

УДК 577.171.55

## ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОДЕРЖАНИЕ ГЛУТАТИОНА ПРИ ДВУХСОСУДИСТОЙ ИШЕМИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА КРЫС И РЕПЕРФУЗИИ

© 2019 г. И. И. Зорина<sup>1,\*</sup>, О. В. Галкина<sup>2</sup>, Л. В. Баюнова<sup>1</sup>, И. О. Захарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: zorina.inna.spb@gmail.com

Поступила в редакцию 28.08.2018 г.

После доработки 06.02.2019 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

DOI: 10.1134/S0044452919040132

Ишемия и последующая реперфузия мозга представляют собой комплексный патологический процесс. Нарушение мозгового кровообращения приводит к ухудшению работы митохондрий, развитию окислительного повреждения биомолекул, ингибированию синтеза белков, выходу  $Ca^{2+}$  из клеточных депо и эксайтотоксичности, что приводит в конечном итоге к некротической и апоптотической гибели нейронов [1]. Эти процессы могут быть более интенсивными при старении из-за снижения восстановительного потенциала организма. В настоящее время идет интенсивный поиск нейротропных факторов, которые могли бы предотвращать или снижать интенсивность повреждающих процессов и в дальнейшем смогли бы найти применение в клинике для лечения инсульта и предынсультных состояний. Известно, что инсулин выполняет широкий спектр функций в ЦНС, оказывая модулирующее и нейротропное действие, как в норме, так и при патологии. Показаны различные, в том числе, и негативные эффекты инсулина, вводимого подкожно, внутривенно и внутримышечно, в условиях ишемии и реперфузии, при которых инсулин вызывал значительную гипогликемию в отличие от интраназального введения [2]. Однако исследования по изучению защитного действия интраназально вводимого инсулина при ишемии мозга практически не встречаются, несмотря на показанный им защитный потенциал при терапии болезни Альцгеймера [2].

Целью нашего исследования является изучение влияния интраназального введения 0.5 IU инсулина крысам, подвергнутым двухсосудистой ишемии переднего мозга с гипотензией и последующей реперфузией (ИР), на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень общего глутатиона в коре головного мозга.

Крысы линии Вистар в возрасте 3–4 мес. содержались в стандартных условиях вивария. В качестве наркоза использовали хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг веса. Исследование проводилось с учетом рекомендаций, данных в [3]. ИР вызывалась у крыс путем окклюзии каротидных артерий в сочетании с гипотензией [4, 5], которая осуществлялась путем отбора артериальной крови в шприц (перед отбором крови крысам вводили 0.2 мл 0.9% NaCl, содержащий гепарин 50 Ед/мл) до достижения артериального давления в 50 мм рт. ст. По окончании 20 мин окклюзии проводили реперфузию мозга в течение 1 ч, разжимая каротидные артерии и возвращая в кровяное русло кровь в смеси с гепарином, отобранную шприцом на стадии ишемии. Ложно-оперированных (ЛО) крыс использовали как контрольных. Инсулин в дозе 0.5 IU вводили крысам интраназально за 1 ч до окклюзии артерий (в каждую ноздрю по 10 мкл раствора, содержащего 1 мг бычьего инсулина (“Sigma Aldrich”, USA) в 1 мл цитратного буфера, pH 4.4). По окончании реперфузии проводили декапитацию животных и выделяли кору головного мозга. Индекс окисленности липидов, содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) и оснований Шиффа, которые отражают уровень первичных и конечных продуктов ПОЛ, соответственно, определяли в липидных экстрактах коры мозга, выделенных по методу Фолча [6], как это описано ранее [7]. Содержание общего глутатиона определяли в цитоплазматической фракции [8].

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25-й процентиль; 75-й процентиль). Статистическую достоверность различий определяли по U-критерию Манна–Уитни. Достоверными различия считали при  $p < 0.05$ .

Нами показано, что в коре головного мозга крыс, подвергнутых ИР, происходило достоверное

**Таблица 1.** Влияние интраназального введения 0.5 IU инсулина на уровень продуктов ПОЛ и общего глутатиона в коре головного мозга ложно-оперированных и подвергнутых двухсосудистой ишемии и реперфузии мозга крыс

Крысы	Без введения инсулина		Введение 0.5 IU инсулина	
	Ложно-оперированные (n = 7)	После ишемии и реперфузии (n = 7)	Ложно-оперированные (n = 6)	После ишемии и реперфузии (n = 7)
Индекс окисленности	0.144 (0.125; 0.158)	<b>0.164 (0.157; 0.171)*</b>	0.146 (0.133; 0.159)	<b>0.151 (0.132; 0.142)#</b>
Основания Шиффа, у.е./мг липидов	0.259 (0.188; 0.283)	<b>0.585 (0.398; 0.585)*</b>	0.273 (0.239; 0.297)	<b>0.346 (0.307; 0.447)#</b>
ТБК-АП, нмоль/мг белка	0.152 (0.137; 0.167)	0.170 (0.150; 0.196)	0.148 (0.133; 0.173)	0.166 (0.152; 0.174)
Глутатион общий, мкмоль/мг белка	0.147 (0.129; 0.147)	0.161 (0.135; 0.151)	<b>0.302 (0.279; 0.296)*</b>	<b>0.355 (0.323; 0.384)#</b>

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25-й процентиль; 75-й процентиль). Различия достоверны по U-критерию Манна–Уитни: \* – по сравнению с содержанием в коре головного мозга ложно-оперированных крыс, не получавших инсулин,  $p < 0.05$ ; # – по сравнению с содержанием в коре головного мозга крыс, подвергнутых ишемии и реперфузии и не получавших инсулин,  $p < 0.05$ .

увеличение исследованных продуктов ПОЛ по сравнению с ЛО животными, за исключением уровня ТБК-АП, который достоверно не менялся (табл. 1). Так, индекс окисленности липидов, свидетельствующий об увеличении отношения конъюгированных двойных связей к изолированным двойным связям, повышался с 0.144 (0.125; 0.158) у ЛО животных до 0.164 (0.157; 0.171) у крыс, подвергшихся ИР ( $p < 0.05$ ). Инсулин снижал этот показатель до уровня контрольных животных. ИР переднего мозга приводила к повышению уровня оснований Шиффа в 1.7 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с их количеством в мозге ЛО крыс. Интраназальное введение 0.5 IU инсулина не влияло на уровень оснований Шиффа у контрольных животных, но достоверно снижало этот показатель ( $p < 0.05$ ) у крыс, подвергшихся ИР, до уровня ЛО животных, не получавших инсулин. Влияние введения инсулина на содержание ТБК-АП в коре головного мозга, как контрольных крыс, так и перенесших ИР выявлено не было.

Можно предположить, что инсулин, вводимый интраназально в количестве 0.5 IU, уменьшает интенсивность свободнорадикальных процессов при ишемии и реперфузии мозга, что приводит к снижению уровня продуктов ПОЛ. Известно, что инсулин способен оказывать влияние на образование активных форм кислорода и опосредовать снижение интенсивности свободнорадикальных процессов [9], что может проявляться в уменьшении уровня продуктов ПОЛ. С другой стороны, введение инсулина может способствовать активации отдельных компонентов антиоксидантной защиты. В связи с этим мы исследовали влияние инсулина на содержание общего глутатиона в цитоплазматической фракции. Мы не обнаружили достоверных изменений в уровне общего глутатиона в цитоплазматической фракции коры мозга крыс, подвергшихся ИР (табл.). Однако введение 0.5 IU инсулина приводило к достоверному увеличению количе-

ства общего глутатиона, как у ЛО животных, так и после ИР (табл. 1).

Таким образом, показано, что двухсосудистая ишемия мозга с гипотензией и последующей реперфузией приводит к усилению свободнорадикальных процессов, что проявляется в увеличении индекса окисленности липидов и повышении количества оснований Шиффа, но не сопровождается изменением уровня общего глутатиона. Интраназальное введение инсулина в количестве 0.5 IU крысам, перенесшим ИР, нормализует процессы ПОЛ, что возможно опосредовано повышением под влиянием инсулина уровня общего глутатиона, который играет ключевую роль в антиоксидантной защите мозга. Так, в опытах на первичной культуре нейронов коры мозга показано, что инсулин способен повышать уровень общего глутатиона, как в контрольных клетках, так и при окислительном стрессе, усиливая активность глутатионредуктазы и снижая активность глутатионпероксидазы [10], что может иметь место и при ишемии-реперфузии мозга *in vivo*.

Полученные данные о защитном эффекте инсулина, вводимого интраназально, при ишемии и реперфузии мозга открывают перспективу его дальнейшего изучения при острых нарушениях мозгового кровообращения. При этом возникает необходимость подобных исследований на стареющих животных, у которых регенеративный потенциал тканей мозга ниже, чем у молодых особей.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290427-7) при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-315-00285).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A., Krause G.S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179 (1): 1–33. 2000.
2. Lioutas V.A., Alfaro-Martinez F., Bedoya F., Chung C.C., Pimentel D.A., Novak V. Intranasal insulin and insulin-like growth factor 1 as neuroprotectants in acute ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* V. 6. №. 4. P. 264–275. 2015.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М: Гриф и К. 2012. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guide to carrying out preclinical researches of pharmaceutical products]. М: Griph and Co. 2012 (In Russ)].
4. Молчанова С.М., Москвин А.Н., Захарова И.О., Юрлова Л.А., Носова И.Ю., Аврова Н.Ф. Влияние двухсосудистой ишемии переднего мозга и введения индометацина и квинакрина на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в разных областях мозга крыс. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 41 (1): 33–38. 2005. [Molchanova S.M., Moskvina A.N., Zakharova I.Yu., Yurlova L.A., Nosova I.Yu., Avrova N.F. Effects of two-vessel forebrain ischemia and of administration of indomethacin and quinacrine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in various rat brain areas. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41 (1): 33–38. 2005. (In Russ)].
5. Raval A.P., Liu C., Hu B.R. Rat Model of Global Cerebral Ischemia: The Two-Vessel Occlusion (2VO) Model of Forebrain Ischemia. *Animal Models of Acute Neurological Injuries.* Humana Press. 77–86. 2009.
6. Галкина О.В., Ещенко Н.Д., Путилина Ф.Е., Вилкова В.А., Захарова Л.И. Влияние аналогов эстрогенов на перекисное окисление липидов в головном мозге и печени. *Вестник СПбГУ. Сер. 3: Биол.* 1: 90–94. 2009. [Galkina O.V., Eshchenko N.D., Putilina F.E., Vilкова V.A., Zaharova L.I. Influence of estrogen analogs on lipid peroxidation in a brain and a liver. *Vestnik SpB-GU. Series 3. Biol.* 1: 90–94. 2009. (In Russ)].
7. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1): 497–509. 1957.
8. Akerboom T.P.M., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology.* – Academic Press. 77: 373–382. 1981.
9. Muller A.P., Haas C.B., Camacho-Pereira J., Brochier A.W., Gnoatto J., Zimmer E.R., de Souza D.O., Galina A., Portella L.V. Insulin prevents mitochondrial generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in rat brain. *Exp. Neurol.* 247: 66–72. 2013.
10. Duarte A.I., Santos M.S., Oliveira C.R., Rego A.C. Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons – Involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* 39 (7): 876–889. 2005.

## Effect of Insulin on Lipid Peroxidation and Glutathione Levels in Two-Vessel Forebrain Ischemia and Reperfusion in Rats

I. I. Zorina<sup>a, #</sup>, O. V. Galkina<sup>b</sup>, L. V. Bayunova<sup>a</sup>, and I. O. Zakharova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: zorina.inna.spb@gmail.com