

**ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА НА
МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФАКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ
У КОНТРОЛЬНЫХ И ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС В УСЛОВИЯХ
ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ**

© 2024 г. И. И. Зорина¹*, А. С. Печальнова¹, Е. Е. Черненко¹,
К. В. Деркач¹, А. О. Шпаков¹

*¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии
наук, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: zorina.inna.spb@gmail.com

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 16.05.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Поиск природных биологически активных веществ, оказывающих нейропротекторный эффект при церебральной ишемии и реперфузии, является одной из приоритетных задач современной нейробиологии и медицины. Интраназально вводимый инсулин (ИВИ) обладает выраженным восстанавливающим эффектом при различных нейродегенеративных заболеваниях, но механизмы его действия и терапевтические эффекты при церебральной ишемии практически не изучены, в том числе при сахарном диабете 2-го типа (СД2), который повышает риски развития цереброваскулярных дисфункций. Целью работы было исследовать влияние ИВИ на метаболические показатели и факторы воспаления у самцов крыс с СД2, подвергнутых ишемии-реперфузии мозга, в сравнении с недиабетическими животными. Для моделирования СД2 использовали длительную высокожировую диету с инъекцией крысам низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг), а для изучения церебральной ишемии использовали модель глобальной двухсосудистой ишемии переднего мозга, вызванной окклюзией обеих общих каротидных артерий, с длительной реперфузией (ИшР). Через 2 ч после окончания ишемии крыс обрабатывали ИВИ (0.5 или 2.0 МЕ/крыса), после чего препарат вводили в тех же дозах ежедневно, на протяжении 7 дней. Установлено, что ИВИ препятствует потере массы тела как у недиабетических, так и у диабетических крыс, перенесших ИшР, а также повышает содержание общего холестерина и долю эпидидимального жира у крыс без СД2 после ИшР. У ишемических СД2-крыс ИВИ снижает уровни постпрандиальной глюкозы и инсулина в крови, что свидетельствует об улучшении толерантности к глюкозе, а также снижает уровни факторов воспаления – С-реактивного белка (в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки) и фактора- α некроза опухолей (в дозе 2 МЕ/крыса/сутки) в крови, что указывает на его противовоспалительный потенциал. Таким образом, курсовое применение ИВИ после индукции ишемии головного мозга приводит к улучшению метаболических показателей и ослабляет воспалительные реакции у крыс с СД2, что может быть востребовано при коррекции ишемического инсульта у пациентов с СД2.

Ключевые слова: церебральная ишемия, интраназальный инсулин, сахарный диабет 2-го типа, воспаление

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания, среди которых транзиторные ишемические атаки и инсульт мозга, представляют важнейшую медико-социальную проблему. В большинстве развитых стран мира инсульт входит в лидирующую тройку причин в структуре общей смертности населения, в том числе в России [1]. Одной из причин инсульта могут быть эндокринные нарушения, в том числе ожирение, метаболический синдром и сахарный диабет 2-го типа (СД2). У пациентов с СД2 нарушена секреция инсулина, отмечаются гипергликемия, центральная и периферическая инсулинорезистентность, атерогенная дислипидемия и хроническое воспаление [2]. Наличие СД2 увеличивает риск цереброваскулярных заболеваний и повышает вероятность летального исхода и инвалидизации от заболеваний сосудистого русла [3]. При СД2 гипергликемия и дислипидемия в условиях избытка питательных веществ создают предпосылки для развития хронического воспаления, в том числе нейровоспаления, и комплекса осложнений микро- и макрососудистого русла [4].

К настоящему моменту не сложилось структурированного протокола для ведения пациентов с СД2 и церебральной ишемией, не определены оптимальные схемы их терапии в постинсультный период и подходы к вторичной профилактике инсульта. Тем не менее нормализация уровня глюкозы у пациентов с СД2 является одним из подходов для профилактики и лечения инсульта, развивающегося на фоне диабетической патологии и гипергликемии. Инсулин, оказывающий мощное гипогликемическое действие и обладающий широким спектром центральных и периферических эффектов, в этом отношении рассматривается как препарат первой линии выбора, позволяющий поддерживать нормальный уровень глюкозы и снижать его вариабельность [5, 6].

Помимо периферического введения инсулина перспективным может быть интраназальный способ его доставки. Интраназально вводимый инсулин (ИВИ) обеспечивает непосредственное попадание гормона в мозг, где он реализует свое действие посредством активации инсулиновых рецепторов и функционально связанных с ними сигнальных каскадов [7]. В ходе постинсультного периода инсулин мозга может оказывать нормализующее действие на гипоталамическую регуляцию пищевого поведения и энергетический метаболизм, оказывать нейропротекторное и нейромодуляторное действие, а также ослаблять симптомы постинсультной депрессии, таким образом осуществляя вторичную профилактику инсульта [8]. В настоящее время в доклинических и клинических исследованиях интенсивно изучаются эффекты ИВИ при лечении нейродегенеративных заболеваний, депрессии, метаболических расстройств, получены доказательства его эффективности и биобезопасности [7, 9–11]. Преимуществами ИВИ являются безболезненность, отсутствие необходимости в специальном оборудовании или стерилизации, возможность доставлять препарат непосредственно в мозг неинвазивно и быстро. В настоящее время фармакокинетика и фармакодинамика ИВИ у грызунов тщательно изучены, в том числе определены его мишени в ЦНС и оценена динамика его транспорта в периферический кровоток [12, 13]. У грызунов при хронической обработке ИВИ повышается уровень глюкозы, АТФ и фосфокреатинина в ЦНС [14], у человека ИВИ вызывает улучшение мозгового кровотока и потребления глюкозы клетками мозга [7].

При этом существующие экспериментальные данные о механизмах действия и эффективности ИВИ при ишемии головного мозга немногочисленны и ограничены в основном нашими работами, проведенными на здоровых грызунах, не имеющих коморбидных заболеваний (СД, атеросклероз), утяжеляющих последствия инсульта и повышающих предрасположенность к нему пациентов [15–20]. Имеется лишь одно исследование по изучению воздействия ИВИ на грызунах с сочетанием СД2 и ишемическим повреждением, но оно выполнено на мышах и с использованием многократного наркоза для интраназального введения, который существенно влияет на функции ЦНС, особенно в постинсультный период [21]. Целью работы было исследование влияния ИВИ в различных дозах при его введе-

нии в период реперфузии на метаболические показатели и факторы воспаления у самцов крыс с СД2, подвергнутых двухсосудистой ишемии и длительной реперфузии переднего мозга, в сравнении с недиабетическими животными. Для этого проводили оценку влияния инсулина, вводимого после индукции ишемии в различных дозах, на потерю массы тела, долю жировой ткани, липидный профиль, а также на уровни глюкозы, инсулина, лептина и ряда факторов воспаления в крови диабетических и недиабетических крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и материалы. Для интраназальных введений использовали рекомбинантный инсулин человека USP grade (USP RS, США). Хирургическое вмешательство проводили с использованием изофлурана (Karizoo, Испания). Для катетеризации бедренной артерии применяли катетер 1.0 × 0.6 × 210 мм, 23G (SciCat, Россия). Для фиксации мягких тканей и кожи использовали стерильную полиамидную антимикробную хирургическую нить для ветеринарии Polyscon № 000 (Болгария). Анализ уровня триглицеридов и общего холестерина в плазме крови проводили с помощью коммерческих наборов («НПФ АБРИС+», Россия). Определение уровня инсулина, лептина, С-реактивного белка (CRP) и фактора- α некроза опухолей (TNF α) осуществляли с использованием коммерческих ИФА-наборов (ELISA Kit for Insulin #CEA448Ra, ELISA Kit for Leptin #SEA084Ra, ELISA Kit for C Reactive Protein #SEA821Ra, High Sensitive ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha #HEA133Ra, Cloud-Clone Corp., США).

Схема эксперимента. Эксперимент включал в себя два последовательных этапа: индукция и верификация СД2 у крыс и моделирование двухсосудистой ишемии переднего мозга с длительной реперфузией (ИшР) у крыс с СД2 и без него. Были сформированы следующие экспериментальные группы ($n = 6$ в каждой группе): (1) C-SO – ложно оперированные крысы без СД2; (2) C-IR – крысы без СД2, перенесшие ИшР; (3) C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие ИшР и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; (4) DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; (5) DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие ИшР; (6) DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие ИшР и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; (7) DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие ИшР и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. ИВИ во всех случаях вводили ежедневно, на протяжении 7 дней.

Индукция сахарного диабета 2-го типа. Эксперимент проводили на самцах крыс Вистар, имевших возраст два месяца в начале эксперимента. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Моделирование СД2 проводили с помощью высокожировой диеты в течение 20 недель, через 10 недель после начала диеты проводили однократную инъекцию сравнительно низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг, в/б), как описано ранее [22] (группа «DM2»). Животные контрольной группы потребляли стандартный корм (сухая кормовая смесь) и воду, вместо стрептозотоцина им вводили его растворитель (0.1 М натрий-цитратный буфер, pH 4.5) (группа «С»). Через 14 дней после инъекции стрептозотоцина проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ) для подтверждения развития СД2. В ходе ГТТ крысам вводили глюкозу (2 г/кг, в/б) и измеряли ее уровень в цельной крови до и через 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции с помощью глюкометра и тест-полосок One Touch Ultra (США). Через 120 мин после введения глюкозы под местным наркозом забирали кровь из хвостовой вены для определения уровней инсулина и лептина. Контрольная группа также подвергалась ГТТ. Индукцию двухсосудистой ишемии переднего мозга начинали через месяц после проведения ГТТ. Перед индукцией ИшР у животных были измерены уровни общего холестерина, триглицеридов, инсулина, лептина, CRP и TNF α в плазме крови. Индекс инсулинорезистентности рассчитывали (IR) как произведение концентраций глюкозы и инсулина в крови.

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией [23]. Операция проводилась с использованием 2%-ного изофлуранового

наркоза. Животных помещали на подогреваемый столик, температура тела контролировалась с помощью ректального датчика температуры и поддерживалась на уровне 37 °С. Животным препарировали правую бедренную артерию и обе общие сонные артерии. Далее проводили катетеризацию бедренной артерии для индукции гипотензии путем отбора крови в шприц с раствором гепарина (100 ЕД/мл) до достижения артериального давления 40–50 мм. рт. ст. Артериальное давление измеряли при помощи прибора «Систола» (ООО «Нейроботикс»). Затем осуществляли двухстороннюю окклюзию общих сонных артерий на 10 мин для индукции церебральной ишемии. По истечении времени восстанавливали мозговой кровоток для осуществления реперфузии и вводили отобранную ранее кровь со скоростью 2 мл/мин, далее сшивали мягкие ткани. Раневую поверхность обрабатывали комбинированным антимикробным порошком «Банеоцин» (Sandoz, Австрия), швы обрабатывали антисептиком. В послеоперационный период у животных ежедневно контролировали физическое состояние, массу тела и состояние швов. В качестве контроля использовали ложноперированных крыс, которым проводили выделение артерий, но не осуществляли гипотензию и окклюзию. Интраназальную обработку инсулином, растворенным в цитратном буфере (рН 4.5), проводили через 2 ч после окончания ишемии и далее ежедневно в 10:00 один раз в сутки до конца эксперимента, суммарно в течение 7 дней. Ложноперированным животным интраназально вводили физиологический раствор. Интраназальное введение осуществляли в состоянии бодрствования животных. Введение инсулина или физиологического раствора проводили по каплям с помощью автоматического дозатора, при этом общий объем вводимого раствора составил 20 мкл/крыса, по 10 мкл в каждую ноздрю. На 3-и и 7-е сутки реперфузии проводили измерение массы тела, определяли уровень постпрандиальной глюкозы. На 3-и сутки реперфузии отбирали кровь из хвостовой вены под местным наркозом для определения концентрации CRP и TNF α , на 7-е сутки реперфузии забирали кровь для определения уровней инсулина (постпрандиального), триглицеридов и общего холестерина. Под постпрандиальным уровнем глюкозы и инсулина понимается значение показателей в крови, взятой у крыс через 2 ч после изъятия корма из клетки (в 8:00), корм в ночное время был в свободном доступе.

Статистический анализ проводили с помощью программы “GraphPad Prism 8.0.1”. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением и для попарных сравнений использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения двух и более независимых выборок с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия Бонферрони для множественных сравнений. Для сравнения двух и более независимых выборок с ненормальным распределением применяли критерий Крускала-Уоллиса с использованием критерия Данна для множественных сравнений. Данные представлены в виде $M \pm SEM$. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Крысы с СД2 имели повышенные массу тела, а также повышенные уровни глюкозы (натощак), триглицеридов и общего холестерина (табл. 1). Содержание инсулина в крови (натощак) диабетических крыс достоверно не отличалось от такового у крыс, находящихся на стандартной диете, но уровень лептина у них был значимо повышен, на 64% ($p < 0.01$). По результатам ГТТ у группы DM2 была выявлена нарушенная толерантность к глюкозе, оцениваемая по значению AUC_{0-120} для глюкозной концентрационной кривой, а также были повышены уровни инсулина и лептина в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки, что свидетельствует в пользу развития инсулиновой резистентности и сниженной чувствительности к лептину (табл. 1). Все эти метаболические и гормональные изменения являются характерными чертами СД2.

Таблица 1. Метаболические и гормональные показатели у крыс контрольной группы и у животных с СД2, вызванными длительной высокожировой диетой и инъекцией низкой дозы стрептозотоцина

Показатель	C, n = 18	DM2, n = 18
Масса тела, г	370 ± 6	452 ± 6 ^b
Глюкоза натощак, ммоль/л	5.5 ± 0.1	6.2 ± 0.2 ^b
Глюкоза (ГТТ, 120 мин), ммоль/л*	6.0 ± 2.3	10.5 ± 2.5 ^b
AUC _{0-120'} , отн. ед.	1258 ± 43	2473 ± 132 ^b
Триглицериды, ммоль/л	0.51 ± 0.01	0.92 ± 0.05 ^b
Общий холестерин, ммоль/л	1.75 ± 0.05	1.97 ± 0.06 ^b
Инсулин натощак, нг/мл	0.64 ± 0.07	0.79 ± 0.18
Лептин натощак, нг/мл	3.7 ± 0.2	6.1 ± 0.6 ^b
Инсулин (ГТТ, 120 мин), нг/мл*	0.71 ± 0.08	1.62 ± 0.32 ^{a, c}
Индекс инсулинорезистентности	3.4 ± 0.5	15.4 ± 4.1 ^b
Лептин (ГТТ, 120 мин), нг/мл*	5.3 ± 0.4	10.8 ± 0.4 ^{b, c}

C – интактные крысы без СД2; DM2 – крысы с СД2, индуцированным высокожировой диетой и инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг, в/б). * – уровни глюкозы, инсулина и лептина через 120 мин в ГТТ в группах C и DM2. ^a – различия между группами C и DM2 статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия между группами C и DM2 статистически значимы при $p < 0.01$; ^c – различия между уровнями инсулина и лептина натощак и через 120 мин в ГТТ статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

Через месяц после проведенного ГТТ крыс случайным образом делили на группы, для индукции у части животных двухсосудистой ишемии переднего мозга, которую проводили в течение 10 мин, и реперфузией в течение последующих 7 дней. В ходе эксперимента ряд показателей оценивали на 3-и и 7-е сутки реперфузии. Оценивали динамику потери массы тела у крыс с СД2 и без него после перенесенной ишемии переднего мозга на 3-и и 7-е сутки реперфузии (рис. 1). На 3-и сутки крысы групп C-IR и DM2-IR имели выраженную потерю массы тела по сравнению с ложнооперированными животными ($p < 0.01$ в обоих случаях), в то же время достоверных отличий между самими группами C-IR и DM2-IR обнаружено не было ($p = 0.086$) (рис. 1a). На 7-е сутки реперфузии у подвергшихся ишемии крыс с СД2 и без него также фиксировалась значимая потеря массы тела (рис. 1b). Оценка доли жировой ткани у крыс на 7-е сутки реперфузии показала, что в группах DM2-SO и DM2-IR доля висцерального жира была выше, чем у животных без СД2 (рис. 2a). В то же время изменения доли эпидидимального жира у диабетических животных на 7-е сутки реперфузии отсутствовали (рис. 2b).

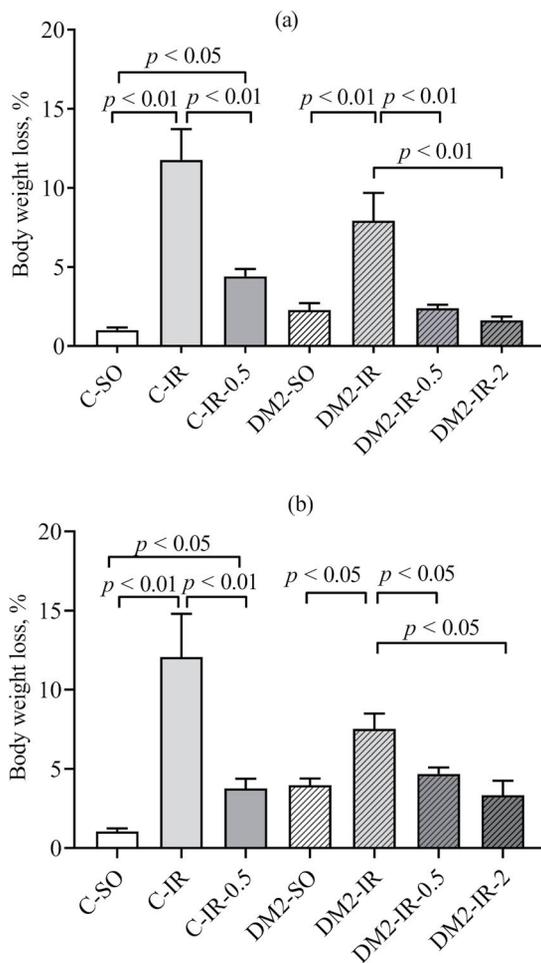


Рис. 1. Потеря массы тела у крыс с СД2 и без него, перенесших двухсосудистую ишемию и реперфузию, через 3 (а) и 7 (б) суток после начала реперфузии и влияние на нее интраназально вводимого инсулина.

Представлена потеря массы тела в% от общей массы тела на 3-и (а) и 7-е (б) сутки реперфузии. Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

Лечение ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крысу/сутки, которое начинали через 2 ч после окончания ишемии и продолжали ежедневно в течение 7 дней, снижало потерю массы тела у недиабетических животных на 3-и и 7-е сутки реперфузии ($p < 0.01$), но этот показатель оставался выше, чем в группе C-SO (рис. 1а, б). В группе C-IR-0.5 также показано повышение доли эпидидимального жира по сравнению с группой без лечения ($p < 0.05$) (рис. 2б).

Обработка СД2-крыс, перенесших ишемию переднего мозга, с помощью ИВИ в дозах 0.5 и 2 МЕ/крысу/сутки также препятствовала потере массы тела на 3-и и 7-е сутки реперфузии ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно) (рис. 1а, б), но не влияла на долю висцерального и эпидидимального жира (рис. 2а, б). При этом дозозависимости эффекта ИВИ на потерю массы тела у СД2-животных, перенесших ИшР, нами не было обнаружено.

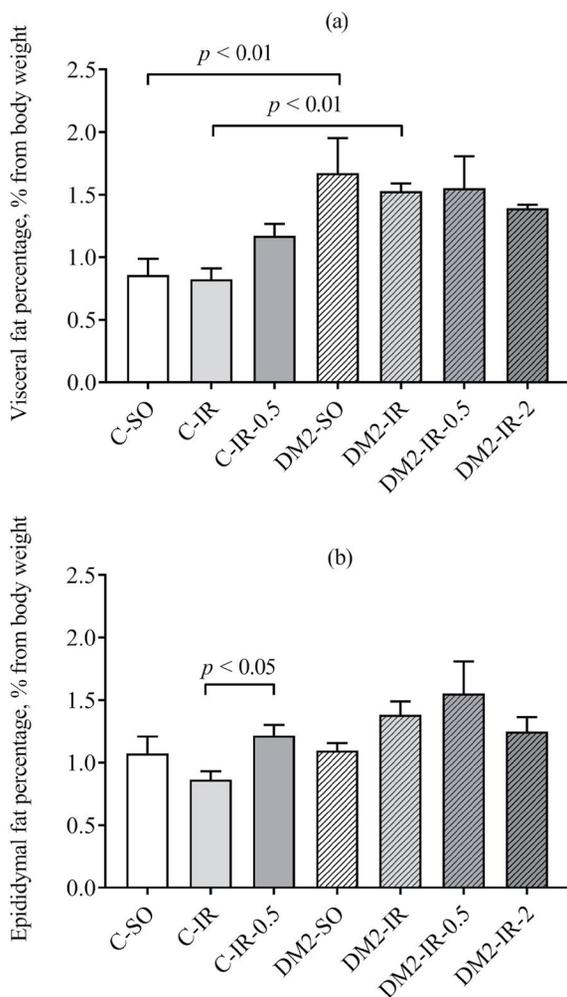


Рис. 2. Доля висцерального (а) и эпидидимального (б) жира у крыс, перенесших ишемию переднего мозга и 7-дневную реперфузию, с СД2 и без него, и влияние на них интраназально вводимого инсулина.

Представлена доля жировой ткани в % от общей массы тела. Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

На рис. 3 представлен уровень постпрандиальной глюкозы у крыс после перенесенной ИшР на 3-и и 7-е сутки реперфузии. В группах DM2-SO и DM2-IR уровень постпрандиальной глюкозы был выше по сравнению с соответствующими группами крыс без диабетической патологии, C-SO и C-IR, во всех временных точках ($p < 0.05$). В то же время различий в уровне глюкозы между группами DM2-SO и DM2-IR выявлено не было на обоих контрольных точках реперфузии.

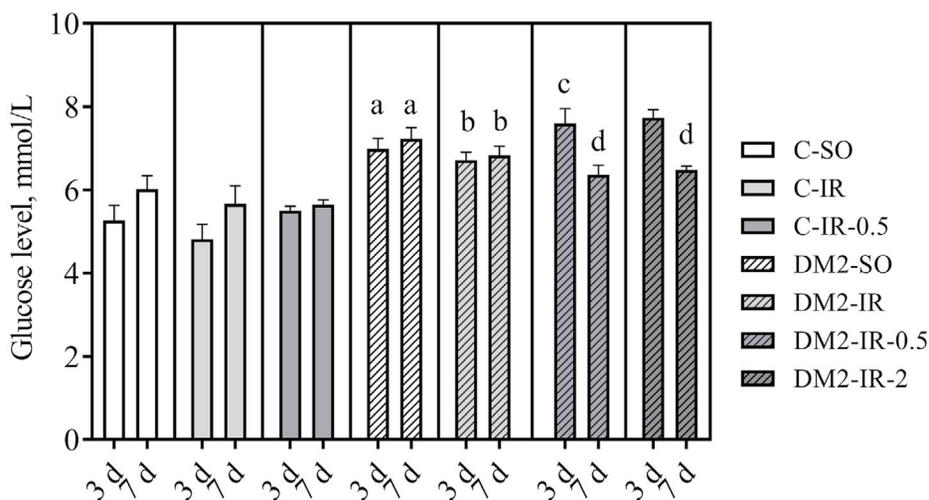


Рис. 3. Уровни постпрандиальной глюкозы в крови крыс с СД2 и без него, перенесшие ишемию переднего мозга и реперфузию, и влияние на них интраназально вводимого инсулина на 3-й и 7-й дни реперфузии.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки.^a – различия достоверны по сравнению с C-SO при $p < 0.05$; ^b – различия достоверны по сравнению с C-IR при $p < 0.05$; ^c – различия достоверны по сравнению с C-IR-0.5 при $p < 0.01$; ^d – различия достоверны по сравнению с соответствующим показателем на 3-й день реперфузии при $p < 0.01$. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки не оказывал значимого влияния на уровень постпрандиальной глюкозы в крови крыс без диабетической патологии, как на 3-и, так и на 7-е сутки реперфузии (рис. 3). ИВИ в дозах 0.5 и 2 МЕ/крыса/сутки, вводимый СД2-крысам, перенесшим ишемию переднего мозга, также не влиял на уровень постпрандиальной глюкозы по сравнению с группой DM2-IR. Однако при сравнении показателей на 3-и и 7-е сутки реперфузии обнаруживается достоверное снижение уровня глюкозы на 7-е сутки у СД2-крыс, получавших ИВИ в обеих исследуемых дозах ($p < 0.01$). У крыс группы DM2-IR-0.5 уровень глюкозы на 3-и сутки был повышен в сравнении с группой C-IR-0.5 ($p < 0.01$), но на 7-е сутки значимых различий обнаружено не было.

Двухсосудистая ишемия и 7-дневная реперфузия не оказывали существенного влияния на постпрандиальный уровень инсулина в контрольной группе (рис. 4). В то же время уровень инсулина повышался у крыс группы DM2-IR по сравнению с группами DM2-SO и C-IR ($p < 0.01$ в обоих случаях). Обработка ИВИ повышала уровень инсулина в крови крыс группы C-IR ($p < 0.05$). При этом в группах DM2-IR-0.5 и DM2-IR-2 отмечали значимое снижение уровня инсулина по сравнению с группой DM2-IR ($p < 0.01$ в обоих случаях) (рис. 4).

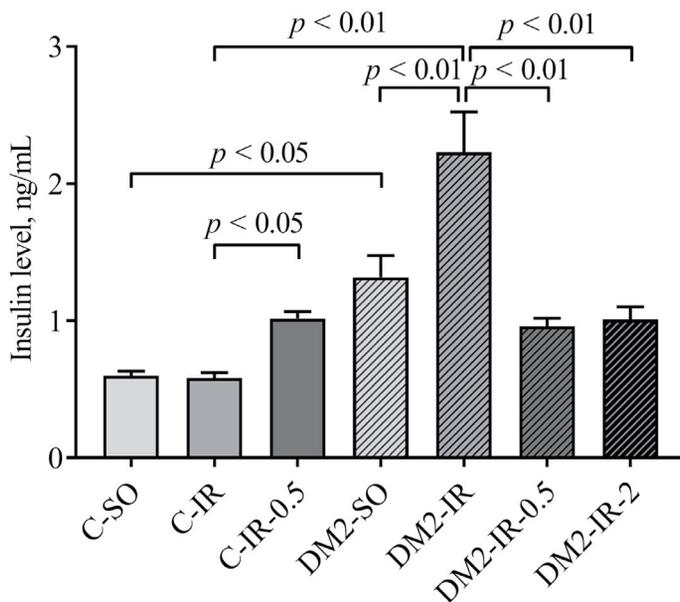


Рис. 4. Уровень постпрандиального инсулина в крови крыс с СД2 и без него, перенесшие ишемию переднего мозга и реперфузию в течение 7 суток, и влияние на него интраназально вводимого инсулина.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

На 7-е сутки реперфузии оценивали уровни общего холестерина и триглицеридов в крови крыс. Существенных изменений уровня общего холестерина в исследуемых группах обнаружено не было, за исключением того, что введение ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки крысам без СД2, перенесшим ишемию, приводило к повышению уровня холестерина по сравнению с группой C-SO (рис. 5а). Уровень триглицеридов на 7-е сутки реперфузии в крови в группе DM2-SO был выше, чем соответствующий показатель у крыс без СД2, а в группе DM2-IR показано его снижение по сравнению с группой DM2-SO (рис. 5б). При обработке СД2-крыс ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки отмечено повышение содержания триглицеридов в крови по сравнению с группой DM2-IR.

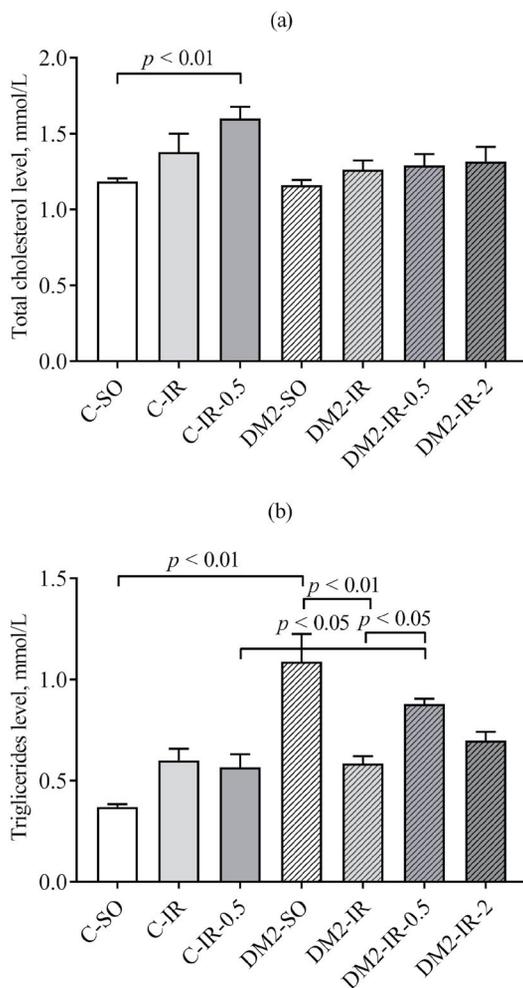


Рис. 5. Уровни общего холестерина (а) и триглицеридов (б) в крови крыс с СД2 и без него, перенесших двухсосудистую ишемию реперфузию в течение 7 суток, и влияние на них интраназально вводимого инсулина.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

Методом ИФА было изучено содержание CRP и TNF α в крови крыс до индукции у них ИшР и через трое суток после начала реперфузии (рис. 6а, б). По нашим данным, у крыс с СД2 отмечены повышенные базовые уровни CRP и TNF α в крови по сравнению с контрольными недиабетическими крысами ($p < 0.05$). На 3-и сутки реперфузии показано повышение уровня CRP в крови крыс группы DM2-IR по сравнению с тако-

выми в группах DM2-SO и C-IR (рис. 6b) и отмечена тенденция к повышению уровня TNF α . ИВИ не оказывал выраженного влияния на уровни CRP и TNF α в крови крыс без СД2. Ежедневная обработка СД2-крыс с помощью ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки снижала уровень CRP по сравнению с группой DM2-IR до его уровня у крыс группы DM2-SO. При этом изменений уровня TNF α при этой дозе обнаружено не было, тогда как введение ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки снижало содержание TNF α на 3-и сутки реперфузии (рис. 6a).

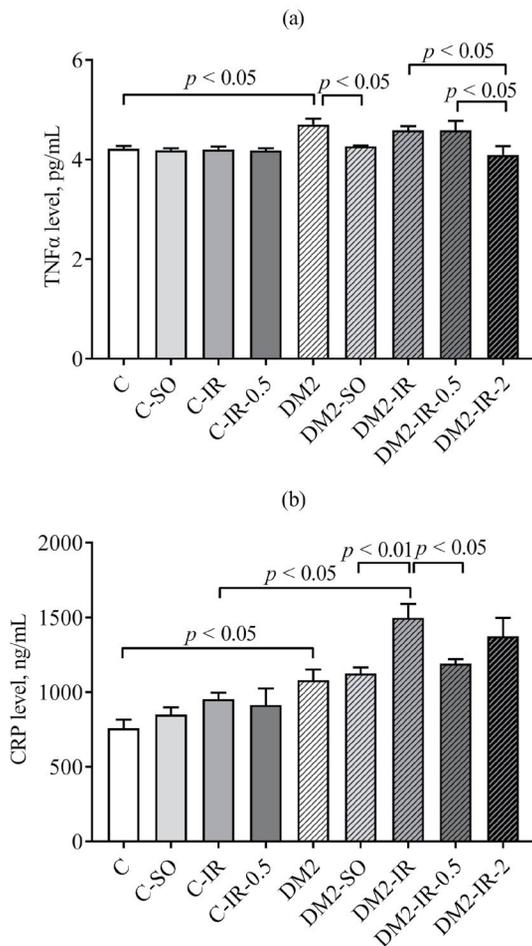


Рис. 6. Уровни TNF α (a) и С-реактивного белка (CRP) (b) в крови крыс с СД2 и без него, перенесших двухсосудистую ишемию, на 3-и сутки реперфузии, и влияние на них интраназально вводимого инсулина.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Резкое снижение кровоснабжения и энергетический дефицит в ткани мозга при ишемии приводят к запуску множества компенсаторных механизмов. Считается, что единый ответ организма на острую церебральную ишемию происходит благодаря взаимодействию нервной, иммунной и эндокринной систем. Важную роль в этом играют сигнальные каскады, активируемые широким спектром гормонов, ростовых факторов, цитокинов, наделенных свойствами нейропротекторов и нейромодуляторов [24]. Среди «отдаленных» последствий ишемии выделяют нейровоспаление, опосредованное активацией глиальных клеток и клеток иммунной системы, нарушения сосудистого русла, повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и гибель нейронов [25]. Церебральная ишемия приводит к развитию выраженных стойких изменений периферического метаболизма [26, 27].

Потеря массы тела является распространенным явлением после перенесенной ишемии мозга и влияет на исход заболевания [28], а также может служить индикатором тяжести повреждений мозга [29]. По нашим данным, крысы, перенесшие ИшР, имели значительную потерю массы тела в течение 7 дней реперфузии, как с СД2, так и без него (рис. 1), что подтверждается данными других авторов о потере массы тела у мышей с ожирением, перенесших фокальную ишемию [21]. Потеря массы тела не сопровождалась выраженным снижением доли висцерального или эпидидимального жира (рис. 2). Кроме того, не было выявлено изменений содержания общего холестерина и триглицеридов у крыс без СД2, перенесших ИшР (рис. 5). По-видимому, снижение массы тела в основном обусловлено уменьшением массы мышечной ткани. Потеря мышечной массы является серьезной проблемой у пациентов с инсультом и затрагивает различные группы мышц. Так, у пациентов с острым инсультом наблюдали уменьшение мышечной массы в течение первых двух недель после ишемического эпизода, причем дефицит мышечной массы мог сохраняться в течение нескольких лет [30, 31].

Мы предполагали, что потеря массы тела у СД2-крыс с ИшР будет более выражена, чем у недиабетических животных, однако, напротив, обнаруживалась тенденция к ее снижению в группе DM2-IR по сравнению с группой C-IR. Это может быть компенсаторным процессом, направленным на ослабление негативных последствий инсульта. Важно, что у диабетических крыс с ожирением повышен уровень триглицеридов (табл. 1), что увеличивает возможность их расходования в условиях повышения энергетических потребностей организма в постишемический период. Так, показано, что низкий уровень триглицеридов характерен для пациентов с тяжелой формой инсульта [32]. Нами продемонстрировано снижение уровня триглицеридов в группе DM2-IR до такового в контрольных группах (рис. 5b), и это, возможно, обеспечивает более мягкое снижение массы тела и отсутствие изменений доли жировой ткани в группе DM2-IR.

У животных группы DM2-IR отмечалось более чем двукратное увеличение уровня постпрандиального инсулина в крови (рис. 4). Повышение концентрации инсулина может свидетельствовать о прогрессировании инсулинорезистентности у крыс группы DM2-IR, что описано как одно из последствий церебральной ишемии [33]. Деградация мышечной ткани вследствие инсульта может приводить к повышению уровня аминокислот и пептидов в крови, что требует повышения уровня циркулирующего в кровотоке инсулина, наделенного анаболическим эффектом [34]. У животных с нормальной чувствительностью тканей к инсулину нет необходимости в секреции больших количеств гормона в ответ на пищевую нагрузку, а также быстрее осуществляется его деградация, что, как мы полагаем, объясняет отсутствие значимых изменений его уровня в группе C-IR (рис. 4). В условиях же выраженной инсулинорезистентности, характерной для СД2-крыс, секреция инсулина панкреатическими островками усиливает-

ся, а период полувыведения инсулина увеличивается, чем и может быть обусловлено продемонстрированное нами повышение уровня постпрандиального инсулина в крови крыс группы DM2-IR. Повышение уровня инсулина после ИшР у СД2-крыс может обеспечивать более эффективное снижение уровня триглицеридов, поскольку инсулин регулирует их синтез и деградацию [35], что согласуется с нашими данными о более выраженном снижении уровня триглицеридов в группе DM2-IR.

Лечение подвергшихся ИшР крыс с помощью ИВИ препятствовало потере массы тела у недиабетических и диабетических крыс (рис. 1), что может быть следствием сохранения как мышечной, так и жировой ткани [36], а также влиянием инсулина мозга на набор массы тела животными [37]. По другим данным, ИВИ при индукции фокальной ишемии у мышей с ожирением не обеспечивал сохранение массы тела, несмотря на более высокие его суточные дозы [21], и это может быть обусловлено использованием наркоза для введения инсулина животным, поскольку многократный наркоз может пагубно сказываться на функциональном состоянии организма. При обработке ИВИ была показана тенденция к повышению доли висцерального жира и достоверное увеличение доли эпидидимального жира у крыс группы С-IR-0.5 (рис. 2), и это сопровождалось повышением уровня общего холестерина в крови животных группы С-IR-0.5 по сравнению с ложнооперированными крысами (рис. 5а). При обработке СД2-крыс, перенесших ИшР, ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крысу/сутки отмечено увеличение содержания триглицеридов, снижение которого показано в группе без введения гормона (рис. 5b). Все это может указывать на активацию инсулином мозга анаболических процессов на периферии [38], которое может реализоваться, в том числе, путем регуляции функциональной активности SREBP-белков (Sterol regulatory element-binding proteins) [39].

У СД2-крыс, в том числе с ИшР, уровень постпрандиальной глюкозы оставался повышенным на всем протяжении эксперимента (рис. 3). ИВИ, как и предполагалось, не оказывал существенного влияния на уровень глюкозы у животных без СД2, но у СД2-крыс с ИшР в обеих исследуемых дозах на 7-е сутки значимо снижал концентрацию постпрандиальной глюкозы. Ранее нами было описано улучшение гликемии при лечении ИВИ животных с различными метаболическими расстройствами (подробнее см. [11]), но в условиях церебральной ишемии это было обнаружено впервые. Улучшение гликемического статуса у крыс групп DM2-IR-0.5 и DM2-IR-2 на 7-е сутки обработки ИВИ сопровождалось снижением уровня инсулина в крови (рис. 4), что может свидетельствовать об улучшении толерантности к глюкозе и снижении инсулинорезистентности, и показано нами впервые в модели церебральной ишемии СД2-крыс. Другими авторами продемонстрировано увеличение потребления глюкозы мозгом крыс, получавших ежедневно ИВИ, после перенесенной травмы мозга, что указывает на стимулирующее влияние инсулина мозга на процесс потребления глюкозы, тем более что травматические повреждения также могут сопровождаться инсулинорезистентностью [40]. По другим данным, ИВИ в модели геморрагического инсульта снижает метаболический дистресс у мышей, уменьшая соотношение лактат/пируват и повышая уровень глюкозы в спинномозговой жидкости [41].

Механизмы, с помощью которых ожирение и СД2 усугубляют повреждение головного мозга после инсульта, изучены недостаточно. Считается, что существенный вклад вносят развитие хронического воспаления низкой степени тяжести, вызывающего протромботическое состояние, а также снижение эластичности сосудистой стенки и повышение ее проницаемости вследствие гипергликемии. Результатом этого является дефицит мозгового кровообращения после инсульта, выраженное нейровоспаление и более интенсивная гибель нейронов и глиальных клеток [4]. У СД2-крыс отмечали значимое повышение базового уровня провоспалительного белка CRP и тенденцию к повышению уровня провоспалительного фактора TNF α (рис. 5). Индукция ишемии приводила к еще большему увеличению уровня CRP на 3-и сутки реперфузии. ИВИ,

который не влиял на уровень CRP у недиабетических крыс, в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки (но не 2 МЕ/крыса/сутки) достоверно снижал содержание этого белка в крови СД2-крыс с ИшР. Необходимо отметить, что в дозе 2 МЕ/крыса/сутки (но не 0.5 МЕ/крыса/сутки) ИВИ у диабетических крыс также снижал содержание в крови TNF α . Подобный эффект, по-видимому, связан с дифференцированным опосредованным влиянием различных доз ИВИ на источники этих воспалительных факторов в ЦНС и на периферии. Основным источником CRP служат гепатоциты печени. В этом отношении интересно отметить, что эффект ИВИ на уровень триглицеридов, обмен которых проходит преимущественно в печени, также обнаружен нами при использовании дозы 0.5 МЕ/крыса/сутки, которая была эффективной при ингибировании продукции CRP. Фактор TNF α продуцируется во множестве тканей, включая ЦНС и иммунную систему, и является важнейшим маркером тяжести ишемических повреждений мозга [42]. Имеется работа об эффективности ИВИ в отношении снижения уровня TNF α , а также ряда других провоспалительных цитокинов, у мышей с моделью геморрагического инсульта [41]. В другой работе показано, что внутривенные инъекции инсулина после индукции ишемии снижают уровень воспаления и содержание TNF α в крови диабетических крыс (стрептозотоцин-индуцированный СД1, 50 мг/кг, в/б) [43]. Однако данные о влиянии ИВИ на продукцию TNF α при других формах ишемических повреждений мозга в сочетании с метаболической патологией отсутствуют, как и мало известно о механизмах действия инсулина мозга на продукцию провоспалительных цитокинов в мозге и периферических тканях при ИшР. Имеются основания считать, что в этих процессах в различной степени задействованы активируемые инсулином сигнальные пути, включающие в качестве эффекторных компонентов Akt-киназу, киназы семейства ERK1/2, комплекс mTORC, обеспечивающие выживаемость клеток и повышающие регенеративные способности тканей в постинсультный период [8, 44].

Таким образом, нами исследована возможность применения ИВИ после индукции двухсосудистой ишемии переднего мозга у крыс с длительной реперфузией как с СД2, так и без диабетической патологии. Впервые описаны положительные эффекты ИВИ при сочетанной патологии, что указывает на эффективность его использования при введении препарата через 2 ч после индукции ишемии с последующим недельным курсом ИВИ. Действуя через инсулиновую систему мозга, ИВИ индуцирует анаболические эффекты на периферии, повышая содержание общего холестерина и долю эпидидимального жира у недиабетических крыс после перенесенной ИшР. Одним из ключевых эффектов ИВИ является предотвращение потери массы тела у животных, происходящей при ИшР. При индукции ИшР у диабетических крыс инсулин при интраназальном введении улучшает толерантность к глюкозе и оказывает противовоспалительное действие. Полученные результаты открывают широкие перспективы для дальнейшего изучения терапевтического потенциала различных доз ИВИ при ИшР, осложненной метаболическими расстройствами, а также для изучения центральных механизмов действия ИВИ при церебральной ишемии, в том числе в сочетании с СД2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Моделирование двухсосудистой ишемии мозга крысы проводилось на базе Центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН (ЦКП ИЭФБ РАН). <https://www.iephb.ru/czentr-kollektivnogo-polzovaniya/>

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И. И. З., К. В. Д., А. О. Ш.), сбор данных (И. И. З., А. С. П., Е. Е. Ч.), обработка данных (И. И. З., А. С. П., К. В. Д.), написание и редактирование манускрипта (И. И. З., А. О. Ш.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 23–75–01083). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, протокол № 8–1/2023 от 24 августа 2023 года.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Какорина ЕП, Никитина СИ* (2019) Особенности структуры смертности в Российской Федерации. Пробл соц защиты населения в истории медицины 27: 822–826. [*Kakorina EP, Nikitina SY* (2019) Features of the structure of mortality in Russian Federation. Probl Sots Gig Zdravookhran Istor Med 27: 822–826. (In Russ)].
<https://doi.org/10.32687/0869-866X-2019-27-5-822-826>
2. *Vorotnikov AV, Stafeev IS, Menshikov MY, Shestakova MV, Parfyonova YV* (2019) Latent Inflammation and Defect in Adipocyte Renewal as a Mechanism of Obesity-Associated Insulin Resistance. *Biochemistry (Mosc)* 84: 1329–1345.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110099>
3. *Kim H, Lee H* (2023) Risk of Stroke and Cardiovascular Disease According to Diabetes Mellitus Status. *West J Nurs Res* 45: 520–527.
<https://doi.org/10.1177/01939459231158212>
4. *Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, Deftereos S, Tousoulis D* (2019) The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol* 14: 50–59.
<https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>
5. *Акжигитов РГ* (ред) (2021) Федеральные клинические рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой у взрослых. М. Атомиздат. [*Akzhigitov RG* (ed) (2021) Federal recommendations for the management of patients with ischemic stroke and transient ischemic attack in adults. M. Atomizdat. (In Russ)].
6. *Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demaerschalk BM, Hoh B, Jauch EC, Kidwell CS, Leslie-Mazwi TM, Ovbiagele B, Scott PA, Sheth KN, Southerland AM, Summers DV, Tirschwell DL* (2019) Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50: e344–e418.
<https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>
7. *Hallschmid M* (2021) Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol* 33: e12934.
<https://doi.org/10.1111/jne.12934>
8. *Zorina II, Avrova NF, Zakharova IO, Shpakov AO* (2023) Prospects for the Use of Intranasally Administered Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 in Cerebral Ischemia. *Biochemistry (Mosc)* 88: 374–391.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923030070>
9. *White MF, Kahn CR* (2021) Insulin action at a molecular level – 100 years of progress. *Mol Metab* 52: 101304.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101304>
10. *Novak V, Mantzoros CS, Novak P, McGlinchey R, Dai W, Lioutas V, Buss S, Fortier CB, Khan F, Aponte Becerra L, Ngo LH* (2022) MemAID: Memory advancement with intranasal insulin vs. placebo in type 2 diabetes and control participants: a randomized clinical trial. *J Neurol* 269: 4817–4835.
<https://doi.org/10.1007/s00415-022-11119-6>

11. *Shpakov AO, Zorina II, Derkach KV* (2022) Hot Spots for the Use of Intranasal Insulin: Cerebral Ischemia, Brain Injury, Diabetes Mellitus, Endocrine Disorders and Postoperative Delirium. *Int J Mol Sci* 24: 3278.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043278>
12. *Picone P, Sabatino MA, Ditta LA, Amato A, San Biagio PL, Mulè F, Giacomazza D, Dispenza C, Di Carlo M* (2018) Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier. *J Control Release* 270: 23–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.040>
13. *Fan LW, Carter K, Bhatt A, Pang Y* (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
14. *Nedelcovych MT, Gadiano AJ, Wu Y, Manning AA, Thomas AG, Khuder SS, Yoo SW, Xu J, McArthur JC, Haughey NJ, Volsky DJ, Rais R, Shusher BS* (2018) Pharmacokinetics of Intranasal versus Subcutaneous Insulin in the Mouse. *ACS Chem Neurosci* 9: 809–816.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00434>
15. *Xu LB, Huang HD, Zhao M, Zhu GC, Xu Z* (2021) Intranasal Insulin Treatment Attenuates Metabolic Distress and Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Neurocrit Care* 2021 34: 154–166.
<https://doi.org/10.1007/s12028-020-01011-4>
16. *Zhu Y, Huang Y, Yang J, Tu R, Zhang X, He WW, Hou CY, Wang XM, Yu JM, Jiang GH* (2022) Intranasal insulin ameliorates neurological impairment after intracerebral hemorrhage in mice. *Neural Regen Res* 17: 210–216.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.314320>
17. *Zorina II, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova NF* (2018) Insulin Administration Prevents Accumulation of Conjugated Dienes and Trienes and Inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Rat Cerebral Cortex during Two-Vessel Forebrain Ischemia and Reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 54: 246–249.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018030109>
18. *Zorina II, Galkina OV, Bayunova LV, Zakharova IO* (2019) 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 Phys* 55: 333–335.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019040094>
19. *Zakharova IO, Bayunova LV, Zorina II, Sokolova TV, Shpakov AO, Avrova NF* (2021) 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* 22: 11768.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111768>
20. *Захарова ИО, Баюнова ЛВ, Зорина ИИ, Шпаков АО, Аврова НФ* (2022) Инсулин и ганглиозиды мозга предотвращают нарушения метаболизма, вызванные активацией свободно-радикальных реакций, при двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс и реперфузии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(2): 262–278. [*Zakharova IO, Bayunova LV, Zorina II, Shpakov AO, Avrova NF* (2022) Insulin and Brain Gangliosides Prevent Metabolic Disorders Caused by Activation of Free Radical Reactions after Two-Vessel Ischemia–Reperfusion Injury to the Rat Forebrain. *Rus Phiziol J* 108(2): 262–278. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S086981392202011X>
21. *Smith CJ, Sims S-K, Nguyen S, Williams A, McLeod T, Sims-Robinson C* (2023) Intranasal insulin helps overcome brain insulin deficiency and improves survival and post-stroke cognitive impairment in male mice. *J Neurosci Res* 101: 1757–1769.
<https://doi.org/10.1002/jnr.25237>
22. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepochkina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2021) The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23: 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
23. *Raval AP, Liu C, Hu BR* (2009) Rat Model of Global Cerebral Ischemia: The Two-Vessel Occlusion (2VO) Model of Forebrain Ischemia. In: Chen J, Xu ZC, Xu XM, Zhang JH (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. Springer Protocols Handbooks. Hum Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-185-1_7
24. *Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, Zhou LQ, Chen M, Tian DS, Wang W* (2022) Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 7: 215.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>

25. *Khoshtam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF* (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci* 38: 1167–1186.
<https://doi.org/10.1007/s10072-017-2938-1>
26. *Sidorov EV, Rout M, Xu C, Jordan L, Fields E, Apple B, Smith K, Gordon D, Chainakul J, Sanghera DK* (2023) Difference in acute and chronic stage ischemic stroke metabolic markers with controls. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 32: 107211.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.107211>
27. *Haley MJ, White CS, Roberts D, O'Toole K, Cunningham CJ, Rivers-Auty J, O'Boyle C, Lane C, Heaney O, Allan SM, Lawrence CB* (2020) Stroke Induces Prolonged Changes in Lipid Metabolism, the Liver and Body Composition in Mice. *Transl Stroke Res* 11: 837–850.
<https://doi.org/10.1007/s12975-019-00763-2>
28. *Scherbakov N, Pietrock C, Sandek A, Ebner N, Valentova M, Springer J, Schefold JC, von Haehling S, Anker SD, Norman K, Haeusler KG, Doehner W* (2019) Body weight changes and incidence of cachexia after stroke. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 10: 611–620.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12400>
29. *Cai L, Geng X, Hussain M, Liu Z, Gao Z, Liu S, Du H, Ji X, Ding Y* (2015) Weight loss: indication of brain damage and effect of combined normobaric oxygen and ethanol therapy after stroke. *Neurol Res* 37: 441–446.
<https://doi.org/10.1179/1743132815Y.00000000033>
30. *English C, McLennan H, Thoirs K, Coates A, Bernhardt J* (2010) Loss of skeletal muscle mass after stroke: a systematic review. *Int J Stroke* 5: 395–402.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2010.00467>
31. *Gungor L, Arsava EM, Guler A, Togay Isikay C, Aykac O, Batur Caglayan HZ, Kozak HH, Aydingoz U, Topcuoglu MA* (2023) MASS investigators. Determinants of in-hospital muscle loss in acute ischemic stroke – Results of the Muscle Assessment in Stroke Study (MASS). *Clin Nutr* 42: 431–439.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.01.017>
32. *Akhtar N, Singh R, Kamran S, Joseph S, Morgan D, Uy RT, Treit S, Shuaib A* (2024) Association between serum triglycerides and stroke type, severity, and prognosis. Analysis in 6558 patients. *BMC Neurol* 24: 88.
<https://doi.org/10.1186/s12883-024-03572-9>
33. *Ding PF, Zhang HS, Wang J, Gao YY, Mao JN, Hang CH, Li W* (2022) Insulin resistance in ischemic stroke: Mechanisms and therapeutic approaches. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1092431.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1092431>
34. *Grizard J, Dardevet D, Balage M, Larbaud D, Sinaud S, Savary I, Grzelkowska K, Rochon C, Tauveron I, Obled C* (1999) Insulin action on skeletal muscle protein metabolism during catabolic states. *Reprod Nutr Dev* 39: 61–74.
<https://doi.org/10.1051/rnd:19990104>
35. *Ho-Palma AC, Toro P, Rotondo F, Romero MDM, Alemany M, Remesar X, Fernández-López JA* (2019) Insulin Controls Triacylglycerol Synthesis through Control of Glycerol Metabolism and Despite Increased Lipogenesis. *Nutrients* 11: 513.
<https://doi.org/10.3390/nu11030513>
36. *Katsiki N, Mikhailidis DP, Gotzamani-Psarrakou A, Didangelos TP, Yovos JG, Karamitsos DT* (2011) Effects of improving glycemic control with insulin on leptin, adiponectin, ghrelin and neuropeptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *Open Cardiovasc Med J* 5: 136–147.
<https://doi.org/10.2174/1874192401105010136>
37. *Hallschmid M, Higgs S, Thienel M, Ott V, Lehnert H* (2012) Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women. *Diabetes* 61: 782–789.
<https://doi.org/10.2337/db11-1390>
38. *Scherer T, Sakamoto K, Buettner C* (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat Rev Endocrinol* 17: 468–483.
<https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
39. *Xiao X, Luo Y, Peng D* (2022) Updated Understanding of the Crosstalk Between Glucose/Insulin and Cholesterol Metabolism. *Front Cardiovasc Med* 9: 879355.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.879355>
40. *Brabazon F, Wilson CM, Jaiswal S, Reed J, Frey WH, Nd, Byrnes KR* (2017) Intranasal insulin treatment of an experimental model of moderate traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 3203–3218.
<https://doi.org/10.1177/0271678X16685106>

41. Xu LB, Huang HD, Zhao M, Zhu GC, Xu Z (2021) Intranasal Insulin Treatment Attenuates Metabolic Distress and Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Neurocrit Care* 34: 154–166.
<https://doi.org/10.1007/s12028-020-01011-4>
42. Xue Y, Zeng X, Tu WJ, Zhao J (2022) Tumor Necrosis Factor- α : The Next Marker of Stroke. *Dis Markers* 2022: 2395269.
<https://doi.org/10.1155/2022/2395269>
43. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasinelli C, Thiemermann C, Boccuzzi G, Fantozzi R (2009) Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3 β . *Diabetes* 58: 235–242.
<https://doi.org/10.2337/db08-0691>
44. Lioutas VA, Novak V (2016) Intranasal insulin neuroprotection in ischemic stroke. *Neural Regen Res* 11: 400–401.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.179040>

EFFECT OF INTRANASALLY ADMINISTERED INSULIN ON METABOLIC PARAMETERS AND INFLAMMATION FACTORS IN CONTROL AND DIABETIC RATS UNDER CONDITIONS OF CEREBRAL ISCHEMIA AND REPERFUSION

I. I. Zorina^a, A. S. Pechalnova^a, E. E. Chernenko^a, K. V. Derkach^a, and A. O. Shpakov^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences
Saint-Petersburg, Russia*

The search for natural biologically active substances that have a neuroprotective effect on cerebral ischemia-reperfusion is one of the urgent problems of modern neuroscience and medicine. Intranasally administered insulin (IAI) has a pronounced restorative effect on various neurodegenerative diseases, but the mechanisms of its action and therapeutic effects in cerebral ischemia have not been studied well, including in type 2 diabetes mellitus (DM2), which increases the risk of cerebrovascular dysfunction. The aim of the work was to study the effect of IAI on metabolic parameters and inflammatory factors in male rats with DM2 subjected to the two-vessel ischemia and prolonged forebrain reperfusion, in comparison with non-diabetic animals. A long-term high-fat diet with an injection of a low dose of streptozotocin (25 mg/kg) to rats was used to induce DM2, and a model of the global forebrain two-vessel ischemia induced by occlusion of both common carotids with prolonged reperfusion (IR) for 7 days was used to study cerebral ischemia. Two hours after the end of ischemia, rats were treated with IAI at a dose of 0.5 or 2.0 IU/rat, after which the drug was administered in the same doses daily for 7 subsequent days. It was found that IAI prevents body weight loss in both nondiabetic and diabetic rats that underwent IR, and also increases the total cholesterol level and the proportion of epididymal fat in rats without DM2 after IR. In DM2 rats that underwent IR, IAI in the explored doses reduces the level of postprandial glucose and insulin content in the blood, which indicates an improvement of glucose tolerance, and also reduces the levels of inflammatory factors in the blood – C-reactive protein (at a dose of 0.5 IU/rat/day) and tumor necrosis factor- α (in a dose of 2 IU/rat/day), which reveals its anti-inflammatory potential. Thus, the course treatment with IAI after induction of cerebral ischemia followed by reperfusion leads to an improvement of metabolic parameters and weakens inflammatory reactions in rats with DM2, which may be in demand in the correction of ischemic stroke in patients with DM2.

Keywords: brain ischemia, intranasal insulin, diabetes mellitus type 2, inflammation