 мг/кг ($F_{1,14} = 8,47$; $p < 0,05$) и 25 мг/кг ($F_{1,15} = 7,26$; $p < 0,05$) по дням, а также значительный как групповой эффект ($F_{1,14} = 10,48$; $p < 0,05$), так и взаимодействий группа \times день ($F_{1,1,62} = 6,79$; $p < 0,05$) для дозы 10 мг/кг. ДХС статистически значимо уменьшил длину пути до платформы у 16-месячных мышей по сравнению с контрольной группой того же возраста на 4-й день обучения при введении в дозах 1–25 мг/кг ($p < 0,05$). Двусторонний дисперсионный анализ выявил значимые групповые эффекты для доз ДХС 1 мг/кг ($F_{1,14} = 8,01$; $p < 0,05$) и 25 ($F_{1,15} = 6,95$; $p < 0,05$) по дням, а также значимый эффект как для групп ($F_{1,14} = 9,84$; $p < 0,05$), так и взаимодействий группа \times день ($F_{1,1,62} = 7,01$; $p < 0,05$) для дозы ДХС 10 мг/кг. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что ДХС значительно улучшил пространственное обучение у пожилых 16-месячных мышей по сравнению с мышами того же возраста, получавшими физ. раствор.

Через 11 дней после последнего введения препаратов у животных в группах измерили общие уровни N-ацетиласпартата в мозге методом ^1H ЯМР *in vivo* и нормировали их на уровни креатина, измеренного тем же способом. Индекс NAA/Cr использовали в качестве меры NAA в мозге.

Средняя величина NAA/Cr в мозге контрольных 16-месячных мышей была на 30% ниже, чем у контрольных 5-месячных, что отражает возрастные изменения в снижении биоэнергетики нейронов (Рисунок 44).

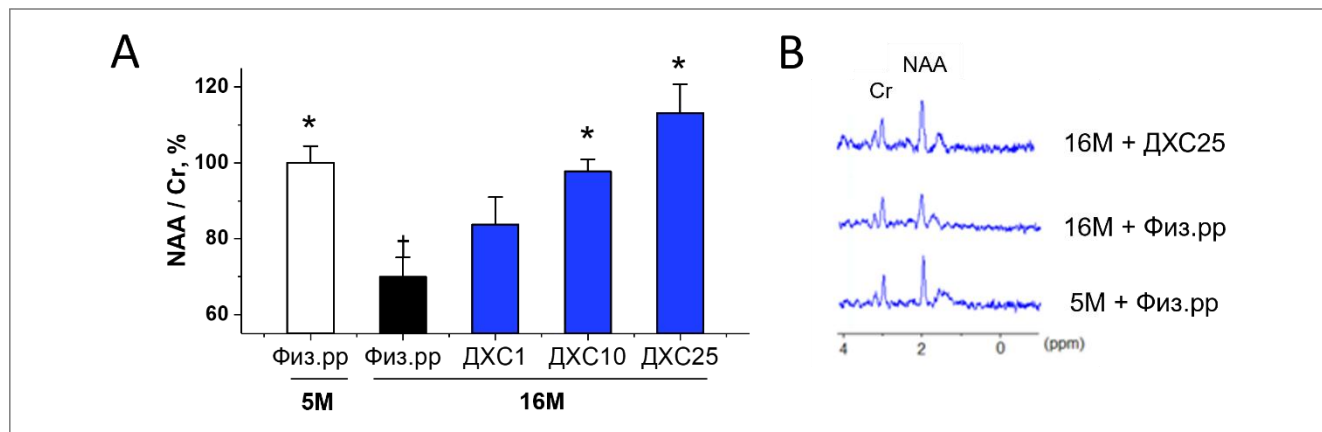


Рисунок 44 - Эффект ДХС на уровни NAA/Cr в головном мозге 16-месячных мышей по данным ^1H ЯМР *in vivo* ([398]). (А) Общие уровни NAA/Cr в мозге. Контрольные 5-месячные (5М) и 16-месячные (16М) животные получали в/б физ. раствор. В опытных группах 16-месячные животные получали в/б ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). В столбцах представлены $M \pm m$ значений NAA/Cr ($n \geq 8$). * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными 16-месячными животными (Физ.рр 16М); † $p < 0,05$ по сравнению с по сравнению с контрольными 5-месячными животными (Физ.рр 5М). (В) Репрезентативные спектры ^1H ЯМР мозга контрольных 5-месячных мышей (5М + Физ.рр), контрольных 16-месячных мышей (16М + Физ.рр) и 16-месячных мышей, получавших ДХС в дозе 25 мг/кг (16М + ДХС25). Отнесение сигналов: NAA, протоны CH_3 -группы NAA; Cr, протоны CH_3 -группы Cr.

При курсовом введении в дозах 10 и 25 мг/кг в/б ДХС статистически значимо увеличивал уровни NAA/Cr во всем мозге у 16-месячных мышей по сравнению с контрольной группой того же возраста, получавшей физ. раствор ($p < 0,01$), что указывает на повышение биоэнергетики нейронов мозга у пожилых животных после введения ДХС.

Пожилые 16-месячные мыши проявляют признаки возрастного когнитивного снижения, выражающегося в уменьшении спонтанной двигательной активности в

простом сенсомоторном тесте открытого поля, снижении долговременной памяти оборонительного поведения в тесте пассивного избегания и снижении пространственного обучения в водном лабиринте Морриса в сравнении с 5-месячными животными. Это когнитивное снижение у пожилых животных сопровождалось значимым 30% снижением общемозгового уровня N-ацетиласпартата в сравнении с более молодыми 5-месячными животными. NAA – исключительно нейрональный маркер, снижение которого в условиях повреждения мозга (инсульт и ЧМТ) отражает потерю нейронов, а в отсутствие повреждений характеризует сниженную работоспособность митохондрий в нейронах, так как синтез NAA привязан к синтезу оксалоацетата в цикле трикарбоновых кислот и меняется синхронно с уровнем АТФ и потреблением кислорода нейронами [407, 408]. В этом контексте возрастное когнитивное снижение у 16-месячных животных связано со снижением биоэнергетики нейронов.

Дихолинсукцинат при коротком курсовом введении существенно улучшил когнитивные функции у пожилых 16-месячных мышей с одновременным повышением уровней N-ацетиласпартата в мозге. Эти результаты вполне согласуются с механизмом действия ДХС как нейронального инсулин-сенситайзера, способного поддерживать высокую активность инсулинового рецептора в нейронах в ответ на релевантные эндогенным низкие уровни инсулина, так как известно, что инсулиновая сигнализация в мозге имеет фундаментальное значение для процессов обучения и памяти [47, 52, 99, 104]. Кроме того, эти результаты согласуются с известной способностью инсулина повышать уровни N-ацетиласпартата в мозге, что было показано в клинических испытаниях на здоровых добровольцах, получавших инфузию инсулина в условиях поддержания нормальной концентрации глюкозы в крови (эугликемический клэмп) [418]. Уже через 4 часа инсулин повышал уровни NAA/Cr в мозге на 16% ($p=0,0018$), причем повышение положительно коррелировало с чувствительностью к инсулину (коэффициент корреляции $r = 0,78$, $p<0,001$), что указывает на связь между снижением уровней NAA в мозге и инсулиновой резистентностью.

В контексте того, что сниженные уровни NAA/Cr в лобной доле у пациентов после инсульта предсказывают снижение когнитивных функций в будущем [412], а три четверти всех инсультов происходят у лиц в возрасте ≥ 65 лет, полученные в настоящем исследовании результаты указывают на возможность использования дихолинсукцината как средства-кандидата для повышения уровней N-ацетиласпартата и восстановления сниженных когнитивных функций в периоде реабилитации после инсульта.

Таким образом, впервые показано, что дихолинсукцинат повышает уровни N-ацетиласпартата в мозге, сниженные вследствие процесса хронологического старения. Курсовое введение дихолинсукцината обеспечивает статистически значимое улучшение когнитивных функций у пожилых животных с одновременным повышением уровней N-ацетиласпартата в мозге. С учетом того, что ишемический инсульта преобладает среди пожилых, дихолинсукцинат может рассматриваться как средство-кандидат для восстановления сниженных когнитивных функций и повышения уровней N-ацетиласпартата в восстановительном периоде после инсульта у возрастных пациентов.

6.7 Исследование эффектов дихолинсукцината на модели токсичности β -амилоида 25-35 у крыс

Значительная часть пациентов, выживших после ишемического инсульта, страдают постинсультными когнитивными нарушениями, и роль церебрального β -амилоида в этом процессе широко дискутируется среди прочих механизмов, но остается до сих пор неясной [426, 427], хотя по некоторым данным в одной трети случаев деменция после инсульта развивается по типу болезни Альцгеймера [428].

Спорадическая деменция по типу болезни Альцгеймера моделируется однократной инъекцией β -амилоидного пептида 25–35 в базальное ядро Мейнерта мозга крыс. Модель характеризуется нарушениями поведения, ухудшением обучения и памяти, а также нарушением холинергической иннервации в коре мозга [429]. Кроме того, введение β -амилоидного пептида 25–35 снижает активность

холинацетилтрансферазы, ключевого фермента биосинтеза ацетилхолина в мозге [430].

Цель исследования – изучить эффекты в/б введения дихолинсукцината (ДХС) на когнитивную функцию и активность холинацетилтрансферазы на модели деменции у крыс, вызванной введением β -амилоидного пептида 25-35 в базальное ядро Мейнерта.

Все животные были распределены по экспериментальным группам, по 8 животных в группе, случайным образом с использованием сгенерированных компьютером случайных чисел. Крысам делали однократную внутримозговую инъекцию β -амилоидного пептида 25–35 (А β) или физ. раствора (ложнооперированные животные) в базальное ядро Мейнерта. Через две недели А β -индуцированные животные начали получать один раз в день, семь дней подряд, в/б инъекции ДХС в дозе 1 мг/кг (группа 1), 10 мг/кг (группа 2), 25 мг/кг (группа 3), физ. раствор (группа 4, контроль), или холина хлорид в дозе 10 мг/кг (группа 5). Группа ложнооперированных животных получала физ. раствор в/б в течение 7 дней. Затем животных тестировали в тесте пассивного избегания и измеряли активность холинацетилтрансферазы в дни, указанные в плане исследований (Рисунок 45).

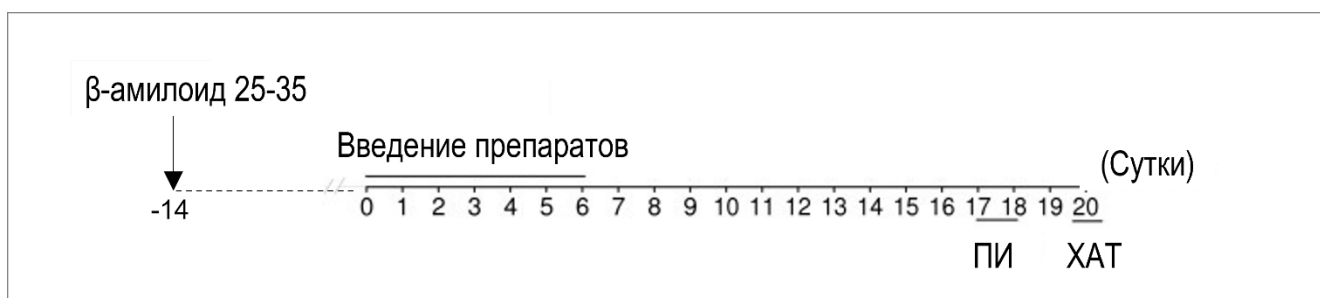


Рисунок 45 - План исследований. ПИ – тест пассивного избегания; ХАТ – измерение холинацетилтрансферазы.

Результаты теста пассивного избегания показали наличие статистически значимой разницы в задержке перехода из светлого в темный отсек между ложнооперированными животными и животными, получившими внутримозговую инъекцию β -амилоидного пептида 25–35 (А β), как в первый ($p < 0,05$), так и второй день тестирования ($p < 0,01$). А β -индуцированные животные, получавшие ДХС в

дозах 10 и 25 мг/кг, имели статистически значимо сниженную задержку перехода из светлого в темный отсек в первый день испытаний ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными А β -индуцированными животными, получавшими физ. раствор. Во второй день тестирования ДХС в дозах 10 и 25 мг/кг статистически значимо повышал задержку перехода из светлого в темный отсек у А β -индуцированных животных ($p < 0,01$) по сравнению с А β -индуцированными животными, получавшими физ. раствор. Эти результаты указывают на то, что дихолинсукцинат улучшает долговременную память оборонительного поведения у животных с когнитивным снижением, вызванным токсичностью β -амилоида (Рисунок 46).

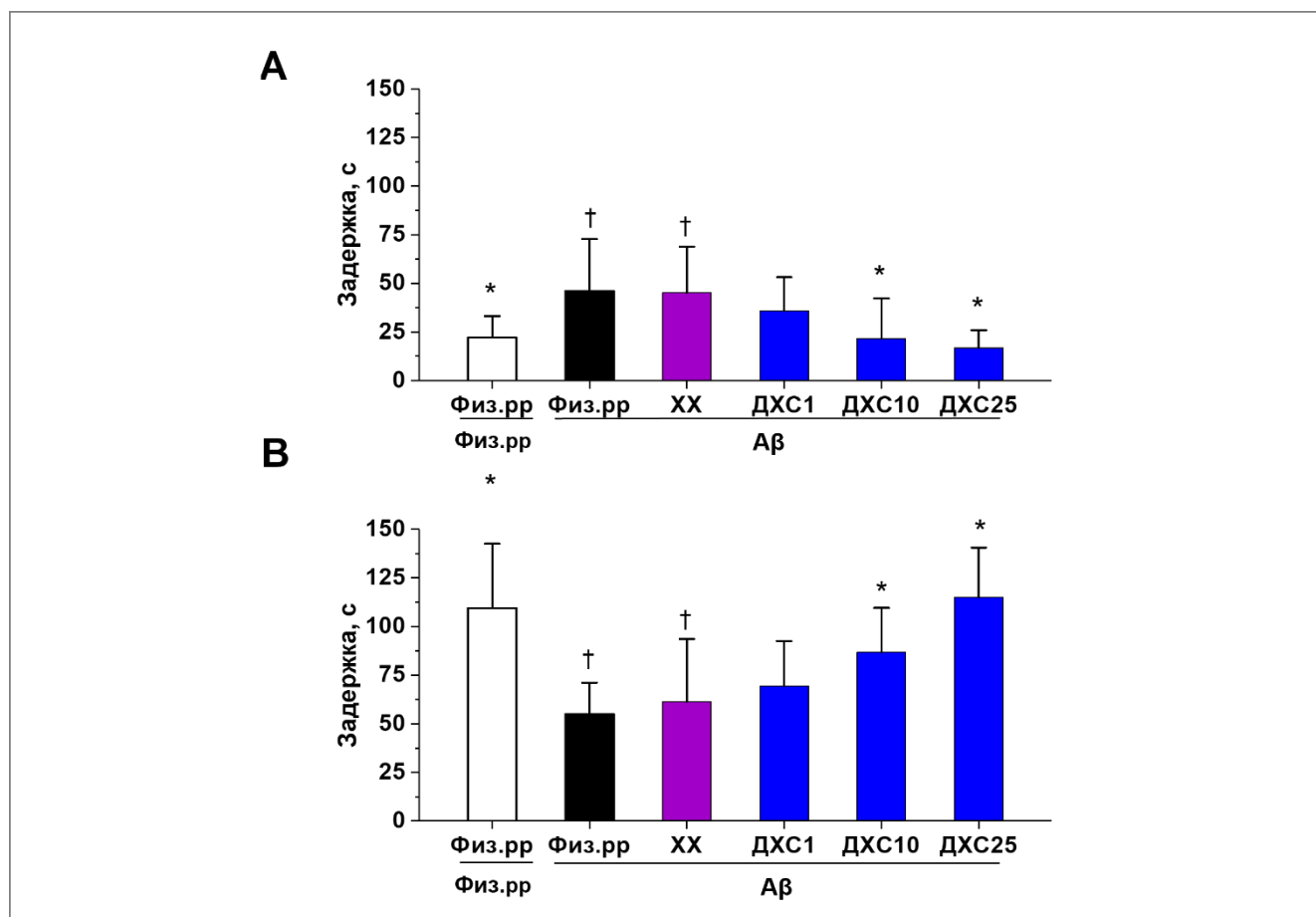


Рисунок 46 - Эффект ДХС на обучение и память в тесте пассивного избегания у А β -индуцированных крыс ([398]). Ложнооперированные животные получали в/б физ. раствор (Физ.рр Физ.рр). А β -индуцированные животные получали в/б физ. раствор (Физ.рр), 10 мг/кг холина хлорида (XX) или ДХС в дозе 1 мг/кг (ДХС1), 10 мг/кг (ДХС10), или 25 мг/кг (ДХС25). Животных тестировали в первый день (А) и через 24 часа (В). Столбцы представляют $M \pm m$ задержки перехода в темный отсек, с

(n=8). *p<0,05 по сравнению с Аβ-индуцированными животными (Физ.рр. / Аβ) †p<0,05 по сравнению с ложнооперированными животными (Физ.рр / Физ.рр).

Введение β-амилоидного пептида 25–35 вызвало статистически значимое снижение на 27% активности холинацетилтрансферазы в мозге (p<0,001) по сравнению ложнооперированным контролем, что указывает на холинергическую дисфункцию, вызванную токсичностью β-амилоида (Таблица 15).

Таблица 15 - Эффект ДХС на активность холинацетилтрансферазы (ХАТ) в мозге Аβ-индуцированных крыс ([398]).

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 М ± m активности ХАТ (n=8). *p<0,05 по сравнению с Аβ + физ. раствор. †p<0,05 по сравнению с ложнооперированными животными (Физ. раствор + физ. раствор).

Введение ДХС в максимальной изучаемой дозе 25 мг/кг вызвало статистически значимое повышение активности ХАТ в мозге у Аβ-индуцированных животных (p < 0,05), по сравнению с Аβ-индуцированными животными, получавшими физ. раствор.

Вещество сравнения, холина хлорид в дозе 10 мг/кг в/б не показал статистически значимого влияния на обучение в тесте пассивного избегания и церебральную активность ХАТ у Аβ-индуцированных крыс с амнезией (p>0,05) по сравнению Аβ-индуцированными животными, получавшими физ. раствор.

После внутримозгового введения β -амилоидного пептида 25–35 в базальное ядро Мейнерта крысы проявляют признаки когнитивного снижения, выражающееся в снижении долговременной памяти оборонительного поведения в тесте пассивного избегания, а также снижении активности холинацетилтрансферазы, ключевого фермента в синтезе ацетилхолина, что свидетельствует о развивающемся в результате инъекции β -амилоида дефиците холинергической нейротрансмиссии.

Дихолинсукцинат при в/б введении коротким курсом 7 дней статистически значимо улучшил обучение и память в тесте пассивного избегания у крыс с когнитивным снижением, индуцированным β -амилоидным пептидом, а также в максимальной исследованной дозе повысил активность холинацетилтрансферазы, сниженную введением β -амилоида.

Дихолинсукцинат является нейрональным инсулин-сенситайзером, повышающим фосфорилирование (активацию) инсулинового рецептора в нейронах в ответ на релевантные эндогенным низкие уровни инсулина. Этот механизм сенситизации рецептора инсулина достаточно объясняет полученные в настоящем исследовании результаты в контексте известных фактов, что β -амилоид вызывает резистентность к инсулину, нарушая связывание инсулина рецепторами [432] и препятствуя фосфорилированию рецепторов [133], тогда как инсулин положительно влияет на оба изученных в исследовании параметра – на когнитивную функцию [47, 52, 99, 104] и на экспрессию холинацетилтрансферазы в мозге [433].

С учетом того, что токсичность β -амилоида может вносить вклад в риск развития постинсультных когнитивных нарушений [428], полученные в настоящем исследовании результаты указывают на возможность использования дихолинсукцината для снижения риска развития деменции в периоде реабилитации после инсульта.

Таким образом, впервые показано, что дихолинсукцинат повышает активность холинацетилтрансферазы в мозге, сниженную введением токсичного β -

амилоидного пептида. Курсовое введение дихолинсукцината обеспечивает статистически значимое улучшение когнитивных функций у животных с когнитивным снижением, вызванным токсичностью β -амилоида. Полученные результаты показывают перспективу дихолинсукцината как средства-кандидата для снижения риска развития деменции вызванной токсичностью β -амилоида.

В целом, дихолинсукцинат показал высокую эффективность в исследованиях доказательства концепции его использования как нейронального инсулин-сенситайзера на биомоделях, где инсулиновая резистентность является известным патогенетическим фактором. Последующие доклинические и клинические исследования препарата Дирекорд, содержащего дихолинсукцинат в качестве действующего вещества, подтвердили, что дихолинсукцинат является эффективным и безопасным средством для лечения ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде, в период первых трех месяцев, когда постинсультная инсулиновая резистентность является фактором, препятствующим восстановлению функций мозга.

Акт о проведении полного комплекса доклинических исследований эффективности и безопасности препарата Дирекорд для получения разрешения на проведение первой фазы клинического исследования представлен в Приложении А.

Акт об успешном завершении клинических исследований I, II и III фазы препарата Дирекорд по показанию лечение ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде представлен в Приложении Б.

Справочная информация о дизайне и результатах клинического исследования I фазы препарата Дирекорд представлена в Приложении В.

Справочная информация о дизайне и результатах клинического исследования II фазы эффективности и безопасности препарата Дирекорд представлена в Приложении Г.

Справочная информация о дизайне и результатах клинического исследования III фазы эффективности и безопасности препарата Дирекорд представлена в Приложении Д.

6.8 Выводы по главе 6:

1. 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.

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.

Основные результаты работы могут быть сформулированы в виде следующих выводов:

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.

СОКРАЩЕНИЯ

$[Ca^{2+}]_i$	концентрация внутриклеточного кальция
1H ЯМР	магнитнорезонансная спектроскопия на ядрах 1H
2VO	окклюзия двух сонных артерий
^{31}P ЯМР	магнитнорезонансная спектроскопия на ядрах ^{31}P
4EBP1	связывающий белок 1 эукариотического фактора инициации трансляции 4E
AMPA	ионотропный глутаматный рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
ANOVA	дисперсионный анализ
$AUC_{0-\infty}$	площадь под фармакокинетической кривой до бесконечности
AUC_{0-t}	площадь под фармакокинетической кривой до времени отбора последнего образца крови t
AUC_{τ}	площадь под фармакокинетической кривой в пределах интервала дозирования
BAD	BLC2 антагонист клеточной смерти
BDNF	нейротрофический фактор мозга
β III Tub	бета тубулин III класса
BLC2	регулятор апоптоза BLC2
C_{max}	максимальная концентрация вещества в плазме
C_{min}	значение концентрации вещества в плазме крови в конце интервала дозирования
CoQ	кофермент Q
CoQH ₂	восстановленная форма кофермента Q
Cr	креатин
DAMPs	связанные с повреждением молекулярные паттерны
EC ₅₀	концентрация полумаксимального эффекта
eIF4E	эукариотический фактор инициации трансляции 4E

Erk1,2	внеклеточным сигналом-активируемая киназа 1,2
FCCP	карбонил цианид-п-трифторметоксифенилгидразона
FOXOs	англ. forkhead box белок O
GABAAR	рецептора γ -аминомасляной кислоты типа A
GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок
GLP-1	глюкагоноподобный пептид 1
GLUT3	транспортер глюкозы 3
GLUT4	транспортер глюкозы 4
Gpx1	глутатионпероксидаза 1
Grb2	связывающий белок 2 рецепторов факторов роста
GS	гликогенсинтаза
GSK3 β	гликогенсинтазы киназа 3 β
GTP	гуанозинтрифосфат
G α_{12}	G-белок альфа2i
NMGB1	белок бокс 1 группы высокой подвижности
HOMA-IR	гомеостатический индекс инсулиновой резистентности
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования
IGF1R	рецептор инсулиноподобного фактора роста типа 1
IGF2	инсулиноподобный фактор роста 2
IGF2R	рецептор инсулиноподобного фактора роста типа 2
IGFR	рецептор инсулиноподобного фактора роста
IL-1 β	интерлейкин 1 β
IRS	субстрат инсулинового рецептора
IRS1	субстрат инсулинового рецептора 1
IRS2	субстрат инсулинового рецептора 2
IRSp53	субстрат инсулинового рецептора p53
k_{el}	константа скорости элиминации
K _m	константа Михаэлиса
Mek	митоген-активируемая протеинкиназа

mGluR	метаботропный глутаматный рецептор
mTORC1/2	мишень рапамицина млекопитающих комплекс 1/2
NAA	N-Ацетиласпартат
NAC	N-ацетилцистеин
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -обменник
NF-κB	ядерный фактор κB
NGF	фактор роста нервов
NIHSS	шкала тяжести инсульта Национального Института Здравоохранения США
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза
NMDAR	N-метил-D-аспартат ионотропный глутаматный рецептор
NOX2	никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза 2
NOX4	никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза 4
PI3K	фосфатидилинозитол-зависимая киназа 1
Prx1	пероксиредоксин 1
Prx2	пероксиредоксин 2
Prx3	пероксиредоксин 3
PTP1B	протеинтирозинфосфатаза 1B
PTX	коклюшный токсин
r56	рибосомальный белок S6
Raf	Raf-1 киназа
RHEB	гомолог RAS в мозге
S6K	S6 киназа
$T_{1/2}$	период полувыведения
TC_{max}	время достижения максимальной концентрации вещества в плазме
TLR4	толл-подобный рецептор 4
TNF-α	фактор некроза опухоли альфа

TSC2	туберин
VGCC	потенциал-зависимые кальциевые каналы
V_{max}	максимальная скорость реакции
$\Delta\Psi_m$	потенциал внутренней мембраны митохондрий
A β	β -амилоид
АД	артериальное давление
АДФ	аденозиндифосфат
АКТ	протеинкиназа АКТ/В
АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
БА	болезнь Альцгеймера
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ	газовая хроматография
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДХС	дихолинсукцинат
ИР	инсулиновый рецептор
ИР-А	инсулиновый рецептор изоформа А
ИР-В	инсулиновый рецептор изоформа В
КТ	компьютерная томография
H ₂ O ₂	перекись водорода
НЯ	нежелательное явление
ОКД	отсроченная кальциевая дерегуляция
ПТФ	протеинтирозинфосфатаза
СДГ	сукцинатдегидрогеназа
СМЖ	спинномозговая жидкость
ФК	фосфокреатин
ФМЭ	фосфомоноэфиры
Фн	неорганический фосфат
ХАТ	холинацетилтрансфераза

ЦНС

центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медико-демографические показатели Российской Федерации в 2012 году` 2013: Стат. справочник/Минздрав России. – М., 2013. – 180 с.
2. Стаховская Л.В., Ключихина О.А., Богатырева М.Д., Чугунова С.А. Анализ эпидемиологических показателей повторных инсультов в регионах Российской Федерации (по итогам территориально-популяционного регистра 2009–2014 гг.). *Consilium Medicum*. 2016; 18 (9): 8–11.
3. Feigin V.L., Brainin M., Norrving B., Martins S., Sacco R.L., Hacke W., Fisher M., Pandian J., Lindsay P. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. // *Int. J. Stroke*. 2022. Vol. 17, № 1, P. 18–29.
4. Wardlaw J.M., Murray V., Berge E., del Zoppo G.J. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. // *Cochrane Database Syst. Rev*. 2014. Vol. 2014, № 7, P. CD000213.
5. O'Collins V.E., Macleod M.R., Donnan G.A., Horkey L.L., Van Der Worp B.H., Howells D.W. 1,026 experimental treatments in acute stroke. // *Ann. Neurol*. 2006. Vol. 59, P. 467–477.
6. Lourbopoulos A., Mourouzis I., Xinaris C., Zerva N., Filippakis K., Pavlopoulos A., Pantos C. Translational Block in Stroke: A Constructive and "Out-of-the-Box" Reappraisal // *Front. Neurosci*. 2021. Vol. 15, P. 652403.
7. Li S., Yin C., Zhao W., Zhu H., Xu D., Xu Q., Jiao Y., Wang X., Qiao H. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the poor functional outcomes in nondiabetic patients with ischemic stroke. // *Biosci. Rep*. 2018. Vol. 38, № 3, P. BSR20180330.
8. Jing J., Pan Y., Zhao X., Zheng H., Jia Q., Mi D., Chen W., Li H., Liu L., Wang C., He Y., Wang D., Wang Y., Wang Y. Insulin Resistance and Prognosis of Nondiabetic Patients with Ischemic Stroke: The ACROSS-China Study (Abnormal Glucose Regulation in Patients with Acute Stroke Across China). // *Stroke*. 2017. Vol. 48, № 4, P. 887-893.
9. Åberg D., Åberg N.D., Jood K., Holmegaard L., Redfors P., Blomstrand C., Isgaard J., Jern C., Svensson J. Homeostasis model assessment of insulin resistance and outcome of

ischemic stroke in non-diabetic patients - a prospective observational study. // *BMC Neurol.* 2019. Vol. 19, № 1, P. 177.

10. Ago T., Matsuo R., Hata J., Wakisaka Y., Kuroda J., Kitazono T., Kamouchi M. Insulin resistance and clinical outcomes after acute ischemic stroke. // *Neurology.* 2018. Vol. 90, № 17, P. e1470–e1477.

11. Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, P. 7300–7308.

12. Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Morgan S.V., Simpson J.E., Owens H., Vazquez-Villaseñor I., Heath P.R., Romero I.A., Ince P.G., Wharton S.B. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. // *Mol. Brain.* 2015. Vol. 8, P. 51.

13. Heidenreich K.A., Zahniser N.R., Berhanu P., Brandenburg D., Olefsky J.M. Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258, №. 14, P. 8527–8530.

14. Gammeltoft S., Fehlmann M., Van Obberghen E. Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristics and subunit structure. // *Biochimie.* 1985. Vol. 67, № 10–11, P. 1147–1153.

15. Banting F.G., Best C.H. The Internal Secretion of the Pancreas. // *J. Lab. Clin. Med.* 1922. Vol. 7, P. 2–60.

16. Vecchio I., Tornali C., Bragazzi N.L., Martini M. The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine. // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018. Vol. 9, P. 613.

17. Brown H., Sanger F., Kitai R. The structure of pig and sheep insulins. // *Biochem. J.* 1955. Vol. 60, № 4, P. 556–565.

18. Havrankova J., Schmechel D., Roth J., Brownstein M. Identification of insulin in rat brain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1978. Vol. 75, № 11, P. 5737–5741.

19. Havrankova J., Roth J., Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. // *Nature.* 1978. Vol. 272, № 5656, P. 827–299.

20. Rosenzweig JL, Havrankova J, Lesniak MA, Brownstein M, Roth J. Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Jan;77(1):572-576.
21. Havrankova J, Roth J, Brownstein M.J. Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. // *J. Clin. Invest.* 1979. Vol. 64, № 2, P. 636–642.
22. Havrankova J, Brownstein M., Roth J. Insulin and insulin receptors in rodent brain. // *Diabetologia*. 1981. Vol. 20 (Suppl 1), P. 268–273.
23. Baura G.D., Foster D.M., Porte D., Kahn S.E., Bergman R.N., Cobelli C., Schwartz M.W. Saturable Transport of Insulin from Plasma into the Central Nervous System of Dogs in Vivo. A Mechanism for Regulated Insulin Delivery to the Brain. // *J. Clin. Investig.* 1993. Vol. 92, P. 1824–1830.
24. Banks W.A., Jaspan J.B., Huang W., & Kastin A.J. Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. // *Peptides*. 1997. Vol. 18, P. 1423–1429.
25. Gray S.M., Aylor K.W., & Barrett E.J. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. // *Diabetologia*. 2017. Vol 60, № 8, P. 1512–1521.
25. Rhea E.M., Rask-Madsen C., Banks W.A. Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor. // *J. Physiol.* 2018. Vol. 596, № 19, P. 4753–4765.
27. Banks W.A., Noonan C., Rhea E.M. Evidence for an alternative insulin transporter at the blood-brain barrier. // *Aging Pathobiol. Ther.* 2022. Vol. 4, № 4, P. 100–108.
28. Devaskar S.U., Giddings S.J., Rajakumar P.A., Carnaghi L.R., Menon R.K., Zahm D.S. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 11, P. 8445–8454.
29. Birch N.P., Christie D.L., Renwick A.G.C. Proinsulin-like Material in Mouse Foetal Brain Cell Cultures. // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 168, P. 299–302.
30. Weyhenmeyer J.A., Fellows R.E. Presence of Immunoreactive Insulin in Neurons Cultured from Fetal Rat Brain. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 1983. Vol. 3, P. 81–86.

31. Schechter R., Holtzclaw L., Sadiq F., Kahn A., Devaskar S. Insulin Synthesis by Isolated Rabbit Neurons. *Endocrinology*. // 1988. Vol. 123, P. 505–513.
32. Clarke D.W., Mudd L., Boyd F.T., Fields M., Raizada M.K. Insulin Is Released from Rat Brain Neuronal Cells in Culture. // *J. Neurochem.* 1986. Vol. 47, P. 831–836.
33. Bachring S., O’leary T., Alavi N., Holenka D., Li H., Mehran A., Belmadani M., Pavalidis P., Bamji S., Johnson J. Insulin (Ins2) Is Expressed in the Brain and Its Global Deletion Leads to Learning Deficits, Anxiety and Reduced Hippocampal Cyclin D1 Expression in Female Mice. // *Can. J. Diabetes.* 2020. Vol. 44, № 7(Suppl.), P. S29–S30.
34. Mehran A.E., Templeman N.M., Brigidi G.S., Lim G.E., Chu K.-Y., Hu X., Botezelli J.D., Asadi A., Hoffman B.G., Kieffer T.J., et al. Hyperinsulinemia Drives Diet-Induced Obesity Independently of Brain Insulin Production. // *Cell Metab.* 2012. Vol. 16, P. 723–737.
35. Molnár G., Faragó N., Kocsis Á.K., Rózsa M., Lovas S., Boldog E., Báldi R., Csajbók É., Gardi J., Puskás L.G., et al. GABAergic Neurogliaform Cells Represent Local Sources of Insulin in the Cerebral Cortex. // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34, P. 1133–1137.
36. Wei L.T., Matsumoto H., Rhoads D.E. Release of immunoreactive insulin from rat brain synaptosomes under depolarizing conditions. // *J. Neurochem.* 1990. Vol. 54, P. 1661–1665.
37. Skeberdis V.A., Lan J., Zheng X., Zukin R.S., Bennett M.V. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, P. 3561–3566.
38. Liu L., Brown J.C.^{3rd}, Webster W.W., Morrisett R.A., Monaghan D.T. Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. // *Neurosci. Lett.* 1995. Vol. 192, P. 5–8.
39. Chen C., Leonard J.P. Protein tyrosine kinase-mediated potentiation of currents from cloned NMDA receptors. // *J. Neurochem.* 1996. Vol. 67, P. 194–200.
40. Christie J.M., Wenthold R.J., Monaghan D.T. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. // *J. Neurochem.* 1999. Vol. 72, P. 1523–1528.

41. Liao G.Y., Leonard J.P. Insulin modulation of cloned mouse NMDA receptor currents in *Xenopus* oocytes. // *J. Neurochem.* 1999. Vol. 73, P. 1510–1519.
42. Jones M.L., Leonard J.P. PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. // *J. Neurochem.* 2005. Vol. 92, P. 1431–1438.
43. Man H.Y., Lin J.W., Ju W.H., Ahmadian G., Liu L., Becker L.E., Sheng M., Wang Y.T. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. // *Neuron.* 2000. Vol. 25, № 3, P. 649–662.
44. Lin J.W., Ju W., Foster K., Lee S.H., Ahmadian G., Wyszynski M., Wang Y.T., Sheng M. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. // *Nat. Neurosci.* 2000. Vol. 3, № 12, P. 1282–1290.
45. Wan Q., Xiong Z.G., Man H.Y., Ackerley C.A., Braunton J., Lu W.Y., Becker L.E., MacDonald J.F., Wang Y.T. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. // *Nature.* 1997. Vol. 388, P. 686–690.
46. Jin Z., Jin Y., Kumar-Mendu S., Degerman E., Groop L., Birnir B. Insulin reduces neuronal excitability by turning on GABA(A) channels that generate tonic current. // *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, P. e16188.
47. Kullmann S., Heni M., Hallschmid M., Fritsche A., Preissl H., Häring H.U. Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. // *Physiol. Rev.* 2016. Vol. 96, P. 1169–1209.
48. Ono H. Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, P. 1317.
49. Apelt J., Mehlhorn G., Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. // *J. Neurosci. Res.* 1999. Vol. 57, P. 693–705.
50. Komori T., Morikawa Y., Tamura S., Doi A., Nanjo K., Senba E. Subcellular localization of glucose transporter 4 in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob mice under basal conditions. // *Brain Res.* 2005. Vol. 1049, P. 34–42.

51. Grillo C.A., Piroli G.G., Hendry R.M., Reagan L.P. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. // *Brain Res.* 2009. Vol. 1296, P. 35–45.
52. McNay E.C., Ong C.T., McCrimmon R.J., Cresswell J., Bogan J.S., Sherwin R.S. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. // Learn. Mem.* 2010. Vol. 93, P. 546–553.
53. Pearson-Leary J., Jahagirdar V., Sage J., McNay E.C. Insulin modulates hippocampally mediated spatial working memory via glucose transporter-4. // *Behav. Brain Res.* 2018. Vol. 338, P. 32–39.
54. Pearson-Leary J., McNay E.C. Novel Roles for the Insulin-Regulated Glucose Transporter-4 in Hippocampally Dependent Memory. // *J. Neurosci.* 2016. Vol. 36, P. 11851–11864.
55. De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. [Электронный ресурс] / [Updated 2016 Apr 27]. In: *Endotext* [Internet]. – 2000. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>.
56. Mosthaf L., Grako K., Dull T.J., Coussens L., Ullrich A., McClain D.A. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. // *EMBO J.* 1990. Vol. 9, P. 2409–2413.
57. Yamaguchi Y., Flier J.S., Benecke H., Ransil B.J., Moller D.E. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. // *Endocrinology.* 1993. Vol. 132, P. 1132–1138.
58. Frasca F., Pandini G., Scalia P., Sciacca L., Mineo R., Costantino A., Goldfine I.D., Belfiore A., Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. // *Mol Cell Biol.* 1999. Vol. 19, P. 3278–3288.
59. Sciacca L., Cassarino M.F., Genua M., Pandini G., Le Moli R., Squatrito S., Vigneri R. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. // *Diabetologia.* 2010. Vol. 53, P. 1743–1753.

60. Benyoucef S., Surinya K.H., Hadaschik D., Siddle K. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. // *Biochem. J.* 2007. Vol. 403, P. 603–613.
61. Pierre-Eugene C., Pagesy P., Nguyen T.T., Neuillé M., Tschank G., Tennagels N., Hampe C., Issad T. Effect of insulin analogues on insulin/IGF1 hybrid receptors: increased activation by glargine but not by its metabolites M1 and M2. // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7, P. e41992.
62. Yamaguchi Y., Flier J.S., Yokota A., Benecke H., Backer J.M., Moller D.E. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. // *Endocrinology.* 1991. Vol. 129, P. 2058–2066.
63. Denley A., Bonython E.R., Booker G.W., Cosgrove L.J., Forbes B.E., Ward C.W., Wallace J.C. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. // *Mol. Endocrinol.* 2004. Vol. 18, P. 2502–2512.
64. Rajapaksha H., Forbes B.E. Ligand-Binding Affinity at the Insulin Receptor Isoform-A and Subsequent IR-A Tyrosine Phosphorylation Kinetics are Important Determinants of Mitogenic Biological Outcomes. // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015. Vol. 6, P. 107.
65. 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.
66. Unger J., McNeill T.H., Moxley R.T. 3rd., White M., Moss A., Livingston J.N. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. // *Neuroscience.* 1989. Vol. 31, P. 143–157.
67. Heni M., Hennige A.M., Peter A., Siegel-Axel D., Ordelheide A.M., Krebs N., Machicao F., Fritsche A., Häring H.U., Staiger H. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 6, P. e21594.

68. Moller D.E., Yokota A., Caro J.F., Flier J.S. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. // *Mol. Endocrinol.* 1989. Vol. 3, P. 1263–1269.
69. Terasawa H., Kohda D., Hatanaka H., Nagata K., Higashihashi N., Fujiwara H., Sakano K., Inagaki F. Solution structure of human insulin-like growth factor II; recognition sites for receptors and binding proteins. // *EMBO J.* 1994. Vol. 13, P. 5590–5597.
70. Alvino C.L., Ong S.C., McNeil K.A., Delaine C., Booker G.W., Wallace J.C., Forbes B.E. Understanding the mechanism of insulin and insulin-like growth factor (IGF) receptor activation by IGF-II. // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, P. e27488.
71. Chen D.Y., Stern S.A., Garcia-Osta A., Saunier-Rebori B., Pollonini G., Bambah-Mukku D., Blitzer R.D., Alberini C.M. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. // *Nature.* 2011. Vol. 469, № 7331, P. 491–497.
72. Beletskiy A., Chesnokova E., Bal N. Insulin-Like Growth Factor 2 As a Possible Neuroprotective Agent and Memory Enhancer-Its Comparative Expression, Processing and Signaling in Mammalian CNS. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, P. 1849.
73. Pardo M., Cheng Y., Sitbon Y.H., Lowell J.A., Grieco S.F., Worthen R.J., Desse S., Barreda-Diaz A. Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. // *Neurosci. Res.* 2019. Vol. 149, P. 1–13.
74. Alberini C.M. IGF2 in memory, neurodevelopmental disorders, and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* // 2023. Vol.46, № 6, P. 488–502.
75. Ziegler A. N., Schneider J. S., Qin M., Tyler W. A., Pintar J. E., Fraidenraich D., Wood T. L., Levison S. W. IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. // *Stem Cells.* 2012. Vol. 30, P. 1265–1276.
76. Ziegler A.N., Chidambaram S., Forbes B.E., Wood T.L., Levison S.W. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-II analogs with enhanced insulin receptor-binding affinity promote neural stem cell expansion. // *J. Biol. Chem.* 2014 Vol. 289, P. 4626–4633.

77. Zhang Z., Chopp M. Neural Stem Cells and Ischemic Brain. // *J. Stroke*. 2016. Vol. 18, № 3, P. 267–272.
78. Beilharz E.J., Bassett N.S., Sirimanne E.S., Williams C.E., Gluckman P.D. Insulin-like growth factor II is induced during wound repair following hypoxic-ischemic injury in the developing rat brain. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1995. Vol. 29, P. 81–91.
79. Vafae F., Zarifkar A., Emamghoreishi M., Namavar M.R., Shirzad S., Ghazavi H., Mahdavizadeh V. Insulin-Like Growth Factor 2 (IGF-2) Regulates Neuronal Density and IGF-2 Distribution Following Hippocampal Intracerebral Hemorrhage. // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2020. Vol. 29, № 10, P. 105128.
80. Hubbard S.R., Wei L., Ellis L., Hendrickson W.A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. // *Nature*. 1994. Vol. 372, P. 746–754.
81. Hubbard S.R. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. // *EMBO J.* 1997. Vol. 16, P. 5572–5581.
82. Wei L., Hubbard S.R., Hendrickson W.A., Ellis L. Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270, P. 8122–8130.
83. Byon J.C., Kusari A.B., Kusari J. Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction. // *Mol. Cell. Biochem.* 1998. Vol. 182, № 1-2, P. 101–108.
84. α S., Curchod M.L., Gobert R.P., Arkinstall S., Hooft van Huijsduijnen R. Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 13, P. 9792–9796.
85. Dadke S., Kusari A., Kusari J. Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. // *Mol. Cell. Biochem.* 2001. Vol. 221, № 1-2, P. 147–154.
86. Schmid E., El Benna J., Galter D., Klein G., Dröge W. Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin

responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. // *FASEB J.* 1998. Vol. 12, P. 863–870.

87. Schmid E., Hotz-Wagenblatt A., Hacj V., Dröge W. Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: The structural basis of redox priming. // *FASEB J.* 1999. Vol. 13, P. 1491–1500.

88. May J.M., de Haën C. Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254, P. 2214–2220.

89. Mukherjee S.P., Lane R.H., Lynn W.S. Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents. // *Biochem. Pharm.* 1978. Vol. 27, P. 2589–2594.

90. Mahadev K., Motoshima H., Wu X., Ruddy J.M., Arnold R.S., Cheng G., Lambeth J.D., Goldstein B.J. // The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24, P. 1844–1854.

91. 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.

92. 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.

93. Kreuzer J., Nürnberg B., Krieger-Brauer H.I. Ligand-dependent autophosphorylation of the insulin receptor is positively regulated by Gi-proteins. // *Biochem. J.* 2004. Vol. 380(Pt 3), P. 831–836.

94. Tao J., Malbon C.C., Wang H.Y. Galpha(i2) enhances insulin signaling via suppression of protein-tyrosine phosphatase 1B. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, P. 39705–39712.

95. Moxham C.M., Malbon C.C. Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G ialpha2. // *Nature.* 1996. Vol. 379, № 6568, P. 840–844.

96. Taniguchi C.M., Emanuelli B., Kahn C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 2, P. 85–96.

97. White M.F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. // *Mol. Cell. Biochem.* 1998. Vol. 182, № 1-2, P. 3–11.
98. Denley A., Carroll J.M., Brierley G.V., Cosgrove L., Wallace J., Forbes B., Roberts C.T. Jr. Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 27, № 10, P. 3569–3577.
99. Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R.S., Arvanitakis Z., Schneider J.A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. // *J. Clin. Invest.* 2012. Vol. 122, № 4, P. 1316–1338.
100. Sun X.J., Crimmins D.L., Myers M.G. Jr., Miralpeix M., White M.F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. // *Mol. Cell. Biol.* 1993. Vol. 13, № 12, P. 7418–7428.
101. Vanhaesebroeck B., Stephens L., Hawkins P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 13, P. 195–203.
102. Hay N., Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. // *Genes Dev.* 2004. Vol. 18, № 16, P. 1926–1945.
103. Huang X., Liu G., Guo J., Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. // *Int. J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 14, № 11, P. 1483–1496.
104. Zhao W., Chen H., Xu H., Moore E., Meiri N., Quon M.J., Alkon D.L. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 49, P. 34893–34902.
105. Yeh T.C., Ogawa W., Danielsen A.G., Roth R.A. Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271, P. 2921–2928.

106. Okamura-Oho Y., Miyashita T., Yamada M. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. Vol. 289, № 5, P. 957–960.
107. Thomas E.A., Foye P.E., Alvarez C.E., Usui H., Sutcliffe J.G. Insulin receptor substrate protein p53 localization in rats suggests mechanism for specific polyglutamine neurodegeneration. // *Neurosci. Lett.* 2001. Vol. 309, № 3, P. 145–148.
108. Burette A.C., Park H., Weinberg R.J. Postsynaptic distribution of IRSp53 in spiny excitatory and inhibitory neurons. // *J. Comp. Neurol.* 2014. Vol. 522, № 9, P. 2164–2178.
109. Kang J., Park H., Kim E. IRSp53/BAIAP2 in dendritic spine development, NMDA receptor regulation, and psychiatric disorders. // *Neuropharmacology.* 2016. Vol. 100, P. 27–39.
110. Feng Z., Lee S., Jia B., Jian T., Kim E., Zhang M. IRSp53 promotes postsynaptic density formation and actin filament bundling. // *J. Cell. Biol.* 2022, Vol. 221, № 8, P. e202105035.
111. Choi J., Ko J., Racz B., Burette A., Lee J.R., Kim S., Na M., Lee H.W., Kim K., Weinberg R.J., Kim E. Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25, P. 869–879.
112. Chiu S.L., Chen C.M., Cline H.T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. // *Neuron.* 2008. Vol. 58, № 5, P.708–719.
113. Chen W., Cai W., Hoover B., Kahn C.R. Insulin action in the brain: cell types, circuits, and diseases. // *Trends Neurosci.* 2022. Vol. 45, № 5, P. 384–400.
114. 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. С. 17-34.
115. Agrawal R., Reno C.M., Sharma S., Christensen C., Huang Y., Fisher S.J. Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2021. Vol. 321, № 1, P. E156–E163.

116. Scherer T., Sakamoto K., Buettner C. Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021. Vol. 17, № 8, P. 468–483.
117. Beddows C.A., Dodd G.T. Insulin on the brain: The role of central insulin signalling in energy and glucose homeostasis. // *J. Neuroendocrinol.* 2021. Vol. 33, № 4, P. e12947.
118. Himsworth H.P., Kerr R.B. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. // *Clin. Sci.* 1939. Vol. 4, P. 119–152.
119. Root H.F., Carpenter T.M. Studies of carbohydrate metabolism in cases of insulin resistance. // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 1940. Vol. 56, P. 1–11.
120. No authors listed. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association. // *Diabetes Care.* 1998. Vol. 21, № 2, P. 310–314.
121. Erichsen J.M., Fadel J.R., Reagan L.P. Peripheral versus central insulin and leptin resistance: Role in metabolic disorders, cognition, and neuropsychiatric diseases. // *Neuropharmacology.* 2022. Vol. 203, P. 108877.
122. Pomytkin I., Pinelis V. Brain Insulin Resistance: Focus on Insulin Receptor-Mitochondria Interactions. // *Life (Basel).* 2021. Vol. 11, № 3, P. 262.
123. Kellar D., Craft S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: Mechanisms and therapeutic approaches. // *Lancet Neurol.* 2020. Vol. 19, P. 758–766.
124. Athauda D., Foltynie T. Insulin resistance and Parkinson's disease: A new target for disease modification? // *Prog. Neurobiol.* 2016. Vol. 145–146, P. 98–120.
125. Choi D.W. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. // *Front. Neurosci.* 2020. Vol. 14, P. 579953.
126. Hamer J., Testani D., Mansur R., Lee Y., Subramaniapillai M., McIntyre R. Brain insulin resistance: A treatment target for cognitive impairment and anhedonia in depression. // *Exp. Neurol.* 2019. Vol. 315, P. 1–8.
127. Karelina K., Sarac B., Freeman L.M., Gaier K.R., Weil Z.M. Traumatic brain injury and obesity induce persistent central insulin resistance. // *Eur. J. Neurosci.* 2016. Vol. 43, P. 1034–1043.

128. Zhao W.Q., Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1792, № 5, P. 482–496.
129. Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 1998. Vol. 105, № 4-5, P. 415–422.
130. Steen E., Terry B.M., Rivera E.J., Cannon J.L., Neely T.R., Tavares R., Xu X.J., Wands J.R., de la Monte S.M. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? // *J. Alzheimers. Dis.* 2005. Vol. 7, № 1, P. 63–80.
131. Rivera E.J., Goldin A., Fulmer N., Tavares R., Wands J.R., de la Monte S.M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. // *J. Alzheimers. Dis.* 2005. Vol. 8, № 3, P. 247–268.
132. Zhou J., Jones D.R., Duong D.M., Levey A.I., Lah J.J., Peng J. Proteomic analysis of postsynaptic density in Alzheimer's disease. // *Clin. Chim. Acta*. 2013. Vol. 420, P. 62–68.
133. Zhao W.Q., De Felice F.G., Fernandez S., Chen H., Lambert M.P., Quon M.J., Krafft G.A., Klein W.L. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. // *FASEB J.* 2008. Vol. 22, № 1, P. 246–60.
134. Bassil F., Delamarre A., Cannon M.H., Dutheil N., Vital A., Négrier-Leibreich M.L., Bezard E., Fernagut P.O., Meissner W.G. Impaired brain insulin signalling in Parkinson's disease. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2022. Vol. 48, № 1, P. e12760.
135. Nowell J., Blunt E., Edison P. Incretin and insulin signaling as novel therapeutic targets for Alzheimer's and Parkinson's disease. // *Mol. Psychiatry*. 2023. Vol. 28, № 1, P. 217–229.
136. Weil Z.M., Karelina K., Whitehead B., Velazquez-Cruz R., Oliverio R., Pinti M., Nwafor D.C., Nicholson S., Fitzgerald J.A., Hollander J., Brown C.M., Zhang N.,

- DeVries A.C. Mild traumatic brain injury increases vulnerability to cerebral ischemia in mice. // *Exp. Neurol.* 2021. Vol. 342, P. 113765.
137. Franklin W., Krishnan B., Taglialatela G. Chronic synaptic insulin resistance after traumatic brain injury abolishes insulin protection from amyloid beta and tau oligomer-induced synaptic dysfunction. // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1, P. 8228.
138. Sekar S., Viswas R.S., Miranzadeh Mahabadi H., Alizadeh E., Fonge H., Taghibiglou C. Concussion/Mild Traumatic Brain Injury (TBI) Induces Brain Insulin Resistance: A Positron Emission Tomography (PET) Scanning Study. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 16, P. 9005.
139. Korkmaz N., Kesikburun S., Atar M.Ö., Sabuncu T. Insulin resistance and related factors in patients with moderate and severe traumatic brain injury. // *Ir. J. Med. Sci.* 2023. Vol. 192, № 3, P. 1177–1182.
140. Cao C., Wang H., Gao H., Wu W. Insulin resistance is associated with an unfavorable outcome among non-diabetic patients with isolated moderate-to-severe traumatic brain injury - A propensity score-matched study. // *Front. Neurol.* 2022. Vol. 13, P. 949091.
141. GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. // *Lancet Neurol.* 2021. Vol. 20, № 10, P. 795–820.
142. Неврология: национальное руководство / Под ред. Е.И. Гусева, А.Н. Коновалова, В.И. Скворцовой. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2018. – 880 С.
143. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. - М.: Медицина, 2001. – 328 С.
144. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Соколов М.А., Коваленко А.В. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной церебральной ишемии. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 1999. Т. 99. № 2. С. 65–70.
145. Lassen NA. Normal average value of cerebral blood flow in younger adults is 50 ml/100 g/min. // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1985. Vol. 5, № 3, P. 347–349.
146. Markus HS. Cerebral perfusion and stroke. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2004. Vol. 75, № 3, P. 353–361.

147. Scheefhals N., MacGillavry H.D. Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. // *Mol. Cell Neurosci.* 2018. Vol. 91, P. 82–94.
148. Clements J.D., Lester R.A., Tong G., Jahr C.E., Westbrook G.L. The time course of glutamate in the synaptic cleft. // *Science.* 1992. Vol. 258, № 5087, P. 1498–1501.
149. Dzubay J.A., Jahr C.E. The concentration of synaptically released glutamate outside of the climbing fiber-Purkinje cell synaptic cleft. // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, P. 5265–5274.
150. Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. // *Keio J. Med.* 1954. Vol. 3, P. 183–192.
151. Lucas D.R., Newhouse J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. // *AMA Arch. Ophthalmol.* 1957. Vol. 58, P. 193–201.
152. Rothman S.M., Olney J.W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. // *Ann Neurol.* 1986. Vol.19, № 2, P. 105–111.
153. Dávalos A, Castillo J, Serena J, Noya M. Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. // *Stroke.* 1997. Vol. 28, № 4, P. 708–710.
154. Skvortsova V.I., Raevskii K.S., Kovalenko A.V., Kudrin V.S., Malikova L.A., Sokolov M.A., Alekseev A.A., Gusev E.I. Levels of neurotransmitter amino acids in the cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic insult. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2000. Vol. 30, № 5, P. 491–495.
155. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Глутаматная нейротрансмиссия и метаболизм кальция в норме и при ишемии головного мозга. // *Успехи физиологических наук.* 2002. Т.4, С. 80–93.
156. Castillo J., Dávalos A., Naveiro J., Noya M. Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. // *Stroke.* 1996. Vol. 27, № 6, P. 1060–1065.
157. Castillo J., Dávalos A., Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. // *Lancet.* 1997. Vol. 349, № 9045, P. 79–83.

158. Bullock R., Zauner A., Woodward J., Young H.F. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. // *Stroke*. 1995. Vol. 26, № 11, P. 2187–2189.
159. Harris J.J., Jolivet R., Attwell D. Synaptic Energy Use and Supply. // *Neuron*. 2012. Vol. 75, P. 762–777.
160. Erecińska M., Silver I.A. Ions and energy in mammalian brain. // *Prog. Neurobiol.* 1994. Vol. 43, № 1, P. 37–71.
161. Kaplan J.H. Biochemistry of Na, K-ATPase. // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. Vol. 71, P. 511–535.
162. Clapham D.E. Calcium signaling. // *Cell*. 2007. Vol. 131, № 6, P. 1047–1058.
163. Cotter K., Stransky L., McGuire C., Forgac M. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. // *Trends Biochem. Sci.* 2015. Vol. 40, P. 611–622.
164. Wang F., Xie X., Xing X., Sun X. Excitatory Synaptic Transmission in Ischemic Stroke: A New Outlet for Classical Neuroprotective Strategies. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 16, P. 9381.
165. Lee S.Y., Kim J.H. Mechanisms underlying presynaptic Ca²⁺ transient and vesicular glutamate release at a CNS nerve terminal during in vitro ischaemia. // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593, P. 2793–2806.
166. Fern R. Intracellular calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes in situ. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18, P. 7232–7243.
167. Osuga H., Hakim A.M. Relationship between extracellular glutamate concentration and voltage-sensitive calcium channel function in focal cerebral ischemia in the rat. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996. Vol. 16, P. 629–636.
168. Mahmoud S., Gharagozloo M., Simard C., Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. // *Cells*. 2019. Vol. 8, № 2, P. 184.
169. Nicholls D.G., Budd S.L. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1366, № 1–2, P. 97–112.

170. Nicholls D.G. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. // *Curr. Mol. Med.* 2004. Vol. 4, № 2, P. 149–177.
171. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004. Vol. 86, № 2, P. 279–351.
172. Zhou Q., Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases. // *Neuropharmacology.* 2013. Vol. 74, P. 69–75.
173. Lai T.W., Zhang S., Wang Y.T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. // *Prog. Neurobiol.* 2014. Vol. 115, P. 157–188.
174. Nicholls D.G., Budd S.L. Mitochondria and neuronal survival. // *Physiol. Rev.* 2000. Vol. 80, № 1, P. 315–360.
175. Tymianski M., Charlton M.P., Carlen P.L., Tator C.H. Secondary Ca^{2+} overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. // *Brain Res.* 1993. Vol. 607, № 1–2, P. 319–323.
176. Kiedrowski L., Costa E. Glutamate-induced destabilization of intracellular calcium concentration homeostasis in cultured cerebellar granule cells: role of mitochondria in calcium buffering. // *Mol. Pharmacol.* 1995. Vol. 47, № 1, P. 140–147.
177. Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., Brustovetsky N. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. // *Neurobiol Dis.* 2012. Vol. 46, № 1, P. 109–117.
178. Gerencser A.A., Mark K.A., Hubbard A.E., Divakaruni A.S., Mehrabian Z., Nicholls D.G., Polster B.M. Real-time visualization of cytoplasmic calpain activation and calcium deregulation in acute glutamate excitotoxicity. // *J. Neurochem.* 2009. Vol. 110, № 3, P. 990–1004.
179. Brustovetsky T., Bolshakov A., Brustovetsky N. Calpain activation and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger degradation occur downstream of calcium deregulation in hippocampal neurons exposed to excitotoxic glutamate. // *J. Neurosci. Res.* 2010. Vol. 88, № 6, P. 1317–1328.

180. Wang Y., Qin Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. // *Apoptosis*. 2010. Vol. 15, № 11, P. 1382–1402.
181. Duan Y., Gross R.A., Sheu S.S. Ca^{2+} -Dependent Generation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Serves as a Signal for Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Activation during Glutamate Excitotoxicity. // *J. Physiol*. 2007. Vol. 585, P. 741–758.
182. Lafon-Cazal M., Pietri S., Culcasi M., Bockaert J. NMDA-Dependent Superoxide Production and Neurotoxicity. // *Nature*. 1993. Vol. 364, P. 535–537.
183. Lafon-Cazal M., Culcasi M., Gaven F., Pietri S., Bockaert J. Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite: Putative Mediators of NMDA-Induced Cell Death in Cerebellar Granule Cells. // *Neuropharmacology*. 1993. Vol. 32, P. 1259–1266.
184. Reynolds I.J., Hastings T.G. Glutamate Induces the Production of Reactive Oxygen Species in Cultured Forebrain Neurons Following NMDA Receptor Activation. // *J. Neurosci*. 1995. Vol. 15, P. 3318–3327.
185. Dugan L.L., Sensi S.L., Canzoniero L.M.T., Handran S.D., Rothman S.M., Lin T.S., Goldberg M.P., Choi D.W. Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Cortical Neurons Following Exposure to N-Methyl-D-Aspartate. // *J. Neurosci*. 1995. Vol. 15, P. 6377–6388.
186. Urushitani M., Tomoki, Nakamizo, Inoue R., Sawada H., Kihara T., Honda K., Akaike A., Shimohama S. N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Mitochondrial Ca^{2+} Overload in Acute Excitotoxic Motor Neuron Death: A Mechanism Distinct from Chronic Neurotoxicity after Ca^{2+} Influx. // *J. Neurosci. Res*. 2001. Vol. 63, P. 377–387.
187. Prehn J.H.M. NMDA-Induced Superoxide Production and Neurotoxicity in Cultured Rat Hippocampal Neurons: Role of Mitochondria. // *Eur. J. Neurosci*. 1998. Vol. 10, P. 1903–1910.
188. Nguyen D., Alavi M.V., Kim K.Y., Kang T., Scott R.T., Noh Y.H., Lindsey J.D., Wissinger B., Ellisman M.H., Weinreb R.N., et al. A New Vicious Cycle Involving Glutamate Excitotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dynamics. // *Cell Death. Dis*. 2011. Vol. 2, P. e240.

189. Sang W.S., Gum E.T., Hamby A.M., Chan P.H., Swanson R.A. Hypoglycemic Neuronal Death Is Triggered by Glucose Reperfusion and Activation of Neuronal NADPH Oxidase. // *J. Clin. Investig.* 2007. Vol. 117, P. 910–918.
190. Girouard H., Wang G., Gallo E.F., Anrather J., Zhou P., Pickel V.M., Iadecola C. NMDA Receptor Activation Increases Free Radical Production through Nitric Oxide and NOX2. // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29, P. 2545–2552.
191. Brennan A.M., Won Suh S., Joon Won S., Narasimhan P., Kauppinen T.M., Lee H., Edling Y., Chan P.H., Swanson R.A. NADPH Oxidase Is the Primary Source of Superoxide Induced by NMDA Receptor Activation. // *Nat. Neurosci.* 2009. Vol. 12, P. 857–863.
192. Brennan-Minnella A.M., Shen Y., Swanson R.A. Phosphoinositide 3-Kinase Couples NMDA Receptors to Superoxide Release in Excitotoxic Neuronal Death. // *Cell Death Dis.* 2013. Vol. 4, P. e580.
193. Minnella A.M., Zhao J.X., Jiang X., Jakobsen E., Lu F., Wu L., El-Benna J., Gray J.A., Swanson R.A. Excitotoxic Superoxide Production and Neuronal Death Require Both Ionotropic and Non-Ionotropic NMDA Receptor Signaling. // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, P. 17522.
194. Li Q.Y., Pedersen C., Day B.J., Patel M. Dependence of Excitotoxic Neurodegeneration on Mitochondrial Aconitase Inactivation. // *J. Neurochem.* 2001. Vol. 78, P. 746–755.
195. Taylor R.A., Sansing L.H.. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. // *Clin. Dev. Immunol.* 2013. Vol. 2013, P. 746068.
196. Shen Z., Xiang M., Chen C., Ding F., Wang Y., Shang C., Xin L., Zhang Y., Cui X. Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke. // *Biomed. Pharmacother.* 2022. Vol. 151, P. 113125.
197. Albers G.W., Atkinson R.P., Kelley R.E., Rosenbaum D.M. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the N-methyl-d-aspartate antagonist dextrorphan in patients with acute stroke. // *Stroke.* 1995. Vol. 26, P. 254–258.

198. Dyker A.G., Lees K.R. Remacemide hydrochloride: a double-blind, placebo-controlled, safety and tolerability study in patients with acute ischemic stroke. // *Stroke*. 1999. Vol. 30, P. 1796–1801.
199. Davis S.M., Lees K.R., Albers G.W., Diener H.C., Markabi S., Karlsson G., Norris J. Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. // *Stroke*. 2000. Vol. 31, P. 347–354.
200. Albers G.W., Goldstein L.B., Hall D., Lesko L.M. Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. // *JAMA*. 2001. Vol. 286, P. 2673–2682.
201. Lees K.R., Dyker A.G., Sharma A., Ford G.A., Ardron M.E., Grosset D.G. Tolerability of the low-affinity, use-dependent NMDA antagonist AR-R15896AR in stroke patients: a dose-ranging study. // *Stroke*. 2001. Vol. 32, P. 466–472.
202. Haley E.C. Jr., Thompson J.L., Levin B., Davis S., Lees K.R., Pittman J.G., DeRosa J.T., Ordronneau P., Brown D.L., Sacco R.L.; GAIN Americas and GAIN International Investigators. Gavestinel does not improve outcome after acute intracerebral hemorrhage: an analysis from the GAIN International and GAIN Americas studies. // *Stroke*. 2005. Vol. 36, № 5, P.1006–1010.
203. Скворцова В.И., Шамалов Н.А. Тромболитическая терапия при ишемическом инсульте. // *Consilium Medicum*. 2010. Т. 12. № 9. С. 29–34.
204. Qin C., Yang S., Chu Y.H., Zhang H., Pang X.W., Chen L., Zhou L.Q., Chen M., Tian D.S., Wang W. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. // *Signal Transduct. Target Ther*. 2022. Vol. 7, № 1, P. 215.
205. Gadani S.P., Walsh J.T., Lukens J.R., Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. // *Neuron*. 2015. Vol. 87, № 1, P. 47–62.
206. Kim S.W., Lee J.K. Role of HMGB1 in the Interplay between NETosis and Thrombosis in Ischemic Stroke: A Review. // *Cells*. 2020. Vol. 9, № 8, P. 1794.
207. Schulze J., Zierath D., Tanzi P., Cain K., Shibata D., Dressel A., Becker K. Severe stroke induces long-lasting alterations of high-mobility group box 1. // *Stroke*. 2013. Vol. 44, № 1, P. 246–248.

208. Le K., Mo S., Lu X., Idriss Ali A., Yu D., Guo Y. Association of circulating blood HMGB1 levels with ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. // *Neurol. Res.* 2018. Vol. 40, № 11, P. 907–916.
209. Cramer S.C., Sur M., Dobkin B.H., O'Brien C., Sanger T.D., Trojanowski J.Q., Rumsey J.M., Hicks R., Cameron J., Chen D., Chen W.G., Cohen L.G., deCharms C., Duffy C.J., Eden G.F., Fetz E.E., Filart R., Freund M., Grant S.J., Haber S., Kalivas P.W., Kolb B., Kramer A.F., Lynch M., Mayberg H.S., McQuillen P.S., Nitkin R., Pascual-Leone A., Reuter-Lorenz P., Schiff N., Sharma A., Shekim L., Stryker M., Sullivan E.V., Vinogradov S. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. // *Brain.* 2011. Vol. 134, Pt 6, P. 1591–1609.
210. Cirillo C., Brihmat N., Castel-Lacanal E., Le Friec A., Barbieux-Guillot M., Raposo N., Pariente J., Viguier A., Simonetta-Moreau M., Albucher J.F., Olivot J.M., Desmoulin F., Marque P., Chollet F., Loubinoux I. Post-stroke remodeling processes in animal models and humans. // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2020. Vol. 40, № 1, P. 3–22.
211. Corbett D., Carmichael S.T., Murphy T.H., Jones T.A., Schwab M.E., Jolkkonen J., Clarkson A.N., Dancause N., Wieloch T., Johansen-Berg H., Nilsson M., McCullough L.D., Joy M.T. Enhancing the alignment of the preclinical and clinical stroke recovery research pipeline: Consensus-based core recommendations from the Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable translational working group. // *Int. J. Stroke.* 2017. Vol. 12, № 5, P. 462–471.
212. Bernhardt J., Hayward K.S., Kwakkel G., Ward N.S., Wolf S.L., Borschmann K., Krakauer J.W., Boyd L.A., Carmichael S.T., Corbett D., Cramer S.C. Agreed Definitions and a Shared Vision for New Standards in Stroke Recovery Research: The Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable Taskforce. // *Neurorehabil. Neural. Repair.* 2017. Vol. 31, № 9, P. 793–799.
213. Li S., Overman J.J., Katsman D., Kozlov S.V., Donnelly C.J., Twiss J.L., Giger R.J., Coppola G., Geschwind D.H., Carmichael S.T. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. // *Nat. Neurosci.* 2010. Vol. 13, № 12, P. 1496–1504.

214. Li S., Nie E.H., Yin Y., Benowitz L.I., Tung S., Vinters H.V., Bahjat F.R., Stenzel-Poore M.P., Kawaguchi R., Coppola G., Carmichael S.T. GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke. // *Nat. Neurosci.* 2015. Vol. 18, № 12, P. 1737–1745.
215. Overman J.J., Clarkson A.N., Wanner I.B., Overman W.T., Eckstein I., Maguire J.L., Dinov I.D., Toga A.W., Carmichael S.T. A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109, № 33, P. E2230–2239.
216. Luke L.M., Allred R.P., Jones T.A. Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage induces contralesional synaptogenesis and enhances skilled reaching with the ipsilateral forelimb in adult male rats. // *Synapse.* 2004. Vol. 54, № 4, P. 187–199.
217. Mostany R., Chowdhury T.G., Johnston D.G., Portonovo S.A., Carmichael S.T., Portera-Cailliau C. Local hemodynamics dictate long-term dendritic plasticity in peri-infarct cortex. // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 42, P. 14116–14126.
218. Brown C.E., Li P., Boyd J.D., Delaney K.R., Murphy T.H. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27, P. 4101–4109.
219. Brown C.E., Wong C., Murphy T.H. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. // *Stroke.* 2008. Vol. 39, № 4, P. 1286–1291.
220. Biernaskie J., Chernenko G., Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24, № 5, P. 1245–1254.
221. Birkenmeier R.L., Prager E.M., Lang C.E. Translating animal doses of task-specific training to people with chronic stroke in 1-hour therapy sessions: a proof-of-concept study. // *Neurorehabil. Neural Repair.* 2010. Vol. 24, № 7, P. 620–635.
222. Duncan P.W., Goldstein L.B., Matchar D., Divine G.W., Feussner J. Measurement of motor recovery after stroke. Outcome assessment and sample size requirements. // *Stroke.* 1992. Vol. 23, № 8, P. 1084–1089.

223. Dromerick A.W., Geed S., Barth J., Brady K., Giannetti M.L., Mitchell A., Edwardson M.A., Tan M.T., Zhou Y., Newport E.L., Edwards D.F. Critical Period After Stroke Study (CPASS): A phase II clinical trial testing an optimal time for motor recovery after stroke in humans. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2021. Vol. 118, № 39, P. e2026676118.
224. Demeurisse G., Demol O., Derouck M., de Beuckelaer R., Coekaerts M.J., Capon A. Quantitative study of the rate of recovery from aphasia due to ischemic stroke. // *Stroke*. 1980. Vol. 11, № 5, P. 455–458.
225. Prabhakaran S., Zarahn E., Riley C., Speizer A., Chong J.Y., Lazar R.M., Marshall R.S., Krakauer J.W. Inter-individual variability in the capacity for motor recovery after ischemic stroke. // *Neurorehabil. Neural Repair*. 2008. Vol. 22, № 1, P. 64–71.
226. Lazar R.M., Minzer B., Antonello D., Festa J.R., Krakauer J.W., Marshall R.S. Improvement in aphasia scores after stroke is well predicted by initial severity. // *Stroke*. 2010. Vol. 41, № 7, P. 1485–1488.
227. Skvortsova V.I., Kovrazhkina E.A.. Recent advances in rehabilitation of stroke survivors. // *F1000 Med. Rep.* 2009. Vol. 1, P. 23.
228. Ward N.S., Brander F., Kelly K. Intensive upper limb neurorehabilitation in chronic stroke: outcomes from the Queen Square programme. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2019. Vol. 90, № 5, P. 498–506.
229. McCabe J., Monkiewicz M., Holcomb J., Pundik S., Daly J.J. Comparison of robotics, functional electrical stimulation, and motor learning methods for treatment of persistent upper extremity dysfunction after stroke: a randomized controlled trial. // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2015. Vol. 96, № 6, P. 981–990.
230. Joy M.T., Carmichael S.T. Encouraging an excitable brain state: mechanisms of brain repair in stroke. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2021. Vol. 22, № 1, P. 38–53.
231. Yaeger C.E., Ringach D.L., Trachtenberg J.T. Neuromodulatory control of localized dendritic spiking in critical period cortex. // *Nature*. 2019. Vol. 567, № 7746, P. 100–104.

232. Conner J.M., Chiba A.A., Tuszynski M.H. The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury. // *Neuron*. 2005. Vol. 46, № 2, P. 173–179.
233. McGee A.W., Yang Y., Fischer Q.S., Daw N.W., Strittmatter S.M. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. // *Science*. 2005. Vol. 309, № 5744, P. 2222–2226.
234. Sozmen E.G., Rosenzweig S., Llorente I.L., DiTullio D.J., Machnicki M., Vinters H.V., Havton L.A., Giger R.J., Hinman J.D., Carmichael S.T. Nogo receptor blockade overcomes remyelination failure after white matter stroke and stimulates functional recovery in aged mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. Vol. 113, № 52, P. E8453–E8462.
235. Begum M.R., Sng J.C.G. Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. // *J. Neurochem*. 2017. Vol. 142, № 5, P. 649–661.
236. Clarkson A.N., Huang B.S., Macisaac S.E., Mody I., Carmichael S.T. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. // *Nature*. 2010. Vol. 468, № 7321, P. 305–309.
237. Orfila J.E., Grewal H., Dietz R.M., Strnad F., Shimizu T., Moreno M., Schroeder C., Yonchek J., Rodgers K.M., Dingman A., Bernard T.J., Quillinan N., Macklin W.B., Traystman R.J., Herson P.S. Delayed inhibition of tonic inhibition enhances functional recovery following experimental ischemic stroke. // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2019. Vol. 39, № 6, P. 1005–1014.
238. Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие. // *Молекулярная биология*. 2016. Т. 50. № 5. С. 775–784.
239. Cline B.H., Steinbusch H.W., Malin D., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Cespuglio R., Strekalova T. The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-

induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. // BMC Neurosci. 2012. Vol. 13, P. 110.

240. Dhawan J., Benveniste H., Nawrocky M., Smith S.D., Biegon A. Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors. // Neuroimage. 2010. Vol. 51, P. 599–605.

241. Friedman L.K., Belayev L., Alfonso O.F., Ginsberg M.D. Distribution of glutamate and preproenkephalin messenger RNAs following transient focal cerebral ischemia. // Neuroscience. 2000. Vol. 95, № 3, P. 841–857.

242. Ogawa N., Haba K., Mizukawa K., Asanuma M., Hirata H., Mori A. Loss of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor binding in rat hippocampal areas at the chronic stage after transient forebrain ischemia: histological and NMDA receptor binding studies. // Neurochem. Res. 1991. Vol. 16, № 5, P. 519–524.

243. Dhawan J., Benveniste H., Luo Z., Nawrocky M., Smith S.D., Biegon A. A new look at glutamate and ischemia: NMDA agonist improves long-term functional outcome in a rat model of stroke. // Future Neurol. 2011. Vol. 6, № 6, P. 823–834.

244. Morris R.G., Anderson E., Lynch G.S., Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist, AP5. // Nature. 1986. Vol. 319, P. 774–776.

245. Kossel A.H., Williams C.V., Schweizer M., Kater S.B. Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. // J. Neurosci. 1997. Vol. 17, P. 6314–6324.

246. Albenisi B.C. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. // Curr. Pharm. Des. 2007. Vol. 13, № 31, P. 3185–3194.

247. Ting W.K., Fadul F.A., Fecteau S., Ethier C. Neurostimulation for Stroke Rehabilitation. // Front. Neurosci. 2021. Vol. 15, P. 649459.

248. Скворцова В.И., Шкловский В.М., Поляев Б.А., Иванова Г.Е., Чекнева Н.С., Гудкова В.В., Петрова Е.А., Волченкова О.В., Шанина Т.В., Борисова Н.В. Основы ранней реабилитации больных с острыми нарушениями мозгового

- кровообращения. Методические рекомендации. ЛФК и массаж. // Лечебная физическая культура и массаж. 2006. Т. 356 № 11, С. 3–13.
249. Szelenberger R., Kostka J., Saluk-Bijak J., Miller E. Pharmacological Interventions and Rehabilitation Approach for Enhancing Brain Self-repair and Stroke Recovery. // *Curr. Neuropharmacol.* 2020. Vol. 18, № 1, P. 51–64.
250. Kernan W.N., Inzucchi S.E., Viscoli C.M., Brass L.M., Bravata D.M., Horwitz R.I. Insulin resistance and risk for stroke. // *Neurology.* 2002. Vol. 59, № 6, P. 809–815.
251. Rundek T., Gardener H., Xu Q., Goldberg R.B., Wright C.B., Boden-Albala B., Disla N., Paik M.C., Elkind M.S., Sacco R.L. Insulin resistance and risk of ischemic stroke among nondiabetic individuals from the northern Manhattan study. // *Arch. Neurol.* 2010. Vol. 67, № 10, P. 1195–1200.
252. Lawlor D.A., Fraser A., Ebrahim S., Smith G.D. Independent associations of fasting insulin, glucose, and glycated haemoglobin with stroke and coronary heart disease in older women. // *PLoS Med.* 2007. Vol. 4, № 8, P. e263.
253. Wieberdink R.G., Koudstaal P.J., Hofman A., Witteman J.C., Breteler M.M., Ikram M.A. Insulin resistance and the risk of stroke and stroke subtypes in the nondiabetic elderly. // *Am. J. Epidemiol.* 2012. Vol. 176, № 8, P. 699–707.
254. Gu T., Yang Q., Ying G., Jin B. Lack of association between insulin resistance as estimated by homeostasis model assessment and stroke risk: A systematic review and meta-analysis. // *Med. Hypotheses.* 2020. Vol. 141, P. 109700.
255. Calleja A.I., Garcia-Bermejo P., Cortijo E., Bustamante R., Rojo Martinez E., Gonzalez Sarmiento E., Fernandez-Herranz R., Arenillas J.F. Insulin resistance is associated with a poor response to intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke. // *Diabetes Care.* 2011. Vol. 34, № 11, P. 2413–2417.
256. Bas D.F., Ozdemir A.O., Colak E., Kebapci N. Higher insulin resistance level is associated with worse clinical response in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis. // *Transl. Stroke Res.* 2016. Vol. 7, № 3, P. 167–171.

257. Ding P.F., Zhang H.S., Wang J., Gao Y.Y., Mao J.N., Hang C.H., Li W. Insulin resistance in ischemic stroke: Mechanisms and therapeutic approaches. // *Front. Endocrinol (Lausanne)*. 2022. Vol. 13, P. 1092431.
258. Chiu S.L., Cline H.T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. // *Neural Dev*. 2010. Vol. 5, P. 7.
259. Recio-Pinto E., Rechler M.M., Ishii D.N. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. // *J. Neurosci*. 1986. Vol. 6, № 5, P. 1211–1219.
260. Lázár B.A., Jancsó G., Pálvölgyi L., Dobos I., Nagy I., Sántha P. Insulin Confers Differing Effects on Neurite Outgrowth in Separate Populations of Cultured Dorsal Root Ganglion Neurons: The Role of the Insulin Receptor. // *Front. Neurosci*. 2018. Vol. 12, P. 732.
261. Fernyhough P., Willars G.B., Lindsay R.M., Tomlinson D.R. Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurones. // *Brain Res*. 1993. Vol. 607, P. 117–124.
262. Nedelcovych M.T., Gadiano A.J., Wu Y., Manning A.A., Thomas A.G., Khuder S.S., Yoo S.W., Xu J., McArthur J.C., Haughey N.J., Volsky D.J., Rais R., Slusher B.S. Pharmacokinetics of Intranasal versus Subcutaneous Insulin in the Mouse. // *ACS Chem. Neurosci*. 2018. Vol. 9, № 4, P. 809–816.
263. Benedict C., Hallschmid M., Schultes B., Born J., Kern W. Intranasal insulin to improve memory function in humans. // *Neuroendocrinology*. 2007. Vol. 86, № 2, P. 136–142.
264. Copps K.D., White M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. // *Diabetologia*. 2012. Vol. 55, № 10, P. 2565–2582.
265. Datusalia A.K., Agarwal P., Singh J.N., Sharma S.S. Hyper-insulinemia increases the glutamate-excitotoxicity in cortical neurons: A mechanistic study. // *Eur. J. Pharmacol*. 2018. Vol. 833, P. 524–530.

266. Lioutas V.A., Novak V. Intranasal insulin neuroprotection in ischemic stroke. // *Neural Regen. Res.* 2016. Vol. 11, № 3, P. 400–401.
267. Rizk N.N., Rafols J.A., Dunbar J.C. Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. // *Brain Res.* 2006. Vol. 1096, № 1, P. 204–212.
268. Warner D.S., Gionet T.X., Todd M.M., McAllister A.M. Insulin-induced normoglycemia improves ischemic outcome in hyperglycemic rats. // *Stroke.* 1992. Vol. 23, № 12, P. 1775–1780.
269. LeMay D.R., Gehua L., Zelenock G.B., D'Alecy L.G. Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. // *Stroke.* 1988. Vol. 19, № 11, P. 1411–1419.
270. Huang S.S., Lu Y.J., Huang J.P., Wu Y.T., Day Y.J., Hung L.M. The essential role of endothelial nitric oxide synthase activation in insulin-mediated neuroprotection against ischemic stroke in diabetes. // *J. Vasc. Surg.* 2014. Vol. 59, № 2, P. 483–491.
271. Russo V., Candeloro P., Malara N., Perozziello G., Iannone M., Scicchitano M., Mollace R., Musolino V., Gliozzi M., Carresi C., Morittu V.M., Gratteri S., Palma E., Muscoli C., Di Fabrizio E., Mollace V. Key Role of Cytochrome C for Apoptosis Detection Using Raman Microimaging in an Animal Model of Brain Ischemia with Insulin Treatment. // *Appl. Spectrosc.* 2019. Vol. 73, № 10, P. 1208–1217.
272. Voll C.L., Auer R.N. Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1991. Vol. 11, № 6, P. 1006–1014.
273. Zorina I.I., Zakharova I.O., Bayunova L.V., Avrova N.F., Insulin administration prevents accumulation of conjugated dienes and trienes and inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat cerebral cortex during two-vessel forebrain ischemia and reperfusion. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2018. Vol. 54, № 3, P. 246–249.
274. Zorina I.I., Galkina O.V., Bayunova L.V., and Zakharova I.O., Effect of insulin on lipid peroxidation and glutathione levels in a two-vessel occlusion model of rat forebrain ischemia followed by reperfusion. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2019. Vol. 55, № 4, P. 333–335.

275. Zakharova I.O., Bayunova L.V., Zorina I.I., Sokolova T.V., Shpakov A.O., Avrova N.F. Insulin and α -Tocopherol Enhance the Protective Effect of Each Other on Brain Cortical Neurons under Oxidative Stress Conditions and in Rat Two-Vessel Forebrain Ischemia/Reperfusion Injury. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 21, P. 11768.
276. Liao W., Xu J., Li B., Ruan Y., Li T., Liu J. Deciphering the Roles of Metformin in Alzheimer's Disease: A Snapshot. // *Front. Pharmacol.* 2022. Vol. 12, P. 728315.
277. Gupta A., Bisht B., Dey C.S. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. // *Neuropharmacology*. 2011. Vol. 60, № 6, P. 910–920.
278. Graham G.G., Punt J., Arora M., Day R.O., Doogue M.P., Duong J.K., Furlong T.J., Greenfield J.R., Greenup L.C., Kirkpatrick C.M., Ray J.E., Timmins P., Williams K.M. Clinical pharmacokinetics of metformin. // *Clin. Pharmacokinet.* 2011. Vol. 50, P. 81–98.
279. Zhao M., Li X.W., Chen Z., Hao F., Tao S.X., Yu H.Y., Cheng R., Liu H. Neuro-Protective Role of Metformin in Patients with Acute Stroke and Type 2 Diabetes Mellitus via AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Pathway and Oxidative Stress. // *Med. Sci. Monit.* 2019. Vol. 25, P. 2186–2194.
280. Fu W., Tang Y., Che X., Tan J., Ma Y., He Z. Neuropharmacological efficacy of metformin for stroke in rodents: A meta-analysis of preclinical trials. // *Front. Pharmacol.* 2022. Vol. 13, P. 1009169.
281. Jia J., Cheng J., Ni J., Zhen X. Neuropharmacological actions of metformin in stroke. // *Curr. Neuropharmacol.* 2015. Vol. 13, P. 389–394.
282. Li J., Benashski S.E., Venna V.R., McCullough L.D. Effects of metformin in experimental stroke. // *Stroke*. 2010. Vol.41, P. 2645–2652.
283. Westphal L.P., Widmer R., Held U., Steigmiller K., Hametner C., Ringleb P., Curtze S., Martinez-Majander N., Tiainen M., Nolte C.H., Scheitz J.F., Erdur H., Polymeris A.A., Traenka C., Eskandari A., Michel P., Heldner M.R., Arnold M., Zini A., Vandelli L., Coutinho J.M., Groot A.E., Padjen V., Jovanovic D.R., Bejot Y., Brenière C., Turc G., Seners P., Pezzini A., Magoni M., Leys D., Gilliot S., Scherrer M.J., Kägi G., Luft A.R., Gensicke H., Nederkoorn P., Tatlisumak T., Engelter S.T., Wegener S.; Thrombolysis in

- Ischemic Stroke Patients (TRISP) Study Group. Association of prestroke metformin use, stroke severity, and thrombolysis outcome. // *Neurology*. 2020. Vol. 95, № 4, P. e362–e373.
284. White A.T., Murphy A.N. Administration of thiazolidinediones for neuroprotection in ischemic stroke: a pre-clinical systematic review. // *J. Neurochem*. 2010. Vol. 115, № 4, P. 845–853.
285. Pancani T., Phelps J.T., Searcy J.L., Kilgore M.W., Chen K.C., Porter N.M., Thibault O. Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated Ca²⁺ currents by PPAR-gamma agonists in cultured hippocampal neurons. // *J. Neurochem*. 2009. Vol. 109, № 6, P. 1800–1811.
286. Culman J., Nguyen-Ngoc M., Glatz T., Gohlke P., Herdegen T., Zhao Y. Treatment of rats with pioglitazone in the reperfusion phase of focal cerebral ischemia: a preclinical stroke trial. // *Exp. Neurol*. 2012. Vol. 238, № 2, P. 243–253.
287. Lee M., Saver J.L., Liao H.W., Lin C.H., Ovbiagele B. Pioglitazone for Secondary Stroke Prevention: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *Stroke*. 2017. Vol. 48, № 2, P. 388–393.
288. Spence J.D., Viscoli C.M., Inzucchi S.E., Dearborn-Tomazos J., Ford G.A., Gorman M., Furie K.L., Lovejoy A.M., Young L.H., Kernan W.N.; IRIS Investigators. Pioglitazone Therapy in Patients With Stroke and Prediabetes: A Post Hoc Analysis of the IRIS Randomized Clinical Trial. // *JAMA Neurol*. 2019. Vol. 76, № 5, P. 526–535.
289. Kernan W.N., Viscoli C.M., Furie K.L., Young L.H., Inzucchi S.E., Gorman M., Guarino P.D., Lovejoy A.M., Peduzzi P.N., Conwit R., Brass L.M., Schwartz G.G., Adams H.P. Jr, Berger L., Carolei A., Clark W., Coull B., Ford G.A., Kleindorfer D., O'Leary J.R., Parsons M.W., Ringleb P., Sen S., Spence J.D., Tanne D., Wang D., Winder T.R.; IRIS Trial Investigators. Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. // *N. Engl. J. Med*. 2016. Vol. 374, № 14, P. 1321–1331.
290. Furie K.L., Viscoli C.M., Gorman M., Ford G.A., Young L.H., Inzucchi S.E., Guarino P.D., Lovejoy A.M., Conwit R., Tanne D., Kernan W.N.; IRIS Trial Investigators. Effects of pioglitazone on cognitive function in patients with a recent ischaemic stroke or

- TIA: a report from the IRIS trial. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2018. Vol. 89, № 1, P. 21–27.
291. Campbell J.E., Drucker D.J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. // *Cell. Metab.* 2013. Vol. 17, P. 819–837.
292. Llewellyn-Smith I.J., Reimann F., Gribble F.M., Trapp S. Preproglucagon neurons project widely to autonomic control areas. // *Neuroscience*. 2011. Vol. 180, P. 111–121.
293. Kappe C., Tracy L.M., Patrone C., Iverfeldt K., Sjöholm A. GLP-1 secretion by microglial cells and decreased CNS expression in obesity. // *J. Neuroinflammation*. 2012. Vol. 9, P. 276.
294. Hunter K., Hölscher C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixesenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. // *BMC Neurosci.* 2012. Vol. 13, P. 33.
295. Hamilton A., Hölscher C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. // *NeuroReport*. 2009. Vol. 20, P. 1161–1166.
296. Darsalia V., Klein T., Nyström T., Patrone C. Glucagon-like receptor 1 agonists and DPP-4 inhibitors: Anti-diabetic drugs with anti-stroke potential. // *Neuropharmacology*. 2018. Vol. 136, P. 280–286.
297. Darsalia V., Larsson M., Klein T., Patrone C. The high need for trials assessing functional outcome after stroke rather than stroke prevention with GLP-1 agonists and DPP-4 inhibitors. // *Cardiovascular Diabetology*. 2018. Vol. 17, P. 32.
298. Dong W., Miao Y., Chen A., Cheng M., Ye X., Song F., Zheng G. Delayed administration of the GLP-1 receptor agonist liraglutide improves metabolic and functional recovery after cerebral ischemia in rats. // *Neuroscience Letters*. 2017. Vol. 641, P. 1–7.
299. Marlet I.R., Olmestig J.N.E., Vilsboll T., Rungby J., Kruuse C. Neuroprotective mechanisms of glucagon-like peptide-1-based therapies in ischaemic stroke: A systematic review based on pre-clinical studies. // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2018. Vol. 122, P. 559–569.

300. Yang X., Feng P., Zhang X., Li D., Wang R., Ji C., Li G., Hölscher C. The diabetes drug semaglutide reduces infarct size, inflammation, and apoptosis, and normalizes neurogenesis in a rat model of stroke. // *Neuropharmacology*. 2019. Vol. 158, P. 107748.
301. Augestad I.L., Dekens D., Karampatsi D., Elabi O., Zabala A., Pintana H., Larsson M., Nyström T., Paul G., Darsalia V., Patrone C. Normalisation of glucose metabolism by exendin-4 in the chronic phase after stroke promotes functional recovery in male diabetic mice. // *Br. J. Pharmacol.* 2022. Vol. 179, № 4, P. 677–694.
302. Astrup J., Siesjö B.K., Symon L. Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. // *Stroke*. 1981. Vol. 12, P. 723–725.
303. Davis S., Donnan G.A. Time is penumbra: imaging, selection and outcome. // *The Johann Jacob Wepfer Award 2014*. // *Cerebrovasc. Dis.* 2014. Vol. 38, P. 59–72.
304. Murphy T.H., Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. Vol. 10, № 12, P. 861–872.
305. Carmichael S.T., Wei L., Rovainen C.M., Woolsey T.A. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. // *Neurobiol. Dis.* 2001. Vol. 8, P. 910–922.
306. Carmichael S.T., Chesselet M.F. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, P. 6062–6070.
307. Dancause N., Barbay S., Frost S.B., Plautz E.J., Chen D., Zoubina E.V., Stowe A.M., Nudo R.J. Extensive cortical rewiring after brain injury. // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25, № 44, P.10167–10179.
308. Yamamoto T., Hayashi T., Murata Y., Ose T., Higo N. Premotor Cortical-Cerebellar Reorganization in a Macaque Model of Primary Motor Cortical Lesion and Recovery. // *J Neurosci.* 2019. Vol. 39, № 43, P. 8484–8496.
309. Carmichael S.T., Archibeque I., Luke L., Nolan T., Momiy J., Li S. Growth-associated gene expression after . Vol. 193, № 2, P. 291–311.
310. Brown C.E., Aminoltejari K., Erb H., Winship I.R., Murphy T.H. In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of

activation within both the peri-infarct zone and distant sites. // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29, № 6, P. 1719–1734.

311. Caroni P., Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. // *J. Cell. Biol.* 1990. Vol. 110, № 4, P. 1307–1317.

312. Fernyhough P., Mill J.F., Roberts J.L., Ishii D.N. Stabilization of tubulin mRNAs by insulin and insulin-like growth factor I during neurite formation. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1989. Vol. 6, № 2–3, P. 109–120.

313. Mill J.F., Chao M.V., Ishii D.N. Insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82, № 20, P. 7126–7130.

314. Lázár B.A., Jancsó G., Pálvölgyi L., Dobos I., Nagy I., Sántha P. Insulin Confers Differing Effects on Neurite Outgrowth in Separate Populations of Cultured Dorsal Root Ganglion Neurons: The Role of the Insulin Receptor. // *Front. Neurosci.* 2018. Vol. 12, P. 732.

315. Toth C., Brussee V., Martinez J.A., McDonald D., Cunningham F.A., Zochodne D.W. Rescue and regeneration of injured peripheral nerve axons by intrathecal insulin. // *Neuroscience.* 2006. Vol. 139, P. 429–449.

316. Xu Q.G., Li X.Q., Kotecha S.A., Cheng C., Sun H.S., Zochodne D.W. Insulin as an in vivo growth factor. // *Exp. Neurol.* 2004. Vol. 188, № 1, P. 43–51.

317. Song J., Kang S.M., Kim E., Kim C.H., Song H.T., Lee J.E. Impairment of insulin receptor substrate 1 signaling by insulin resistance inhibits neurite outgrowth and aggravates neuronal cell death. // *Neuroscience.* 2015. Vol. 301, P. 26–38.

318. Lee C.C., Huang C.C., Hsu K.S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. // *Neuropharmacology.* 2011. Vol. 61, № 4, P. 867–879.

319. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? // *Science.* 1962. Vol. 135, № 3509, P. 1127–1128.

320. Li Y., Guo W. Neural Stem Cell Niche and Adult Neurogenesis. // *Neuroscientist*. 2021. Vol. 27, № 3, P. 235–245.
321. Spalding K.L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H.B., Boström E., Westerlund I., Vial C., Buchholz B.A., Possnert G., Mash D.C., Druid H., Frisén J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. // *Cell*. 2013. Vol. 153, № 6, P. 1219–1227.
322. Thored P., Arvidsson A., Cacci E., Ahlenius H., Kallur T., Darsalia V., Ekdahl C.T., Kokaia Z., Lindvall O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. // *Stem Cells*. 2006. Vol. 24, № 3, P. 739–747.
323. Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z., Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8, № 9, P. 963–970.
324. Parent J.M., Vexler Z.S., Gong C., Derugin N., Ferriero D.M. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. // *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 52, № 6, P. 802–813.
325. Jin K., Sun Y., Xie L., Peel A., Mao X.O., Batteur S., Greenberg D.A. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2003. Vol. 24, № 1, P. 171–189.
326. Ohab J.J., Fleming S., Blesch A., Carmichael S.T. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 50, P. 13007–13016.
327. Yamashita T., Ninomiya M., Hernández Acosta P., García-Verdugo J.M., Sunabori T., Sakaguchi M., Adachi K., Kojima T., Hirota Y., Kawase T., Araki N., Abe K., Okano H., Sawamoto K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 24, P. 6627–6636.
328. Ohab J.J., Carmichael S.T. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. // *Neuroscientist*. 2008. Vol. 14, № 4, P. 369–380.

329. Dillen Y., Kemps H., Gervois P., Wolfs E., Bronckaers A. Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone and Its Regulation After Ischemic Stroke: Implications for Therapeutic Approaches. // *Transl. Stroke Res.* 2020. Vol. 11, № 1, P. 60–79.
330. Macas J., Nern C., Plate K.H., Momma S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 50, P. 13114–13119.
331. Wang X., Mao X., Xie L., Sun F., Greenberg D.A., Jin K. Conditional depletion of neurogenesis inhibits long-term recovery after experimental stroke in mice. // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 6, P. e38932.
332. Sun C., Sun H., Wu S., Lee C.C., Akamatsu Y., Wang R.K., Kernie S.G., Liu J. Conditional ablation of neuroprogenitor cells in adult mice impedes recovery of poststroke cognitive function and reduces synaptic connectivity in the perforant pathway. // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 44, P. 17314–17325.
333. Lehtinen M.K., Zappaterra M.W., Chen X., Yang Y.J., Hill A.D., Lun M., Maynard T., Gonzalez D., Kim S., Ye P., D'Ercole A.J., Wong E.T., LaMantia A.S., Walsh C.A. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. // *Neuron.* 2011. Vol. 69, P. 893–905.
334. Ziegler A.N., Levison S.W., Wood T.L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015. Vol. 11, № 3, P. 161–170.
335. Bracko O., Singer T., Aigner S., Knobloch M., Winner B., Ray J., Clemenson G.D. Jr, Suh H., Couillard-Despres S., Aigner L., Gage F.H., Jessberger S. Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32, P. 3376–3387.
336. Åberg D., Åberg N.D., Jood K., Redfors P., Blomstrand C., Isgaard J., Jern C., Svensson J. Insulin-Like Growth Factor-II and Ischemic Stroke-A Prospective Observational Study. // *Life (Basel).* 2021. Vol. 11, № 6, P. 499.
337. Jin K., Xie L., Mao X.O., Greenberg D.A. Alzheimer's disease drugs promote neurogenesis. // *Brain Res.* 2006. Vol. 1085, P. 183–188.

338. Kita Y., Ago Y., Higashino K., Asada K., Takano E., Takuma K., Matsuda T. Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M₁ muscarinic and α 7 nicotinic receptors in mice. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. Vol. 17, № 12, P. 1957–1968.
339. Kita Y., Ago Y., Takano E., Fukada A., Takuma K., Matsuda T. Galantamine increases hippocampal insulin-like growth factor 2 expression via α 7 nicotinic acetylcholine receptors in mice. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2013. Vol. 225, № 3, P. 543–551.
340. Napoli I., Blusztajn J.K., Mellott T.J. Prenatal choline supplementation in rats increases the expression of IGF2 and its receptor IGF2R and enhances IGF2-induced acetylcholine release in hippocampus and frontal cortex. // *Brain Res.* 2008. Vol. 1237, P. 124–135.
341. Скворцова В.И., Тубский Л.В., Таирова Р.Т., Поварова О.В., Чеглаков И.Б., Холоденко Р.В., Холоденко И.В., Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. Применение мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2008. № 1. С. 14–20.
342. Goldstein B.J., Ahmad F., Ding W., Li P.M., Zhang W.R. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. // *Mol. Cell Biochem.* 1998. Vol. 182, № 1-2, P. 91–99.
343. Mahadev K., Zilbering A., Zhu L., Goldstein B.J. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 24, P. 21938–21942.
344. Mahadev K., Wu X., Zilbering A., Zhu L., Lawrence J.T., Goldstein B.J. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 52, P. 48662–48669.

345. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. // FEBS Lett. 1997. Vol. 416, № 1, P. 15–18.
346. Hansford R.G., Hogue B.A., Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. // J. Bioenerg. Biomembr. 1997. Vol. 29, № 1, P. 89–95.
347. Bessman S.P., Mohan C., Zaidise I. Intracellular site of insulin action: mitochondrial Krebs cycle. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83, P. 5067–5070.
348. Bessman S.P., Mohan C. Insulin as a probe of mitochondrial metabolism in situ. // Mol. Cell. Biochem. 1997. Vol. 174, P. 91–96.
349. Kremerskothen J., Barnekov A. Non-radioactive determination of phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity. // J. Kremerskothen, A. Barnekov. in Tyrosine phosphorylation/ dephosphorylation and downstream signaling. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1993. –376 P.
350. Pick E., Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. // J. Immunol. Methods. 1980. Vol. 38, P. 161–170.
351. Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V., Treberg J.R., Ackrell B.A., Brand M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287, № 32, P. 27255–27264.
352. Komaromy-Hiller G., Sundquist P.D., Jacobsen L.J., Nuttall K.L. Serum succinate by capillary zone electrophoresis: marker candidate for hypoxia. // Ann. Clin. Lab. Sci. 1997. Vol. 27, № 2, P. 163–168.
353. Hochachka P.W., Dressendorfer R.H. Succinate accumulation in man during exercise. // Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 1976. Vol. 35, № 4, P. 235–242.
354. Andreeva N., Khodorov B., Stelmashook E., Cragoe E., Jr, Victorov I. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. // Brain Res. 1991. Vol. 548, P. 322–325.

355. 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.
356. Khodorov B., Pinelis V., Vergun O., Storozhevykh T., Vinskaya N. Mitochondrial deenergization underlies neuronal calcium overload following a prolonged glutamate challenge. // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 397, P. 230–234.
357. Persiyantseva N.A., Storozhevykh 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.
358. Antunes F., Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 475, P. 121–126.
359. Pomytkin I.A. H₂O₂ Signalling Pathway: A Possible Bridge between Insulin Receptor and Mitochondria. // *Curr. Neuropharmacol.* 2012. Vol. 10, № 4, P. 311–320.
360. Goldbeter A., Koshland D.E. Jr. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. Vol. 78, № 11, P. 6840–6844.
361. Ferrell J.E. Jr. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. // *Trends Biochem. Sci.* 1996. Vol. 21, P. 460–466.
362. Toescu E.C., Verkhratsky A. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. // *Pflugers Arch.* 2000. Vol. 440, P. 941–947.
363. Krieger-Brauer H.I., Medda P.K., Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Galphai2. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 15, P. 10135–10143.

364. Sunyer T., Monastirsky B., Codina J., Birnbaumer L. Studies on nucleotide and receptor regulation of Gi proteins: effects of pertussis toxin. // *Mol. Endocrinol.* 1989. Vol. 3, № 7, P. 1115–1124.
365. Villaseca S., Romero G., Ruiz M.J., Pérez C., Leal J.I., Tovar L.M., Torrejón M. G*ai* protein subunit: A step toward understanding its non-canonical mechanisms. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2022. Vol. 10, P. 941870.
366. Khan Z.U., Gutierrez A. Distribution of C-terminal splice variant of G alpha i2 in rat and monkey brain. // *Neuroscience.* 2004. Vol. 127, № 4, P. 833–843.
367. Rutter J., Winge D.R., Schiffman J.D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. // *Mitochondrion.* 2010. Vol. 10, № 4, P. 393–401.
368. Gutman M. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function. // *Mol. Cell Biochem.* 1978. Vol. 20, P. 41–60.
369. Ackrell B.A., Kearney E.B., Edmondson D. Mechanism of the reductive activation of succinate dehydrogenase. // *J. Biol. Chem.* 1975, Vol. 250, P. 7114–7119.
370. Ackrell B.A., Kearney E.B., Singer T.P. Mammalian succinate dehydrogenase. // *Methods Enzymol.* 1978. Vol. 53, P. 466–483.
371. Gutman M., Kearney E.B., Singer T.P. Multiple control mechanisms for succinate dehydrogenase in mitochondria. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971, Vol. 44, P. 526–532.
372. Gutman M., Kearney E.B., Singer T.P. Activation of succinate dehydrogenase by electron flux from NADH and its possible regulatory function. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971. Vol. 42, P. 1016–1023.
373. Gutman M., Kearney E.B., Singer T.P. Control of succinate dehydrogenase in mitochondria. // *Biochemistry.* 1971. Vol. 10, P. 4763–4770.
374. Nulton-Persson A.C., Szweda L.I. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, P. 23357–23361.
375. Moser M.D., Matsuzaki S., Humphries K.M. Inhibition of succinate-linked respiration and complex II activity by hydrogen peroxide. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2009. Vol. 488, P. 69–75.

376. Singer T.P., Gutman M., Kearney E.B. On the need for regulation of succinate dehydrogenase. // *FEBS Lett.* 1971. Vol. 17, P. 11–13.
377. Flohé L., Loschen G., Günzler W.A., Eichele E. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. // *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1972, Vol. 353, P. 987–999.
378. Peskin A.V., Low F.M., Paton L.N., Maghzal G.J., Hampton M.B., Winterbourn C.C. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, P. 11885–11892.
379. Cox A.G., Winterbourn C.C., Hampton M.B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. // *Biochem. J.* 2009. Vol. 425, P. 313–325.
380. Chiu D.T., Stults F.H., Tappel A.L. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1976. Vol. 445, P. 558–566.
381. McClung J.P., Roneker C.A., Mu W., Lisk D.J., Langlais P., Liu F., Lei X.G. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, P. 8852–8857.
382. Loh K., Deng H., Fukushima A., Cai X., Boivin B., Galic S., Bruce C., Shields B.J., Skiba B., Ooms L.M., Stepto N., Wu B., Mitchell C.A., Tonks N.K., Watt M.J., Febbraio M.A., Crack P.J., Andrikopoulos S., Tiganis T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. // *Cell. Metab.* 2009. Vo. 10, P. 260–272.
383. Zhu X., Raina A.K., Lee H.G., Casadesus G., Smith M.A., Perry G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. // *Brain Res.* 2004. Vol. 1000, P. 32–39.
384. Moreira P.I., Zhu X., Liu Q., Honda K., Siedlak S.L., Harris P.L., Smith M.A., Perry G. Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease. // *Biol. Res.* 2006. Vol. 39, P. 7–13.
385. Aksenov M.Y., Tucker H.M., Nair P., Aksenova M.V., Butterfield D.A., Estus S., Markesbery W.R. The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. // *J. Mol. Neurosci.* 1998. Vol. 11, P. 151–164.

386. Aksenov M.Y., Markesbery W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. // *Neurosci. Lett.* 2001. Vol. 302, P. 141–145.
387. Kim S.H., Fountoulakis M., Cairns N., Lubec G. Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2001. Vol. 61, P. 223–235.
388. Cumming R.C., Dargusch R., Fischer W.H., Schubert D. Increase in expression levels and resistance to sulfhydryl oxidation of peroxiredoxin isoforms in amyloid beta-resistant nerve cells. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, P. 30523–30534.
389. Sultana R., Boyd-Kimball D., Cai J., Pierce W.M., Klein J.B., Merchant M., Butterfield D.A. Proteomics analysis of the Alzheimer's disease hippocampal proteome. // *J. Alzheimers Dis.* 2007. Vol. 11, P. 153–164.
390. Li Z., Okamoto K., Hayashi Y., Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. // *Cell.* 2004. Vol. 119, P. 873–887.
391. 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.
392. Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15, P. 6541–6551.
393. Nave B.T., Ouwens M., Withers D.J., Alessi D.R., Shepherd P.R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. // *Biochem. J.* 1999. Vol. 344, P. 427–431.
394. Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. // *Nature.* 1995. Vol. 378, P. 785–789.

395. 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.
396. Ehinger J.K., Piel S., Ford R., Karlsson M., Sjövall F., Frostner E.Å., Morota S., Taylor R.W., Turnbull D.M., Cornell C., Moss S.J., Metzsch C., Hansson M.J., Fliri H., Elmér E. Cell-permeable succinate prodrugs bypass mitochondrial complex I deficiency. // *Nat. Commun*. 2016. Vol. 7, P. 12317.
397. Reddy A., Bozi L.H.M., Yaghi O.K., Mills E.L., Xiao H., Nicholson H.E., Paschini M., Paulo J.A., Garrity R., Laznik-Bogoslavski D., Ferreira J.C.B., Carl C.S., Sjøberg K.A., Wojtaszewski J.F.P., Jeppesen J.F., Kiens B., Gygi S.P., Richter E.A., Mathis D., Chouchani E.T. pH-Gated Succinate Secretion Regulates Muscle Remodeling in Response to Exercise. // *Cell*. 2020. Vol. 183, № 1, P. 62-75.e17.
398. 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.
399. Zeisel S.H., daCosta K.A., Franklin P.D., Alexanfder E.A., Lamont J.T., Sheard N.F., Beiser A. Choline, an essential nutrient for humans. // *FASEB J*. 1991. Vol. 5, P. 2093–2098.
400. Hirsch M.J., Growdon J.H., Wurtman R.J. Relations between dietary choline or lecithin intake, serum choline levels, and various metabolic indices. // *Metabolism*. 1978. Vol. 27, P. 953-960.
401. Zeisel S.H., Growdon J.H., Wurtman R.J., Magil S.G., Logue M. Normal plasma choline responses to ingested lecithin. // *Neurology*. 1980. Vol. 30, № 11, P. 1226–1229.
402. Rudin M., Sauter A. In Vivo Phosphorus-31 NMR: Potential and Limitations. Basic principles and progress. / Ed. by Diehl P., Fluck E., Gunther H., Kosfeld R., Seelig J. - Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1992. Vol. 28, P. 161 – 168.

403. 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.
404. Лиходий С.Ст., Лиходий Ст. С., Сибельдина Л.А., Семенова Н.А. Динамика уровней макроэргических фосфатов во время ишемии по данным ^{31}P ЯМР спектроскопии. // Нейрохимия. 1988. Т. 7, № 3. С. 415–424.
405. Yousufuddin M., Young N. Aging and ischemic stroke. // Aging (Albany NY). 2019. Vol. 11, № 9, P. 2542–2544.
406. Moffett J.R., Ross B., Arun P., Madhavarao C.N., Namboodiri A.M. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. // Prog. Neurobiol. 2007. Vol. 81, № 2, P. 89–131.
407. Moffett J.R., Arun P., Ariyannur P.S., Namboodiri A.M. N-Acetylaspartate reductions in brain injury: impact on post-injury neuroenergetics, lipid synthesis, and protein acetylation. // Front. Neuroenergetics. 2013. Vol. 5, P. 11.
408. Bates, T. E., Strangward, M., Keelan, J., Davey, G. P., Munro, P. M., and Clark, J. B. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for ^1H MRS studies *in vivo*. // Neuroreport. 1996. Vol. 7, P. 1397–1400.
409. Igarashi H., Suzuki Y., Huber V.J., Ida M., Nakada T. N-acetylaspartate decrease in acute stage of ischemic stroke: a perspective from experimental and clinical studies. // Magn. Reason. Med. Sci. 2015. Vol. 14, № 1, P. 13–24.
410. Glodzik-Sobanska L., Li J., Mosconi L., Slowik A., Walecki J., Szczudlik A., Sobiecka B., de Leon M.J. Prefrontal N-acetylaspartate and poststroke recovery: a longitudinal proton spectroscopy study. // AJNR Am. J. Neuroradiol. 2007. Vol. 28, № 3, P. 470–474.
411. Austin T., Bani-Ahmed A., Cirstea M.C. N-Acetylaspartate Biomarker of Stroke Recovery: A Case Series Study. // Front. Neurol. Neurosci. Res. 2021. Vol. 2, P. 100007.
412. Ross A.J., Sachdev P.S., Wen W., Brodaty H., Joscelyne A., Lorentz L.M. Prediction of cognitive decline after stroke using proton magnetic resonance spectroscopy. // J. Neurol. Sci. 2006. Vol. 251, № 1-2, P. 62–69.

413. Kirov I.I., Sollberger M., Davitz M.S., Glodzik L., Soher B.J., Babb J.S., Monsch A.U., Gass A., Gonen O. Global brain volume and N-acetyl-aspartate decline over seven decades of normal aging. // *Neurobiol. Aging*. 2021. Vol. 98, P. 42–51.
414. Glodzik L., Sollberger M., Gass A., Gokhale A., Rusinek H., Babb J.S., Hirsch J.G., Amann M., Monsch A.U., Gonen O. Global N-acetylaspartate in normal subjects, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease patients. // *J. Alzheimers. Dis.* 2015. Vol. 43, № 3, P. 939–947.
415. Gadian D.G., Frackowiak R.S.J., Crockard H.A., Proctor E., Allen K., Williams S.R., Ross Russel R.W. Acute cerebral ischemia: concurrent changes in cerebral blood flow, energy metabolites, pH, and lactate measured with hydrogen clearance and ^{31}P and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. I. Methodology. // *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1987. Vol. 7, P. 199–206.
416. Williams S.R., Gadian D.G., Proctor E. A method for lactate detection in vivo by spectral editing without the need for double irradiation. // *J. Magn. Reson.* 1986. Vol. 66, P. 562–567.
417. Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial leaning in the rat. // *J. Neurosci. Methods.* 1984. Vol. 11, P. 47–60.
418. Karczewska-Kupczewska M., Tarasów E., Nikolajuk A., Stefanowicz M., Matulewicz N., Otziomek E., Górská M., Straczkowski M., Kowalska I. The effect of insulin infusion on the metabolites in cerebral tissues assessed with proton magnetic resonance spectroscopy in young healthy subjects with high and low insulin sensitivity. // *Diabetes Care.* 2013. Vol. 36, № 9, P. 2787–2793.
419. Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment, and vascular dementia. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. Vol. 1862, № 5, P. 915–925.
420. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. // *Neuron.* 2013. Vol. 80, P. 844–866.
421. Birdsill A.C., Carlsson C.M., Willette A.A., Okonkwo O.C., Johnson S.C., Xu G., Oh J.M., Gallagher CL, Kosciak RL, Jonaitis EM, Hermann BP, LaRue A, Rowley HA,

- Asthana S, Sager M.A., Bendlin B.B. Low cerebral blood flow is associated with lower memory function in metabolic syndrome. // *Obesity* 2013. Vol. 21, P. 1313–1320.
422. Hoscheidt S.M., Kellawan J.M., Berman S.E., Rivera-Rivera L.A., Krause R.A., Oh J.M., Beerl M.S., Rowley H.A., Wieben O., Carlsson C.M., Asthana S., Johnson S.C., Schrage W.G., Bendlin B.B. Insulin resistance is associated with lower arterial blood flow and reduced cortical perfusion in cognitively asymptomatic middle-aged adults. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017. Vol. 37, № 6, P. 2249–2261.
423. Farkas E., Luiten P.G., Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. // *Brain Res. Rev.* 2007. Vol. 54, № 1, P. 162–180.
424. Tomimoto H., Ihara M., Wakita H., Ohtani R., Lin J.X., Akiguchi I., Kinoshita M., Shibasaki H. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. // *Acta Neuropathol. (Berl)*. 2003. Vol. 106, P. 527–534.
425. Помыткин Н.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Прошин А.Т., Шерстнев В.В., Варфоломеев С.Д. Нейропротекторный эффект янтарнокислого холина по тестам когнитивной функции и ^1H ЯМР *in vivo* в модели хронической ишемии головного мозга крыс. // *Известия РАН Сер. Биол.* 2007. Т. 2, С. 183–187.
426. Ouyang F., Jiang Z., Chen X., Chen Y., Wei J., Xing S., Zhang J., Fan Y., Zeng J. Is Cerebral Amyloid- β Deposition Related to Post-stroke Cognitive Impairment? // *Transl. Stroke Res.* 2021. Vol. 12, № 6, P. 946–957.
427. Sun J.H., Tan L., Yu J.T. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. // *Ann. Transl. Med.* 2014. Vol. 2, № 8, P. 80.
428. Desmond D.W., Moroney J.T., Paik M.C., Sano M., Mohr J.P., Aboumatar S., Tseng C.L., Chan S., Williams J.B., Remien R.H., Hauser W.A., Stern Y. Frequency and clinical determinants of dementia after ischemic stroke. // *Neurology*. 2000. Vol. 54, № 5, P. 1124–1131.
429. Harkany T., O'Mahony S., Kelly J.P., Soos K., Toro I., Penke B., Luiten P.G., Nyakas C., Gulya K., Leonard B.E. Beta-amyloid(Phe(SO₃H)₂₄)_{25–35} in rat nucleus basalis

- induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. // *Behav. Brain Res.* 1998. Vol. 90, P. 133–145.
430. Yamaguchi Y., Kawashima S. Effects of amyloid-beta-(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. // *Eur. J. Pharmacol.* 2001. Vol. 412, P. 265–272.
431. Fonnum F. A radiochemical method for the estimation of choline acetyltransferase. // *Biochem. J.* 1966. Vol. 100, P. 479–484.
432. Xie L., Helmerhorst E., Taddei K., Plewright B., Van Bronswijk W., Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, P. RC221.
433. Rivera E.J., Goldin A., Fulmer N., Tavares R., Wands J.R., de la Monte S.M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. // *J. Alzheimers Dis.* 2005. Vol. 8, P. 247–268.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО «ЭЛЛАРА»

В.Э. Боровиков

«16» мая 2024 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Помыткина Игоря Анатольевича
«МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА
В НЕЙРОНАХ»

в разработку оригинального препарата Дирекорд, раствор для внутримышечного введения, действующее вещество ДИХОЛИНСУКЦИНАТ 100 мг/мл, производства ООО «Эллара» (Россия) для лечения ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде.

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что следующие научные положения, результаты и выводы докторской диссертации Помыткина Игоря Анатольевича на тему «МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОНАХ» внедрены в разработку оригинального препарата Дирекорд компанией ООО «ЭЛЛАРА»:

1. Дихолинсукцинат, впервые синтезированный Помыткиным И.А., в качестве действующего вещества в составе препарата Дирекорд, его способ синтеза и методы анализа в составе фармсубстанции и лекарственной формы препарата, а также показания к применению (патенты РФ №№ RU2228174C2, RU2281765C1, RU2281766C1; евразийские патенты №№ EA017094B, EA016274B1, EA019584B1).

2. Механизм регуляции чувствительности инсулиновых рецепторов в нейронах дихолинсукцинатом как обоснование механизма действия препарата Дирекорд.

4. Выбор дозы и способы применения дихолинсукцината при проведении полного комплекса доклинических исследований эффективности и безопасности препарата Дирекорд, которые успешно завершены.

5. Выбор дозы и способа применения дихолинсукцината в составе препарата Дирекорд при проведении клинических исследований I, II и III фазы по показанию лечение ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде, которые успешно завершены и препарат находится на стадии получения регистрационного удостоверения в Минздраве РФ.

Первый заместитель
Генерального директора

Медицинский директор

В.В. Боровиков

А.Б. Машутин

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(справочное)

Клиническое исследование I фазы открытое лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у здоровых добровольцев

Введение

Дирекорд – оригинальный препарат, раствор для внутримышечного введения, содержащий в качестве действующего вещества дихолинсукцинат в концентрации 100 мг/мл. Дихолинсукцинат повышает чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах, повышая фосфорилирование рецептора в ответ на низкие субоптимальные дозы инсулина.

Доклинические исследования дихолинсукцината показали эффективность и безопасность дихолинсукцината при инъекционном введении в биомоделях церебральной гипоперфузии и ишемии.

Цель исследования – изучить переносимость, безопасность и фармакокинетические параметры препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат 100 мг/мл, при внутримышечном введении в клиническом исследовании I фазы на здоровых добровольцах.

Проведение исследования

Открытое, с последовательной эскалацией дозы исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата Дирекорд проведено на базе государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница №3» (ГБУЗ ЯО «КБ № 3») г. Ярославль с участием клинической лаборатории «МедИнКом», г. Ярославль и биоаналитической лаборатории НПЦ «Пробиотек», г. Москва с 01.08.2016 по 27.12.2016 г. Клиническое исследование I фазы проводили в соответствии с утвержденным протоколом и этическими принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, трехсторонним соглашением по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP) и регламентировалось действующим законодательством РФ: Конституция РФ; Федеральный закон от 21.11.2011 г. № 323-

ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации"; Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» от 27.09.2005 г. N 232-ст); Постановление Правительства РФ от 13.09.2010 г. № 714 «Об утверждении типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата»; Постановление Правительства РФ от 18.05.2011 г. № 393 «О внесении изменений в типовые правила обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата»; Разрешение № 287 на проведение клинического исследования от 25.04.2016 г., выданное Минздравом России; дополнения к Разрешению № 287 – Письмо Минздрава России № 4016394-20-1/ДР от 12.07.2016 г. Протокол исследования, Брошюра исследователя, Информационный листок пациента с формой информированного согласия на участие в исследовании и образец Индивидуальной регистрационной карты были одобрены Локальным этическим комитетом (ЛЭК) ГБУЗ ЯО «КБ № 3» до начала включения добровольцев в исследование (Протокол заседания ЛЭК № 63 от 12.07.2016 г.). Всем добровольцам в ходе разъяснительной беседы и в письменной форме была предоставлена исчерпывающая информация, касающаяся всех аспектов проводимого исследования.

Критерии отбора

В исследовании участвовали 18 здоровых добровольцев. Главным критерием включения был верифицированный диагноз «здоров», который определялся как отсутствие отклонений, выявленных при подробном медицинском анамнезе, полном врачебном осмотре, включающем измерение АД и ЧСС, температуры тела, ЭКГ в 12 отведениях и по результатам клинических лабораторных исследований. В исследование не включались добровольцы, имевшие гиперчувствительность к янтарной кислоте, препаратам, содержащим холин, агонистам и антагонистам

холинергической системы; а также тяжелые реакции гиперчувствительности в анамнезе, вне зависимости от причины их вызвавшей.

План исследования

Добровольцы были случайным образом распределены в две группы. На I этапе 6 добровольцам (группа 1) многократно вводили исследуемый препарат, через день с эскалацией дозы от 0,16 мг/кг/сутки до 600 мг/сутки. На II этапе 12 добровольцам (группа 2) однократно вводили исследуемый препарат в дозе 200 мг. На III этапе этим же 12 добровольцам ежедневно в течение 7 дней вводили исследуемый препарат в дозе 600 мг/день (3 x 200 мг с интервалом 8 часов). Данные от 12 добровольцев (группа 2), полученные на II и III этапах исследования, были включены в расчет фармакокинетических параметров (Рисунок Б1)

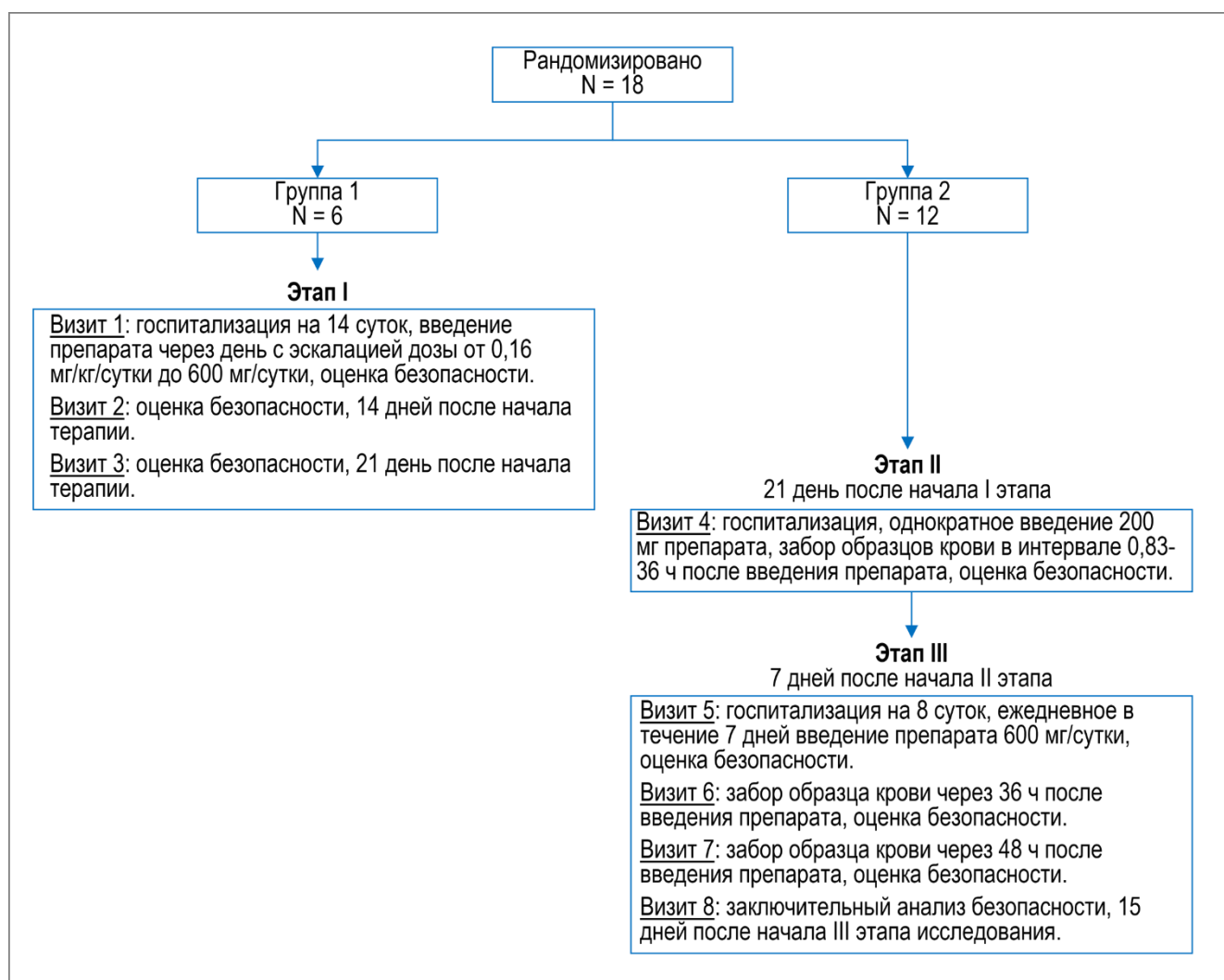


Рисунок Б1 - План исследования.

Исследование фармакокинетики. Концентрация холина в плазме крови добровольцев измерялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, предел обнаружения 0,1 мкг/мл. Эндогенный холин (базовая линия), измерялся в плазме крови каждого добровольца до введения препарата в точке -0,5 ч на этапе II исследования. Абсолютные и скорректированные на базовую линию значения концентраций холина в плазме крови после однократного и многократного введения дихолинсукцината использовались для расчета фармакокинетических параметров:

C_{max} (мкг/мл) – максимальная концентрация вещества в плазме крови добровольца после внутримышечного введения;

TC_{max} (ч) – время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови добровольца после внутримышечного введения;

AUC_{0-t} (мкг·ч/мл) – площадь под фармакокинетической кривой после внутримышечного введения до времени отбора последнего образца крови t ;

$AUC_{0-\infty}$ (мкг·ч/мл) – площадь под фармакокинетической кривой после внутримышечного введения до бесконечности, рассчитанная как $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/k_{el}$, где C_t – это последняя измеренная концентрация вещества в плазме крови;

$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ (%) – отношение значений AUC_{0-t} к $AUC_{0-\infty}$, в процентах;

C_{max}/AUC_{0-t} (ч⁻¹) – относительная скорость всасывания в системный кровоток;

$T_{1/2}$ (ч) – период полувыведения;

k_{el} (ч⁻¹) – константа скорости элиминации представляет собой долю вещества, элиминируемую из кровотока в единицу времени;

C_{min} (мкг/мл) – значение концентрации вещества в плазме крови добровольца в конце интервала дозирования;

AUC_{τ} (мкг·ч/мл) – площадь под фармакокинетической кривой в пределах интервала дозирования (рассчитывается по методу трапеций).

Оценка безопасности. Регистрация нежелательных явлений (НЯ), связанных по мнению исследователя, с применением исследуемого препарата, проводилась на

протяжении всего исследования. Основным параметром безопасности была доля добровольцев с выявленными НЯ. Дополнительные параметры безопасности включали процентное соотношение добровольцев, которые прекратили участие в исследовании и процентное соотношение добровольцев, которые прекратили участие в исследовании из-за НЯ. Изучение безопасности включало регистрацию НЯ; сбор медицинского анамнеза и регулярное обновление данных в ходе исследования; лабораторные анализы крови и мочи; измерение основных жизненных показателей (АД, ЧСС и температуры тела); физикальное обследование, включая осмотр места введения; электрокардиографию в 12 стандартных отведениях. Отдельно оценивалось холинергическое действие исследуемого препарата: влияние на сердечный ритм, артериальное давление, ЦНС и желудочно-кишечный тракт.

Статистический анализ. Выборочные параметры, приводимые в таблицах, имеют следующие обозначения: М – среднее, s – стандартное отклонение, n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Расчет фармакокинетических параметров осуществлялся с использованием валидированного программного обеспечения Phoenix WinNonLin (Версия 7.0). Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 19.0.

Результаты исследования

Исходные характеристики добровольцев показаны в Таблице Б1.

Таблица Б1 - Исходная характеристика добровольцев.

Показатель	Группа 1 + Группа 2 (n=18)
Женщины / мужчины	11 / 7
Возраст, годы (M ± s)	30,4 ± 7,8
Масса тела, кг (M ± s)	70,9 ± 8,5
Рост, м (M ± s)	1,73 ± 0,07
Индекс массы тела, кг/м ² (M ± s)	23,6 ± 1,8

Базовый эндогенный уровень холина в плазме крови добровольцев до введения препарата в точке -0,5 ч на II этапе исследования составил в среднем $0,734 \pm 0,132$ мкг/мл. После однократного в/м введения препарата действующее вещество быстро всасывалось со средней скоростью $0,433 \pm 0,381$ ч⁻¹. Максимальная концентрация C_{max} в плазме достигалась через $0,375 \pm 0,365$ ч и составила $0,990 \pm 0,557$ мкг/мл с поправкой на базовый уровень холина в плазме. Средние значения k_{el} и $T_{1/2}$ ($1,211 \pm 1,127$ ч⁻¹ и $1,27 \pm 1,07$ ч, соответственно), свидетельствуют о быстрой элиминации холина. Площадь под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} после корректировки на базовую линию составила $3,549 \pm 2,857$ мкг·ч/мл (Рисунок Б2).

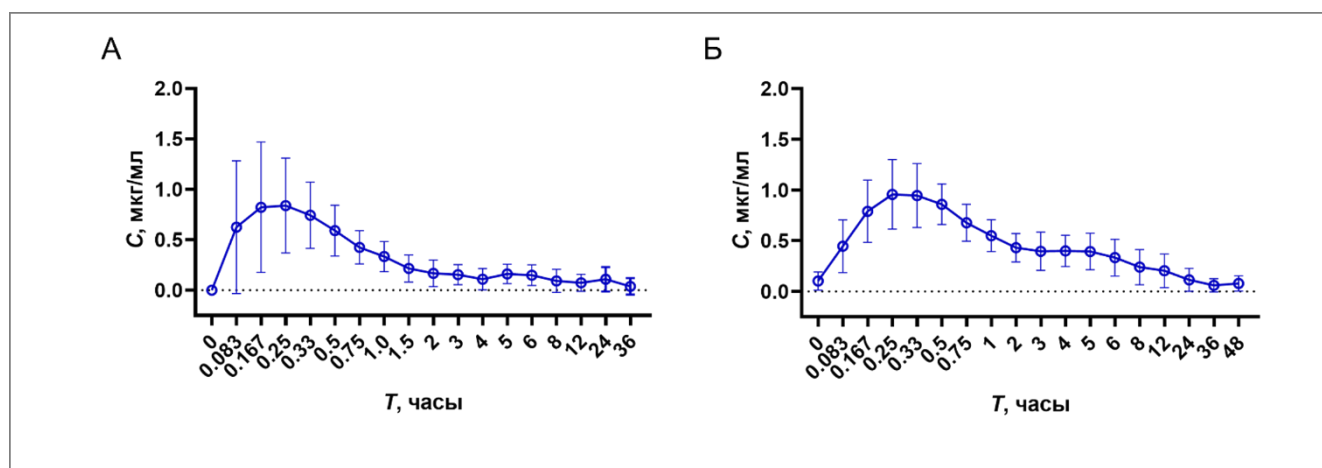


Рисунок Б2 - Кинетические кривые концентраций холина в плазме крови добровольцев. (А) после однократного внутримышечного введения дихолинсукцината в дозе 200 мг (этап II); (Б) после многократного внутримышечного введения дихолинсукцината в дозе 200 мг (на 7-й день этапа III). $M \pm s$ (n=12).

Фармакокинетические параметры дихолинсукцината (оценка по холину) после однократного внутримышечного введения в дозе 200 мг (этап II) показаны в Таблице Б2, а фармакокинетические параметры дихолинсукцината (оценка по холину) в плазме крови добровольцев, получавших ежедневно внутримышечно дихолинсукцинат в дозе 600 мг (3 x 200 мг с перерывом 8 ч) в течение 7 дней,

рассчитанные на основе последнего внутримышечного введения в дозе 200 мг (7-й день этапа III) представлены в Таблице Б3.

Таблица Б2 - Фармакокинетические параметры после однократного внутримышечного введения дихолинсукцината здоровым добровольцам (этап II) с поправкой на базовый уровень холина в плазме.

Параметр	M ± s (N = 18)	
C_{max}	0,990 ± 0,557	мкг/мл
TC_{max}	0,375 ± 0,365	ч
AUC_{0-t}	29,213 ± 6,980	мкг·ч/мл
AUC_{0-t}	3,549 ± 2,857	мкг·ч/мл
$AUC_{0-\infty}$	3,550 ± 2,857	мкг·ч/мл
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	99,97 ± 0,09	%
C_{max}/AUC_{0-t}	0,433 ± 0,381	ч ⁻¹
K_{el}	1,211 ± 1,127	ч ⁻¹
$T_{1/2}$	1,271 ± 1,071	ч

Таблица Б3 - Фармакокинетические параметры дихолинсукцината (оценка по холину) после многократного внутримышечного введения здоровым добровольцам (этап III) с поправкой на базовый уровень холина в плазме.

Параметр	M ± s (N = 18)	
C_{max}	1,066 ± 0,331	мкг/мл
TC_{max}	0,34 ± 0,103	ч
C_{min}	0,103 ± 0,089	мкг/мл
AUC_{τ} ($\tau = 8$ ч)	3,324 ± 1,061	мкг·ч/мл

После многократного внутримышечного введения дихолинсукцината в течение 7 дней в дозе 600 мг в сутки концентрации вещества в плазме крови в конце интервала дозирования C_{min} составляла 0,103 ± 0,089 мкг/мл (интервал 0,000 – 0,253 мкг/мл), что свидетельствует об отсутствии накопления холина в кровотоке. Средние значения C_{max} холина после многократного и однократного введений исследуемого препарата (1,066 ± 0,331 и 0,990 ± 0,557 мкг/мл, соответственно)

практически не отличались между собой. Средние значения площади под кривой AUC_t в интервале дозирования ($\tau = 8$ ч) после многократного введения препарата составляли $3,324 \pm 1,061$ мкг·ч/мл, что также не отличалось от AUC_{0-t} $3,549 \pm 2,857$ мкг·ч/мл после однократного введения препарата. В совокупности эти результаты свидетельствуют об отсутствии кумуляции дихолинсукцината при многократном введении в дозе 600 мг в сутки.

Популяция безопасности в данном исследовании включала всех рандомизированных добровольцев – 18 человек. Все добровольцы завершили исследование в соответствии с Протоколом. Соответственно, процентное соотношение добровольцев, которые прекратили участие в исследовании, составило 0.0%; процентное соотношение добровольцев, которые прекратили участие в исследовании из-за нежелательных явлений, составило 0.0%. Для всех добровольцев основные жизненные показатели, результаты физикального осмотра, ЭКГ в 12 отведениях, а также значения лабораторных параметров крови и мочи были в пределах нормы как на этапе скрининга, так и в ходе исследования. Нежелательных явлений у добровольцев популяции безопасности в ходе исследования не зарегистрировано. Доля добровольцев с выявленными нежелательными явлениями, связанными, по мнению исследователя, с применением исследуемого препарата, включая изменения со стороны внутренних органов и систем, лабораторных показателей, изменений ЭКГ, локальные изменения при объективном исследовании за весь период исследования, составила 0.0%. Переносимость препарата была хорошей – признаков гиперемии, отеков и гематом в месте инъекций выявлено не было, жалоб на болезненность, зуд и жжение добровольцы не предъявляли.

Выводы

1. Результаты открытого, с последовательной эскалацией дозы клинического исследования безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у здоровых добровольцев показали, что препарат в дозе 600 мг в сутки обладает высоким профилем

безопасности и может быть рекомендован для дальнейшего изучения в исследовании с участием пациентов.

2. После однократного внутримышечного введения препарата Дирекорд в дозе 200 мг здоровым добровольцам действующее вещество достигает максимальной концентрации в кровотоке в среднем через 22,5 минуты и выводится со средним периодом полувыведения 76 минут.

3. Многократное внутримышечное введение препарата Дирекорд здоровым добровольцам в суточной дозе 600 мг не приводит к кумуляции препарата.

4. У добровольцев популяции безопасности в ходе данного исследования не зарегистрировано нежелательных явлений.

5. Препарат хорошо переносится – признаков гиперемии, отеков и гематом в месте инъекций выявлено не было, жалоб на болезненность, зуд и жжение добровольцы не предъявляли.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(справочное)

Клиническое исследование II фазы лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде

Введение

Дирекорд – оригинальный препарат, содержащий в качестве действующего вещества дихолинсукцинат, 100 мг/мл. Дихолинсукцинат – доказанный в доклинических исследованиях нейрональный инсулин-сенситайзер, повышающий чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к низким субоптимальным концентрациям инсулина. Результаты I фазы клинических исследований показали, что Дирекорд имеет хороший профиль безопасности у здоровых волонтеров.

Ишемический инсульт сопровождается постинсультной инсулиновой резистентностью, которая ассоциируется с неблагоприятным клиническим исходом, а также повышенным риском повторных инсультов и смерти в течение ближайшего после инсульта года [7, 8, 9, 10]. Поэтому использование средств, улучшающих чувствительность нейронов к инсулину, может представлять новый подход к терапии ишемического инсульта в восстановительном периоде.

Цель исследования – подобрать оптимальную дозировку и изучить эффективность, безопасность и переносимость лекарственного препарата Дирекорд, раствор для внутримышечного введения, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде.

Проведение исследования

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 было проведено с 12.11.2018 по 15.06.2019 г. в трех клинических центрах, одобренных

Минздравом РФ: государственном учреждении здравоохранения «Саратовская городская клиническая больница № 9» (ГУЗ СГКБ №9) г. Саратов, государственном учреждении здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница №8» (ГУЗ ЯО «КБ № 2») г. Ярославль и государственном бюджетном учреждении здравоохранения Тверской области «Областной клинический лечебно-реабилитационный центр» (ГБУЗ «ОКЛРЦ»). Клиническое исследование II фазы проводили в соответствии с утвержденным протоколом и этическими принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, международными принципами Надлежащей Клинической Практики (ICH GCP), и регламентировалось действующим законодательством РФ: Конституция РФ; Федеральный закон от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации"; Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» от 27.09.2005 г. N 232-ст); Постановление Правительства РФ от 13.09.2010 г. № 714 «Об утверждении типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата»; Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики»; Приказ Росздравнадзора № 1071 от 15.02.2017 г. «Об утверждении порядка осуществления фармаконадзора»; Приказ Минпромторга РФ от 14.06.2013 N 916 (ред. от 18.12.2015) "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики"; Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (Решение ЕАЭС от 03.11.2016 г. № 78); Правила надлежащей клинической практики ЕАЭС (Решение ЕАЭС от 03.11.2016 г. № 79); Решение ЕАЭС №87 об утверждении правил фармаконадзора; Постановление Правительства РФ от 18.05.2011 N 393 "О внесении изменений в Типовые правила обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата"; Разрешение № 14 от 17.01.2018 г., на проведение клинического исследования,

выданное Минздравом РФ. Протокол исследования, Брошюра исследователя, Информационный листок пациента с формой информированного согласия на участие в исследовании и образец Индивидуальной регистрационной карты были одобрены Советом по этике и локальными этическими комитетами медицинских организаций. Всем добровольцам в ходе разъяснительной беседы и в письменной форме была предоставлена исчерпывающая информация, касающаяся всех аспектов проводимого исследования.

Критерии отбора

В исследовании участвовали 132 пациента, мужчины и женщины в возрасте от 45 до 80 лет включительно, после первого ишемического инсульта в каротидной системе, подтвержденного компьютерной или магнитно-резонансной томографией, с давностью инсульта не менее 3 недель и не более 2 месяцев от момента появления неврологической симптоматики, с оценкой по шкале тяжести инсульта NIHSS от 3 до 8 баллов включительно, оценкой по шкале когнитивных функций MoCA менее 24 баллов, при наличии письменного информированного согласия, подписанного пациентом или его законным представителем, а также готовые и способные к заполнению необходимых шкал и выполнению графика посещений. Критериями невключения были геморрагический инсульт, тотальная афазия, наличие возникших до инсульта сопутствующих заболеваний, таких как значимое ограничение двигательной активности, психические заболевания, деменция; неврологические заболевания, такие как, эпилепсия, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз; декомпенсированный сахарный диабет, алкоголизм, наркотическая зависимость, злоупотребление психоактивными веществами в анамнезе, почечная недостаточность, тяжелая печеночная недостаточность или аномальные значения лабораторных показателей на скрининге, тяжелые сердечно-сосудистые или церебро-сосудистые заболевания в анамнезе, системное инфекционное заболевание, неконтролируемая артериальная гипертензия с высокими показателями артериального давления выше 220/110 мм рт. ст.. Кроме того, в исследование не включались женщины с сохраненным потенциалом

деторождения; лица с известной гиперчувствительностью к любому из компонентов препарата; а также лица, принимавшие участие в исследовании любого экспериментального или зарегистрированного лекарственного препарата, изделия медицинского назначения или биологического агента в течение 1 месяца до момента включения.

Оценка эффективности

Первичной конечной точкой эффективности была выбрана доля пациентов, ответивших на проводимую терапию. Ответом на терапию считается улучшение функционального состояния, когнитивных функций и неврологического статуса пациентов: как минимум двукратное снижение общего счета по шкале тяжести инсульта NIHSS, общий счет по шкале Бартел ≥ 95 , общий счет по шкале MoCA ≥ 26 .

Оценка безопасности.

Безопасность терапии оценивалась по частоте нежелательных явлений (НЯ); динамике жизненно важных показателей; динамике лабораторных параметров; ЭКГ в 12 отведениях и данным физикального осмотра.

План исследования

Пациенты, прошедшие стадию скрининга и подписавшие информированное согласие, были рандомизированы в три группы по 44 пациента и получали Дирекорд внутримышечно по 200 мг (2 мл) 2 раза в день в течение 14 дней (группа 1); Дирекорд внутримышечно по 200 мг (2 мл) 3 раза в день в течение 14 дней (группа 2); или Плацебо внутримышечно по 200 мг (2 мл) 3 раза в день в течение 14 дней (группа 3). Чтобы соблюсти маскировку, пациенты группы 1 дополнительно получали одну инъекцию плацебо в день. План исследования представлен на Рисунке В1.

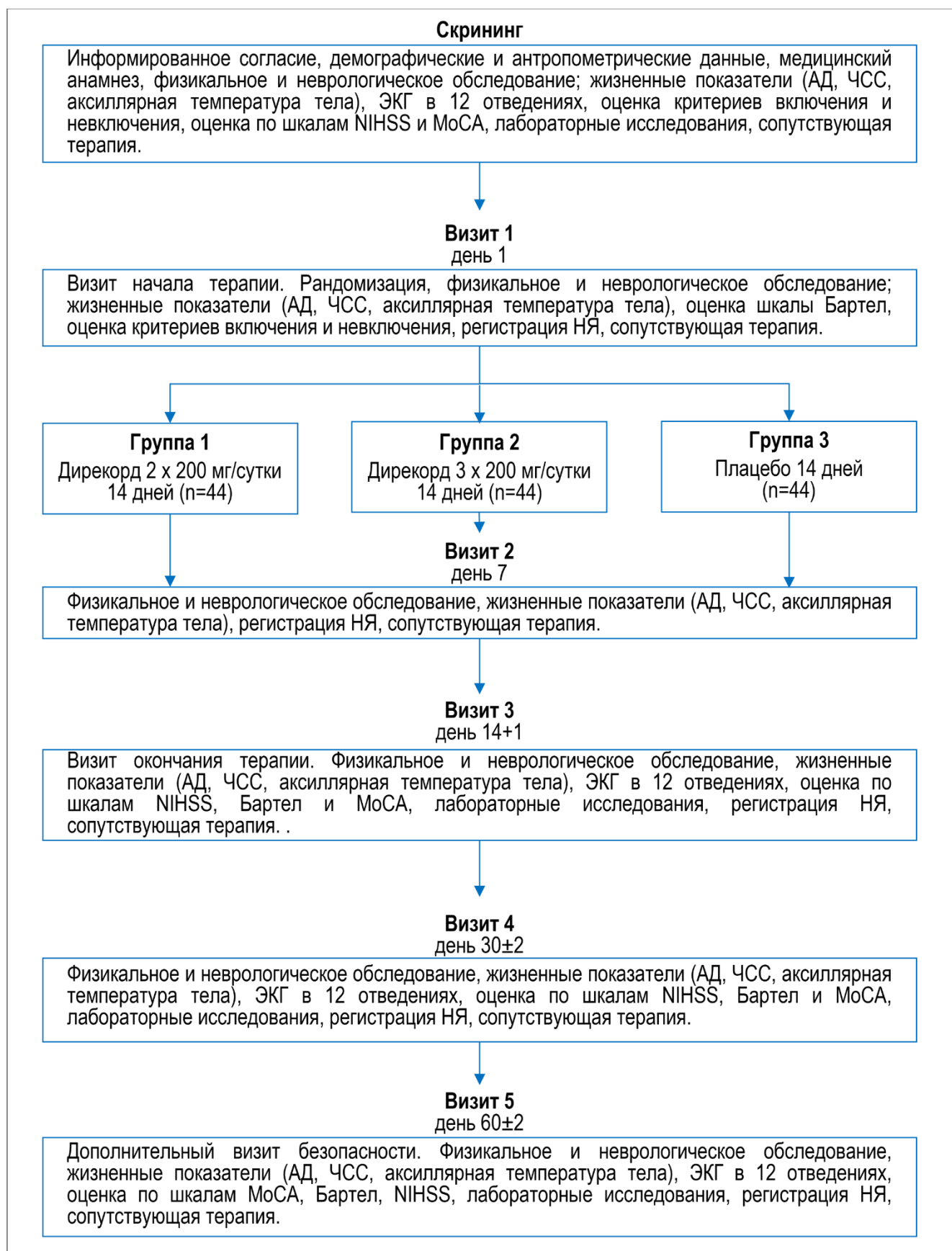


Рисунок В1 - План исследования.

Статистический анализ

Выборочные параметры, приводимые в таблицах, имеют следующие обозначения: M – среднее, s – стандартное отклонение, n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Критерии Шапиро-Уилка либо Колмогорова-Смирнова применялись для выбора параметрических или непараметрических методов анализа. При оценке эффективности терапии первичная точка анализировалась с помощью точного критерия Фишера на основе статистической гипотезы, что терапия с применением исследуемого препарата не превосходит по эффективности терапию плацебо. Показатели безопасности, а также их изменения представлены с помощью описательной статистики по визитам и терапевтическим группам. Сравнение по визитам между группами проводилось на основе критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера. Средние значения количественных показателей безопасности (жизненные показатели, результаты общего и биохимического анализа крови), а также их средние изменения по сравнению с исходными значениями сравнивались между группами с помощью однофакторного анализа ANOVA с терапией в качестве фактора. Динамика количественных показателей безопасности относительно исходных значений оценивалась и сравнивалась для препарата исследования и плацебо с помощью дисперсионного анализа ANOVA с повторяющимися измерениями. Критический уровень значимости принимался равным 5%. Статистический анализ проводился при помощи статистического пакета R 3.4.

Результаты

Исходные демографические и антропометрические характеристики пациентов суммированы в Таблице В1. Критерий χ^2 не выявил статистически значимых различий между группами по распределению мужчин и женщин ($p > 0,05$). Дисперсионный анализ ANOVA с терапией в качестве фактора не выявил статистически значимых различий между терапевтическими группами ($p > 0,05$) ни по одному из следующих показателей: возраст, масса тела, рост и индекс массы тела

(ИМТ). Сопутствующую терапию получали 100% пациентов во всех трех терапевтических группах.

Таблица В1 - Исходные характеристики пациентов.

Показатель	Группы		
	Дирекорд 2х200	Дирекорд 3х200	Плацебо
Женщины / мужчины	26 / 18	20 / 14	18 / 26
Возраст, годы (M ± s)	66,52 ± 7,12	62,82 ± 8,27	63,70 ± 8,32
Масса тела, кг (M ± s)	76,90 ± 11,11	77,99 ± 10,12	78,84 ± 12,38
Рост, м (M ± s)	1,65 ± 0,07	1,70 ± 0,07	1,69 ± 0,06
Индекс массы тела, кг/м ² (M ± s)	28,16 ± 4,24	27,14 ± 3,99	27,60 ± 4,37

Анализ первичной конечной точки эффективности осуществлялся сразу после окончания терапии (визит 3) и через 2 недели после ее окончания (визит 4). На визите 3 ни один пациент ни в одной из исследуемых групп не ответил на терапию, исходя из заданных критериев ответа. Однако, на визите 4 было зафиксировано, что в группе 1 (Дирекорд 2х200 мг/сутки) на терапию ответили 15 (34,1%) пациентов, в группе 2 (Дирекорд 3х200 мг/сутки) – 19 (43,2%), и в группе 3 (Плацебо) – 8 (18,2%) пациентов (Рисунок В2; Таблица В2).

Точный критерий Фишера выявил статистически значимое отличие между группами ($p=0,036$). Таким образом, отвергается нулевая гипотеза о том, что Дирекорд не превосходит по эффективности плацебо в лечении пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде.

Таблица В2 - Распределение пациентов, ответивших на терапию, на визите 4.

Показатель	Результат	Группы					
		Дирекорд 2х200 мг/сутки		Дирекорд 3х200 мг/сутки		Плацебо	
		n	%	n	%	n	%
Пациент ответил на проводимую терапию	Нет	29	65,9	25	56,8	36	81,8
	Да	15	34,1	19	43,2	8	18,2

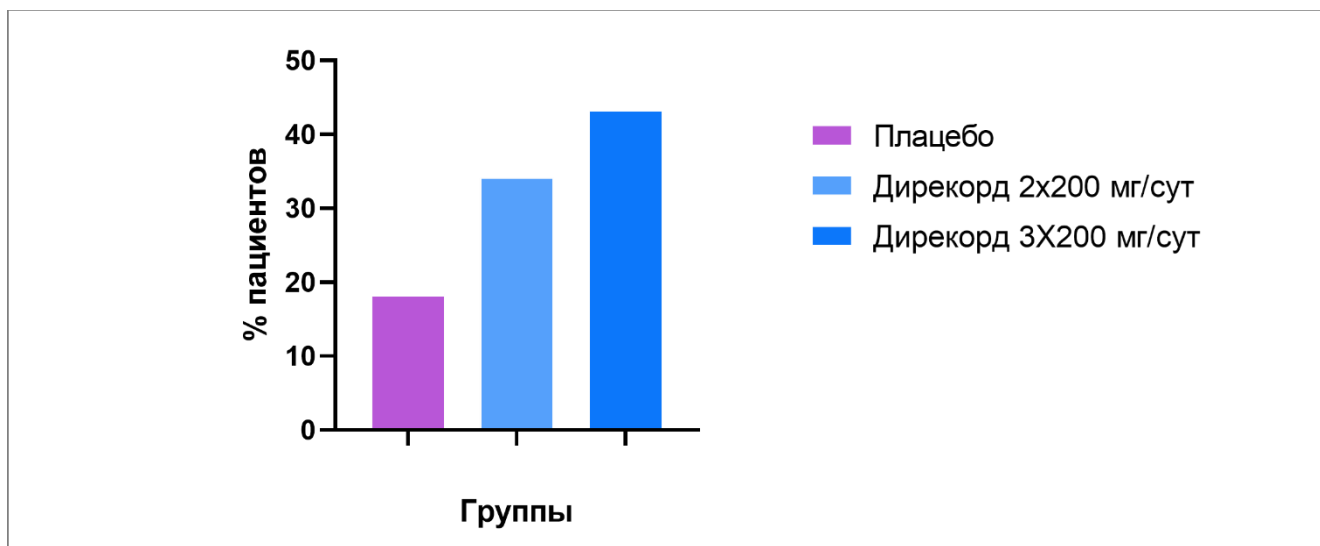


Рисунок В2 - Процент пациентов, ответивших на терапию на визите 4.

Наибольшее количество пациентов, ответивших на терапию, было выявлено в группе тех, кто получал Дирекорд в дозе 600 мг/сутки, на 25% больше, чем в группе пациентов, получавших плацебо. Данный результат позволяет утверждать, что препарат Дирекорд статистически и клинически значительно превосходит плацебо при лечении ишемического инсульта в каротидной системе в раннем восстановительном периоде.

В исследовании было отмечено 6 НЯ у 6 (13,6%) пациентов в группе 1 (Дирекорд 2x200 мг/сутки), 3 НЯ у 3 (6,8%) пациентов в группе 2 (Дирекорд 3x200 мг/сутки) и 5 НЯ у 5 (11,4%) пациентов в группе плацебо. Статистически значимой разницы между группами не выявлено ($p=0,682$, точный критерий Фишера). Все нежелательные явления, возникшие у пациентов в ходе исследования, были легкой степени тяжести и завершились к моменту окончания исследования. Ни одно из НЯ не потребовало отмены исследуемых препаратов или изменения режима терапии. В группе 1 были зарегистрированы следующие НЯ: боль в животе – 2 (4,5%), гипертонический криз – 2 (4,5%), ОРВИ – 1 (2,3%), острый ринит – 1 (2,3%). В группе 2 были зарегистрированы следующие НЯ: анемия – 1 (2,3%), головная боль – 2 (4,5%). В группе 3 были зарегистрированы следующие НЯ: боль при введении препарата – 1 (2,3%), головная боль – 1 (2,3%), головокружение – 1 (2,3%), острый ринит – 1 (2,3%), повышение артериального давления – 1 (2,3%).

Случаев смерти в ходе исследования не было.

Серьезных нежелательных явлений в ходе исследования не было.

Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с терапией в качестве фактора не выявил статистически значимых различий средних изменений показателей как общего анализа крови, так и биохимического анализа крови между группами ($p > 0,05$).

Точный критерий Фишера показал, что распределение оценок норма/отклонения для значений показателей общего анализа крови и анализа мочи по визитам не отличалось статистически значимо между группами ($p > 0,05$).

Дисперсионный анализ ANOVA показал статистически значимое снижение средних значений систолического ($p < 0,001$) и диастолического ($p < 0,001$) артериального давления в ходе исследования, сходное для всех трех терапевтических групп ($p > 0,05$). Для показателя частота сердечных сокращений (ЧСС) дисперсионный анализ ANOVA не показал статистически значимых отличий между группами ($p > 0,05$). Для показателя температура тела дисперсионный анализ ANOVA показал наличие статистически значимой динамики (повышение) средних значений ($p = 0,004$), сходной во всех трех терапевтических группах ($p > 0,05$).

Распределение оценок норма/незначимые/значимые изменения результатов ЭКГ в 12 отведениях анализировалось при помощи точного критерия Фишера. Ни на одном из визитов не выявлено статистически значимых различий в распределении оценок между группами ($p > 0,05$).

Распределение оценок норма/отклонения результатов физикального осмотра анализировалось при помощи точного критерия Фишера. Ни для одной из систем не выявлено статистически значимых различий в распределении оценок между группами в ходе исследования ($p > 0,05$).

Проведенный комплексный анализ позволяет сделать вывод о том, что профиль безопасности исследуемого препарата при использовании в различных режимах терапии не отличается от такового для плацебо.

Выводы

1. Результаты рандомизированного, двойного слепого, плацебо-контролируемого, с параллельными группами, проспективного исследования II фазы по подбору оптимальной дозировки и изучению эффективности, безопасности и переносимости лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, позволяют утверждать, что препарат статистически и клинически значимо превосходит плацебо при двухнедельной внутримышечной терапии в дозе 600 мг/сутки у пациентов с ишемическим инсультом в каротидной системе в раннем восстановительном периоде.

2. Профиль безопасности препарата Дирекорд при использовании в различных режимах терапии не отличается от такового для плацебо.

3. Предполагается, что исследование III фазы с достаточной статистической мощностью позволит подтвердить полученные в данном исследовании предварительные результаты.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(справочное)

Клиническое исследование III фазы лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде

Введение

Дирекорд – оригинальный препарат, содержащий в качестве действующего вещества дихолинсукцинат, 100 мг/мл. Дихолинсукцинат – нейрональный инсулин-сенситайзер, повышающий чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к низким субоптимальным концентрациям инсулина.

Ишемический инсульт сопровождается постинсультной инсулиновой резистентностью – сниженным биологическим ответом на эндогенный инсулин. Статистически значимая положительная корреляция между индексом инсулиновой резистентности HOMA-IR и значениями шкалы тяжести инсульта NIHSS наблюдалась у пациентов без диабета, перенесших ишемический инсульт, причем пациенты с особо высокими значениями HOMA-IR (четвертый квартиль в исследуемой популяции) имели риск неблагоприятного клинического исхода на 429% выше, чем с низкими значениями HOMA-IR (первый квартиль) [7]. В трех исследованиях с общим числом участников 6341 пациенты с высокими значениями HOMA-IR в остром постинсультном периоде имели трудности с реабилитацией, повышенный риск неблагоприятного функционального исхода в будущем (3 мес. и 7 лет), а также повышенный риск повторного инсульта и смерти в течение года [8, 9, 10]. Поэтому разработка средств, улучшающих чувствительность к инсулину в постинсультном периоде, является новым обоснованным подходом к лечению ишемического инсульта.

Результаты второй фазы клинических исследований показали эффективность и безопасность препарата Дирекорд в улучшении неврологических и

функциональных показателей у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде.

Цель исследования – подтвердить превосходящую эффективность, а также безопасность препарата Дирекорд в сравнении с плацебо.

Проведение исследования

Многоцентровое рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности препарата Дирекорд в параллельных группах с вводным периодом, периодом рандомизированного лечения и продолженного наблюдения проведено с 19.02.2022 по 05.12.2022 г. в двух клинических центрах, одобренных Минздравом РФ: государственном бюджетном учреждении здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница №2» (ГБУЗ ЯО «КБ № 2») г. Ярославль и государственном бюджетном учреждении здравоохранения Ленинградской области «Всеволожская клиническая межрайонная больница» (ГБУЗ ЛО «Всеволожская КМБ») Клиническое исследование III фазы проводили в соответствии с утвержденным протоколом и этическими принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, международными принципами Надлежащей Клинической Практики (ICH GCP), и регламентировалось действующим законодательством РФ: Конституция РФ; Федеральный закон от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации"; Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» от 27.09.2005 г. N 232-ст); Постановление Правительства РФ от 13.09.2010 г. № 714 «Об утверждении типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата»; Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики»; Приказ Росздравнадзора № 1071 от 15.02.2017 г. «Об утверждении порядка осуществления фармаконадзора»; Приказ Минпромторга РФ от 14.06.2013 N 916 (ред. от 18.12.2015) "Об утверждении

Правил надлежащей производственной практики"; Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (Решение ЕАЭС от 03.11.2016 г. № 78); Правила надлежащей клинической практики ЕАЭС (Решение ЕАЭС от 03.11.2016 г. № 79); Решение ЕАЭС №87 об утверждении правил фармаконадзора; Постановление Правительства РФ от 18.05.2011 N 393 "О внесении изменений в Типовые правила обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата"; Разрешение № 290 от 09.06.2021 г. на проведение клинического исследования, выданное Минздравом РФ. Протокол исследования, Брошюра исследователя, Информационный листок пациента с формой информированного согласия на участие в исследовании и образец Индивидуальной регистрационной карты были одобрены Советом по этике и локальными этическими комитетами медицинских организаций. Всем добровольцам в ходе разъяснительной беседы и в письменной форме была предоставлена исчерпывающая информация, касающаяся всех аспектов проводимого исследования.

Критерии отбора

В исследовании участвовали 160 пациентов, мужчины и женщины в возрасте от 45 до 80 лет включительно, после первого ишемического инсульта в каротидной системе, подтвержденного компьютерной или магнитно-резонансной томографией, с давностью инсульта не менее 3 недель и не более 2 месяцев от момента появления неврологической симптоматики, с оценкой по шкале тяжести инсульта NIHSS от 3 до 8 баллов включительно, оценкой по шкале когнитивных функций MoCA менее 24 баллов, при наличии письменного информированного согласия, подписанного пациентом или его законным представителем, а также готовые и способные к заполнению необходимых шкал и выполнению графика посещений. Критериями невключения были геморрагический инсульт, тотальная афазия, наличие возникших до инсульта сопутствующих заболеваний, таких как значимое ограничение двигательной активности, психические заболевания, деменция; неврологические заболевания, такие как, эпилепсия, болезнь Паркинсона,

рассеянный склероз; декомпенсированный сахарный диабет, алкоголизм, наркотическая зависимость, злоупотребление психоактивными веществами в анамнезе, почечная недостаточность, тяжелая печеночная недостаточность или аномальные значения лабораторных показателей на скрининге, тяжелые сердечно-сосудистые или церебро-сосудистые заболевания в анамнезе, системное инфекционное заболевание, неконтролируемая артериальная гипертензия с высокими показателями артериального давления (АД выше 220/110 мм рт. ст.). Кроме того в исследование не включались женщины с сохраненным потенциалом деторождения; лица с известной гиперчувствительностью к любому из компонентов препарата; лица постоянно принимавшие ноотропные, метаболические и другие антиоксидантные лекарственные средства или биологически активные добавки в течение 30 дней до включения в исследование; лица принимавшие участие в исследовании любого экспериментального или зарегистрированного лекарственного препарата, изделия медицинского назначения или биологического агента в течение 1 месяца до момента включения. Критериями исключения из исследования были отзыв согласия на лечение исследуемыми препаратами; регистрация обстоятельств, описанных как критерии невключения; серьезное отклонение от протокола; серьезные нежелательные явления или сопутствующие заболевания, которые требуют прекращения исследования; несоблюдение инструкций, данных исследователем, если это вызывает риск для пациента.

План исследования

Пациенты, прошедшие стадию скрининга и подписавшие информированное согласие, были рандомизированы в две группы по 80 пациентов и получали Дирекорд внутримышечно по 200 мг (2 мл) 3 раза в день или плацебо внутримышечно по 200 мг (2 мл) 3 раза в день в течение 14 дней (Рисунок Г1).

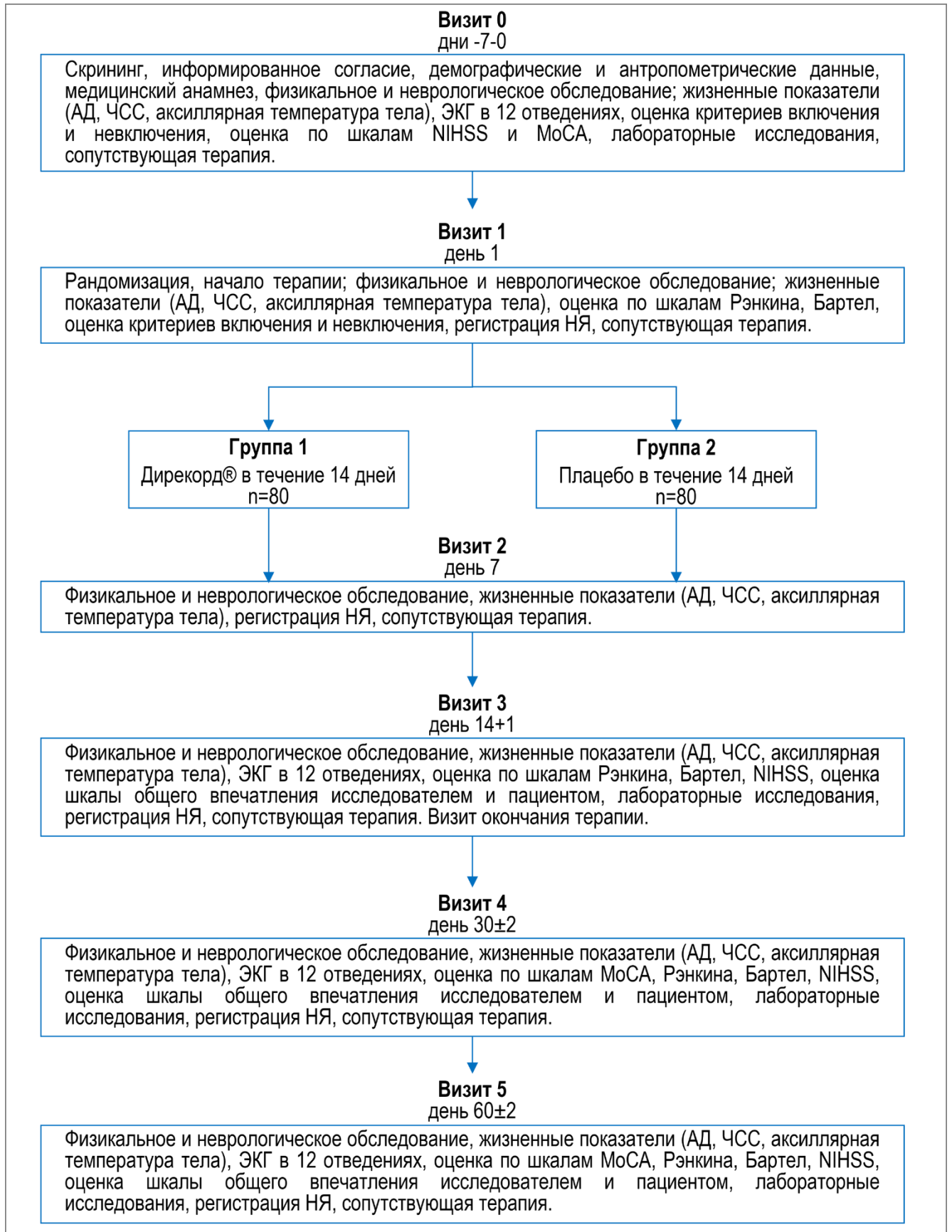


Рисунок Г1 - План исследования.

Исследуемый препарат

В исследовании использован оригинальный препарат Дирекорд производства ООО «Эллара» (Россия), раствор для внутримышечного введения, действующее вещество дихолинсукцинат, 100 мг/мл. Химическое наименование: N-(2-гидроксиэтил)-N, N, N – триметиламмония сукцинат (2:1).

Оценка безопасности

Безопасность терапии оценивалась по частоте нежелательных явлений (НЯ); динамике жизненно важных показателей; динамике лабораторных параметров; ЭКГ; по результатам физикального обследования и по частоте прекращения терапии.

Оценка эффективности.

Первичной конечной точкой была выбрана доля пациентов, ответивших на проводимую терапию на визите 4. Ответом на терапию считается улучшение функционального состояния, когнитивных функций и неврологического статуса пациентов: как минимум двукратное снижение общего счета по шкале тяжести инсульта NIHSS, общий счет по шкале Бартел ≥ 95 , общий счет по шкале MoCA ≥ 26 .

Вторичные конечные точки включали оценку динамики неврологического дефицита по шкале NIHSS (визиты 3, 4 и 5); оценку динамика нарушения жизнедеятельности по шкале Рэнкина (визиты 3, 4 и 5); оценку уровня социальной адаптации и качества жизни пациента по индексу функциональной активности Бартел (визиты 3, 4 и 5); оценку краткой Монреальской шкалы когнитивных функций (MoCA) (визиты 4 и 5); оценку исследователем по шкале общего клинического впечатления CGI-I (Clinical Global Impression – Improvement scale), (визиты 3, 4 и 5); оценку пациентом по шкале общего клинического впечатления пациента PGI-I (Patient Global Impression of Improvement) (визиты 3, 4 и 5).

Статистический анализ

Выборочные параметры, приводимые в таблицах, имеют следующие обозначения: M – среднее, s – стандартное отклонение, n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Критерий Шапиро-Уилка либо Колмогорова-Смирнова применялись для выбора параметрических или непараметрических методов анализа. При оценке эффективности терапии первичная точка анализировалась на основе статистической гипотезы, что терапия с применением исследуемого препарата не превосходит по эффективности терапию плацебо с помощью точного критерия Фишера. Сравнение по визитам между группами проводилось на основе критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера. Результаты всех вторичных показателей анализировались с помощью дисперсионного анализа ANOVA с повторяющимися измерениями с апостериорным тестом по методу Холма для множественных сравнений между группами. Критический уровень значимости принимался равным 5%. Статистический анализ проводился при помощи статистического пакета R 3.4.

Результаты

Исходные характеристики пациентов суммированы в Таблице Г1.

Таблица Г1 - Исходные характеристики пациентов.

Показатель	Группы	
	Дирекорд	Плацебо
Женщины / мужчины	28 / 52	34 / 46
Возраст, годы ($M \pm s$)	64,20 \pm 8,56	62,29 \pm 8,31
Масса тела, кг ($M \pm s$)	79,61 \pm 11,21	80,97 \pm 10,85
Рост, м ($M \pm s$)	1,71 \pm 0,08	1,71 \pm 0,08
Индекс массы тела, кг/м ² ($M \pm s$)	27,08 \pm 3,16	27,68 \pm 3,72

Критерий χ^2 не выявил статистически значимых различий между группами по распределению мужчин и женщин ($p > 0,05$). Дисперсионный анализ ANOVA не выявил статистически значимых различий между терапевтическими группами ($p > 0,05$) ни по одному из следующих показателей: возраст, масса тела, рост и индекс массы тела (ИМТ). Сопутствующую терапию получали 80 (100%) пациентов группы исследуемого препарата и 80 (100%) пациентов группы

препарата сравнения. После сбора анамнеза перенесённых и настоящих заболеваний пациента ни для одной из систем органов не зарегистрировано статистически значимых различий между группами с помощью точного критерия Фишера ($p > 0,05$).

Анализ первичной конечной точки эффективности показал, что в группе исследуемого препарата на терапию ответили 19 (23,7%) пациентов, а в группе плацебо 7 (8,7%) пациентов (Рисунок Г2; Таблица Г2).

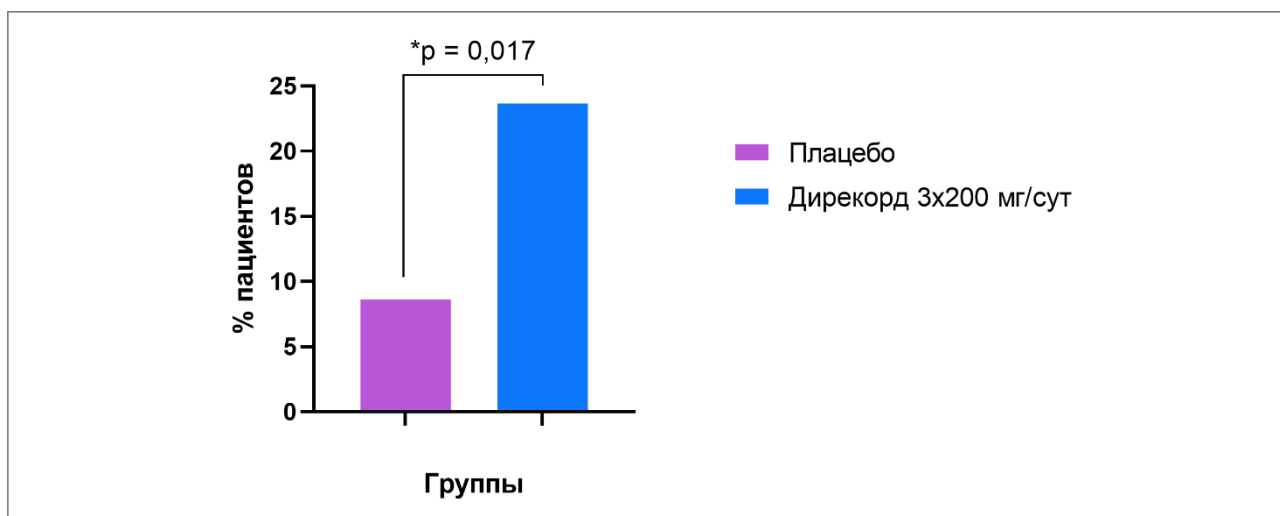


Рисунок Г2 - Процент пациентов, ответивших на терапию.

Однократное сравнение долей пациентов, ответивших на терапию, для двух групп с помощью точного критерия Фишера выявило статистически значимые различия ($p = 0,017$). Таким образом, отвергается нулевая гипотеза о том, что терапия с применением исследуемого препарата не превосходит по эффективности терапию плацебо.

Таблица Г2 - Распределение долей пациентов, ответивших на проводимую терапию препаратом Дирекорд.

Показатель	Результат	Группы			
		Дирекорд		Плацебо	
		n	%	n	%
Пациент ответил на проводимую терапию	Нет	61	76,3%	73	91,3%
	Да	19	23,7%	7	8,7%

При анализе вторичных конечных точек эффективности двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил

статистически значимое снижение средних значений оценок по шкале NIHSS от визита к визиту ($F = 99,50$; $p < 0,0001$) при статистически значимом большем снижении в группе исследуемого препарата ($p = 0,004$) по сравнению с плацебо. Среднее снижение оценок по шкале NIHSS к концу терапии составило $-2,45 \pm 1,42$ и $-1,60 \pm 1,32$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо, соответственно (Рисунок Г3).

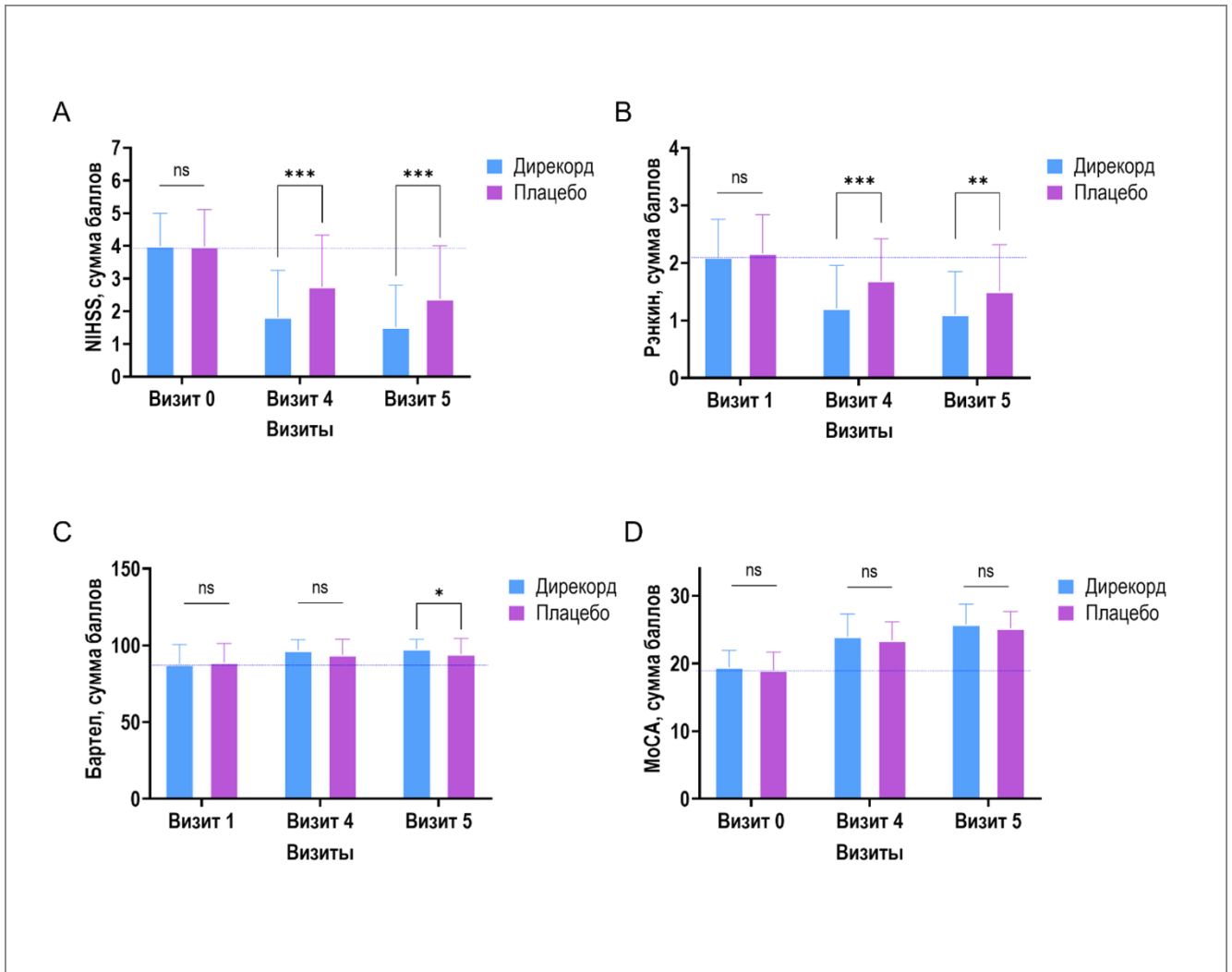


Рисунок Г3 - Оценки по шкалам А) NIHSS, В) Рэнкина, С) Бартел и D) MoCA по визитам и терапевтическим группам. Результаты представлены как $M \pm s$; ns – $p > 0,05$; * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,0001$ по сравнению с Плацебо.

Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое снижение оценок по шкале Рэнкина от визита к визиту ($F = 58,04$; $p < 0,0001$) и статистически значимое большее снижение в группе исследуемого препарата ($p = 0,0357$) по сравнению с плацебо.

Среднее снижение оценок по шкале Рэнкина к концу терапии составило $-0,99 \pm 0,81$ и $-0,66 \pm 0,84$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо, соответственно. Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое увеличение оценок индекса Бартел от визита к визиту ($F = 27,33$; $p < 0,0001$) и тренд к большему повышению значений индекса в группе исследуемого препарата ($p = 0,077$) по сравнению с плацебо. Среднее повышение оценок по шкале Бартел к концу терапии составило $9,94 \pm 11,69$ и $5,31 \pm 9,26$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо, соответственно. Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое увеличение оценок по шкале MoCA от визита к визиту ($F = 210,52$; $p < 0,0001$), но не выявил различий между группами по фактору терапии ($p = 0,974$). Среднее повышение оценок к концу терапии составило $6,36 \pm 2,78$ и $6,24 \pm 2,79$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо, соответственно.

Таблица Г3 показывает распределение оценок исследователем (CGI-I) и пациентами (PGI-I) по шкале общего клинического впечатления.

Таблица Г3 - Распределение оценок исследователем (CGI-I) и пациентами (PGI-I) по шкале общего клинического впечатления по визитам и терапевтическим группам.

Группа	Результат	Визит 3		Визит 4		Визит 5	
		CGI-I	PGI-I	CGI-I	PGI-I	CGI-I	PGI-I
Дирекорд	Выраженное улучшение	19	20	34	34	36	35
	Умеренное улучшение	37	31	32	28	20	20
	Легкое улучшение	21	27	12	14	18	17
	Нет изменений	3	2	2	4	6	8
	Легкое ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Умеренное ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Выраженное ухудшение	0	0	0	0	0	0
Плацебо	Выраженное улучшение	7	8	8	12	13	18
	Умеренное улучшение	23	18	30	24	31	23
	Легкое улучшение	28	27	27	20	22	18

	Нет изменений	22	27	15	24	14	21
	Легкое ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Умеренное ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Выраженное ухудшение	0	0	0	0	0	0
	p (между группами)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,009

Точный критерий Фишера выявил статистически значимое отличие между группами по распределению оценок как исследователем (CGI-I), так и пациентами (PGI-I) на каждом из визитов по соответствующим шкалам общего клинического впечатления.

Всего в исследовании было отмечено 3 НЯ у 3 (3.75%) пациентов в группе исследуемого препарата 6 НЯ у 6 (7.5%) пациентов в группе плацебо (Таблица Д4). Анализ с использованием точного критерия Фишера не выявил статистически значимой разницы между группами ($p = 0,495$). Случаев смерти зарегистрировано не было.

Таблица Г4 - Число и доля пациентов с НЯ в терапевтических группах.

НЯ	Группы					
	Дирекорд		Плацебо		Всего	
	n	%	n	%	n	%
Нет	77	96,25	74	92,50	151	94,37
Есть	3	3,75	6	7,50	9	5,63

В группе исследуемого препарата были зарегистрированы следующие НЯ: местная реакция – 1 (1,25%), острое респираторное заболевание – 1 (1,25%) и цефалгия – 1 (1,25%). В группе плацебо были зарегистрированы следующие НЯ: боль в левом плечевом суставе – 1 (1,25%), головокружение – 1 (1,25%), местная реакция – 1 (1,25%), нарушение сна – 1 (1,25%), ОРВИ – 1 (1,25%) и цефалгия – 1 (1,25%).

Анализ лабораторных показателей не выявил различий между терапевтическими группами. Средние изменения показателей общего анализа крови и биохимического анализа крови за 14 и 30 дней исследования анализировали однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с терапией в качестве фактора. Анализ не выявил статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$).

Точный критерий Фишера показал, что распределение оценок норма/отклонения для значений показателей анализа мочи по визитам не отличалось статистически значимо между группами ($p > 0,05$).

Анализ жизненных показателей не выявил различий между терапевтическими группами. Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое снижение систолического ($p < 0,0001$) и диастолического давления в ходе исследования ($p = 0,001$), но не различия между группами по фактору терапии ($p > 0,05$). ANOVA не выявил статистически значимых изменений частоты сердечных сокращений (ЧСС) в ходе исследования ($p > 0,05$) и значимых отличий между группами ($p > 0,05$). Точный критерий Фишера не выявил ни на одном из визитов значимых различий в распределении оценок норма/незначимые изменения результатов ЭКГ в 12 отведениях между группами ($p > 0,05$).

Распределение оценок норма/незначимые изменения/значимые изменения по результатам физикального осмотра и неврологического обследования анализировалось при помощи точного критерия Фишера. Анализ выявил статистически значимое отличие между группами только на визите 3 ($p = 0,022$), когда в группе препарата на 10% увеличилось число пациентов с оценкой норма против 1,25% в группе плацебо, но не остальных визитах ($p > 0,05$).

Обсуждение

Временные периоды после возникновения ишемического инсульта включают острейший, острый, ранний восстановительный и поздний восстановительный периоды. Гибель вещества мозга в острейшей фазе происходит в первые часы после инсульта из-за начальной потери кровотока и массового выброса глутамата в эксайтотоксических концентрациях. Глутамат вызывает гиперактивацию ионотропных NMDA рецепторов, что ведет к массовому и необратимому входу ионов Ca^{2+} в нейрон, так называемой кальциевой дерегуляции, за чем следует деполяризация митохондрий, нарушение синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), окислительный стресс и, в результате, прогрессирующая гибель нейронов [204].

Глутаматная эксайтотоксичность вызывает острую нейрональную инсулиновую резистентность, снижая активность инсулиновых рецепторов и нижележащих киназ каскада инсулиновой сигнализации, таких как Akt, mTOR и GSK-3 β (см. главу 3). Постинсультная инсулиновая резистентность снижает способность мозга к восстановлению, что предопределяет плохой неврологический и функциональный клинический результат в будущем [7, 8, 9, 10]. Поэтому использование препарата Дирекорд, содержащего нейрональный инсулин-сенситайзер дихолинсукцинат в качестве действующего вещества, в лечении ишемического инсульта является обоснованным с точки зрения текущих представлений о молекулярных механизмах инсульта в восстановительном периоде.

Выбор периода от 3-х недель до 2-х месяцев после инсульта для исследования эффективности препарата Дирекорд обусловлен тем, что этот период совпадает с периодом максимальной спонтанной нейропластичности мозга после инсульта, когда происходит самопроизвольное восстановление функций мозга через реорганизацию нейрональных сетей и усиление процессов нейрогенеза и синаптогенеза, и именно в этот период можно достичь максимального восстановления функций. По окончании этого 3-месячного периода мозг в основном теряет способность к самопроизвольному восстановлению, и реабилитация пациентов требует огромных усилий [230].

В настоящем исследовании III фазы было показано, что препарат Дирекорд, содержащий нейрональный инсулин-сенситайзер дихолинсукцинат в качестве действующего вещества, эффективен для лечения ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде. При внутримышечном введении в дозе 600 мг в сутки препарат статистически значимо снижал неврологический дефицит по шкале NIHSS, снижал нарушения жизнедеятельности по шкале Рэнкина, повышал уровень социальной адаптации и качества жизни пациента по индексу функциональной активности Бартел. Препарат также существенно повышал когнитивные функции по шкале MoCA, но уровня статистически значимого отличия от плацебо достигнуто не было из-за быстрого прогресса этого показателя

в обеих группах в раннем восстановительном периоде. Директор статистически значимо превосходил плацебо по шкале общего клинического впечатления пациента (PGI-I) и исследователя (CGI-I).

Исследуемый препарат имеет высокий профиль безопасности при лечении ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде. В ходе исследования было отмечено 9 НЯ, из них 3 НЯ (3.75%) в группе исследуемого препарата и 6 НЯ (7.5%) в группе плацебо при отсутствии статистически значимой разницы между группами. Все нежелательные явления, возникшие у пациентов в ходе исследования, были легкой степени тяжести и завершились к моменту окончания исследования. Ни одно из НЯ не потребовало отмены исследуемых препаратов или изменения режима терапии. Случаев смерти зарегистрировано не было. Анализ лабораторных показателей и жизненных показателей не выявил различий между терапевтическими группами.

Ранее, эффективность инсулин-сенситайзеров метформина и пиоглитазона была продемонстрирована в профилактике ишемического инсульта. Большое клиническое исследование (n=1919) показало, что применение метформина до инсульта снижало тяжесть инсульта при поступлении по шкале NIHSS, нарушение жизнедеятельности по шкале Рэнкина и снижало смертность пациентов по сравнению с контролем [283]. Мета-анализ 2017 г. показал, что в популяции, включавшей пациентов с инсулиновой резистентностью, пре-диабетом и диабетом 2 типа (n=4980) применение пиоглитазона значимо снижало риск повторного инсульта [287]. Пиоглитазон снижал риск повторного инсульта у пациентов с пре-диабетом (n=2885) [288], а также снижал риск транзиторной ишемической атаки и повторного инсульта у пациентов без диабета (n=3876) с выраженной инсулиновой резистентностью и историей ишемического инсульта [289]. Однако, эффективность антидиабетических препаратов в лечении ишемического инсульта не была показана в рандомизированных клинических испытаниях.

В целом, настоящее исследование показывает, что применение нейрональных инсулин-сенситайзеров, в частности дихолинсукцината, в раннем

восстановительном периоде может стать новым перспективным подходом к улучшению неврологических и функциональных показателей у пациентов, перенесших ишемический инсульт.

Выводы

1. Результаты многоцентрового рандомизированного двойного слепого, плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования III фазы эффективности и безопасности лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество дихолинсукцинат, позволяют утверждать, что препарат статистически и клинически значимо превосходит плацебо при двухнедельной внутримышечной терапии в дозе 600 мг/сутки у пациентов с ишемическим инсультом в каротидной системе в раннем восстановительном периоде.

2. Профиль безопасности препарата Дирекорд при двухнедельной внутримышечной терапии в дозе 600 мг/сутки у пациентов с ишемическим инсультом в каротидной системе в раннем восстановительном периоде не отличается статистически значимо от такового для плацебо.