

**ПОИСК ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ОКНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ
ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА У КРЫС
С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ
ЕГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ**

© 2025 г. И. И. Зорина^{1,*}, А. С. Печальнова¹, Е. Е. Черненко¹, Д. К. Аврова¹,
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 01.04.2025 г.

После доработки 22.04.2025 г.

Принята к публикации 24.04.2025 г.

Ишемия головного мозга представляет собой значимую медико-социальную проблему, вследствие чего актуальной является разработка эффективных нейропротекторов для ее коррекции. Поскольку ишемия мозга имеет сложный патогенез с длительным восстановительным периодом, то наибольший интерес представляют препараты с плеiotропным действием, в том числе интраназально вводимый инсулин (ИВИ), который, поступая в мозг, через центральные механизмы регулирует метаболизм, оказывает нейропротекторное и нейромодуляторное воздействие. ИВИ эффективен при нейродегенеративных заболеваниях, но данные о его нейропротекторном эффекте при церебральной ишемии фрагментарны. Целью работы был поиск “терапевтического окна” и оценка механизмов нейропротекторного эффекта ИВИ при его использовании у крыс с церебральной ишемией. ИВИ вводили крысам, перенесшим двухсосудистую ишемию переднего мозга, через 2 и 4 ч после эпизода ишемии в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки и далее ежедневно в течение 7 дней постишемического периода. Показано, что ИВИ более эффективен при обработке через 2 ч после ишемического эпизода в сравнении с его введением через 4 ч, несмотря на последующее семидневное введение. При введении через 2 ч ИВИ поддерживает экспрессию генов инсулинового сигналинга в гиппокампе. Он нормализует количество клеток в CA1-области гиппокампа, стимулирует экспрессию гена антиапоптотического белка Bcl-2 и снижает экспрессию генов *Gfap* и *Aif1*, маркеров астроцитов и микроглии, что свидетельствует о его противовоспалительном эффекте. Обнаружено, что ИВИ стимулирует активность тиреоидной системы, препятствуя развитию постишемического гипотиреоза, что также может вносить вклад в ИВИ-опосредуемую нейропротекцию. Все эти эффекты были слабо выражены или не выявлялись при введении ИВИ через 4 ч после ишемии. Таким образом, нами впервые описано “терапевтическое окно” для применения ИВИ при церебральной ишемии и оценены некоторые механизмы его нейропротекторного действия. Полученные данные открывают перспективы для разработки новых стратегий нейропротекции при ишемии мозга.

Ключевые слова: церебральная ишемия, интраназально вводимый инсулин, нейропротекция, воспаление, гиппокамп

ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт, обусловленный окклюзией церебральных сосудов, – одна из ведущих причин смертности и инвалидизации населения в мире [1]. Церебральная ишемия имеет многоступенчатый патогенез с длительным восстановительным периодом и затрагивает все клетки нервной ткани [2]. Особое место в патогенезе инсульта занимает нейровоспаление, активация которого показана уже в первые часы после ишемического эпизода. Глиальные клетки, включая микроглию, астроциты и олигодендроциты, участвуют в иммунной регуляции функций нервной ткани после инсульта [3]. При этом они могут оказывать как благотворное, так и негативное воздействие на мозг во время ишемии. Активированные микроглия и астроциты высвобождают воспалительные цитокины, которые повреждают нервную ткань, но могут выделять и нейротрофические факторы, например BDNF, наделенные защитным потенциалом. Активация астроцитов и астроглиоз при ишемическом инсульте способствуют ограничению повреждения мозга и восстановлению энергетического баланса в ЦНС. Реактивные астроциты и микроглия секретируют провоспалительные цитокины, хемокины и матриксные металлопротеиназы (например, MMP9), которые вносят существенный вклад в повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и рекрутируют лейкоциты из периферической крови, усиливая повреждение мозговой ткани [4, 5].

Дезорганизация центральных звеньев регуляции функционирования организма в ходе ишемии мозга сопровождается системными метаболическими и эндокринными нарушениями, которые усугубляют исход заболевания и повышают риск осложнений. Они связаны с активацией стрессовых нейрогормональных путей и с непосредственным воздействием церебральной ишемии на гомеостаз. Постинсультная активация симпатoadреналовой системы и увеличение секреции кортикостероидов приводят к ослаблению действия инсулина и развитию гипергликемии и могут стать причиной постишемического транзиторного гипотиреоза [6, 7]. Щитовидная железа является ключевым эндокринным органом, регулирующим энергетический метаболизм и термогенез, от ее активности зависят когнитивные функции. Для пациентов, находящихся в острой стадии соматических заболеваний, в том числе при тяжелом инсульте, описано развитие синдрома нетиреоидных заболеваний со снижением уровней общего и свободного трийодтиронина (tT3, fT3) при нормальном или низком уровне тиреотропного гормона [6, 7]. Это связывают с нарушением гипоталамической регуляции тиреоидной оси вследствие подавления секреции тиреолиберина. Кроме того, развивающееся системное воспаление угнетает конверсию тироксина (T4) в T3 [8]. Эти нарушения вносят значимый вклад в развитие метаболического стресса и приводят к эндокринным дисфункциям, замедляющим восстановление нервной ткани и реабилитацию при инсульте.

Стандартом терапии острого ишемического инсульта является реперфузия – восстановление кровотока в пораженном сосуде. Для этого применяют внутривенный тромболитизис рекомбинантным тканевым активатором плазминогена (rt-PA) и механическую тромбэктомия [9]. Однако эффективность этих методов ограничена временным “терапевтическим окном”: rt-PA может быть использован в течение 4.5 ч от начала симптомов, а тромбэктомия – в течение 6–24 ч, в зависимости от состояния коллатерального кровотока. Нейропротекторные стратегии, направленные на прерывание ишемического каскада, рассматриваются как важное дополнение к реперфузионной терапии. Несмотря на многообещающие результаты в доклинических исследованиях, большинство нейропротекторов (антагонисты NMDA-рецепторов, антиоксиданты, ингибиторы апоптоза) не были эффективны в клинических испытаниях или имели низкую степень доказательности [10]. Причинами этого могут быть позднее начало терапии, недостаточная проникаемость ГЭБ, системные побочные эффекты. Тем самым поиск соединений, способных повышать выживаемость нейронов и модулировать

реперфузионные повреждения, является приоритетным направлением фармакологической коррекции церебральной ишемии.

Действие инсулина традиционно связывают с регуляцией гомеостаза глюкозы. Однако в последние годы накоплены данные о его роли в регуляции функций ЦНС. В нейронах и глиальных клетках имеются все компоненты инсулиновой сигнальной системы, что обуславливает регуляцию инсулином пищевого поведения, когнитивных функций, периферического метаболизма, эндокринной и других систем [11]. Активация инсулиновых путей в мозге вовлечена в модуляцию синаптической пластичности и нейрогенеза, обеспечивает устойчивость нервных клеток к стрессовым воздействиям [12, 13].

При нейродегенерации и ишемии инсулин демонстрирует нейропротекторный эффект, включающий несколько механизмов – посредством активации Akt-киназы оказывает антиапоптотическое действие [13] и опосредует снижение аутофагической гибели клеток [14]; активацию системы антиоксидантной защиты [15, 16]; противовоспалительное действие, нормализует активность микроглии и астроцитов и ослабляет нейровоспаление [17–19]; восстановление метаболизма клеток [20, 21]. Наряду с этим инсулин снижает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), уменьшая уровень MMP9, вовлеченной в процессы воспаления, и демонстрирует антитромботические свойства, что обеспечивает сохранение целостности ГЭБ и способствует вторичной профилактике инсульта [22]. Таким образом, инсулин обеспечивает защиту и поддержку нервных и глиальных клеток в постишемический период, увеличивает кровоснабжение зоны инфаркта и вносит значимый вклад в сохранение когнитивных функций при инсульте.

Необходимо, однако, отметить, что системное введение инсулина сопряжено с риском гипогликемии. В связи с этим на первый план выходит интраназальный способ доставки инсулина в ЦНС, который представляет собой уникальную стратегию, позволяющую избежать системной абсорбции гормона и преодолеть ГЭБ. Эффективность и безопасность ИВИ основывается на многолетнем положительном опыте его применения для лечения болезни Альцгеймера и некоторых других нейродегенеративных заболеваний, а также для коррекции сахарного диабета [23, 24]. Преимуществами ИВИ являются безболезненность, отсутствие необходимости в специальном оборудовании или стерилизации, возможность доставить препарат непосредственно в мозг неинвазивно и быстро, а также допустимость самостоятельного применения пациентом в остром периоде еще до госпитализации. Фармакокинетика и фармакодинамика ИВИ детально изучены у грызунов [25, 26] и человека [23]. Пиковая концентрация в мозге достигается через 15–30 мин после интраназального введения инсулина, а действие гормона продолжается до 6 ч и не сопровождается гипогликемией. Попадая в ЦНС, инсулин связывается с инсулиновыми рецепторами, что приводит к активации 3-фосфоинозитидного пути, включающего IRS-белок, фосфатидилинозитол-3-киназу и Akt-киназу, а также ряд других сигнальных путей [25, 26]. На моделях ишемии у грызунов показано, что инсулин при введении в мозг до ишемии или сразу после нее уменьшает объем инфаркта, улучшает неврологический исход, снижает маркеры окислительного стресса [14, 15, 20, 21, 27, 28]. Однако введение ИВИ до ишемического эпизода малопригодно для медицины. Наряду с этим в настоящее время отсутствуют масштабные рандомизированные испытания ИВИ, не определены оптимальные дозы ИВИ и временные окна для его использования. Не выяснено, как время введения влияет на нейропротекторный эффект ИВИ и каковы молекулярные механизмы, опосредующие этот его эффект на разных сроках введения после эпизода ишемии. Целью настоящего исследования было оценить “терапевтическое окно” и нейропротекторный потенциал ИВИ в модели двухсосудистой ишемии мозга крыс, а также идентифицировать возможные механизмы его действия. ИВИ вводили в суточной дозе 0.5 МЕ/крыса через 2 и 4 ч после эпизода ишемии и далее продолжали введение ИВИ ежедневно

в той же дозе в течение 7 дней. В постишемическом периоде исследовали воздействие ИВИ на тиреоидную систему, которая может вносить значимый вклад в нейропротекторный эффект гормона. Полученные данные могут стать основой для разработки новых комбинированных протоколов лечения церебральной ишемии с помощью ИВИ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и материалы. Анализ уровня глюкозы в капиллярной крови проводили с помощью глюкометра и тест-полосок One Touch Ultra (США). Определение уровней тиреоидных гормонов (тТ3, тТ4, фТ3, фТ4) проводили с использованием коммерческих ИФА-наборов (ООО “Хема”, Россия). Экспрессии генов оценивали с использованием реактивов и наборов производства ЗАО “Евроген” (Россия).

Эксперименты проводили на самцах крыс Вистар (возраст 7–8 месяцев). Животных содержали в стандартных условиях вивария (12 ч день / 12 ч ночь) со свободным доступом к пище и воде. Перед индукцией церебральной ишемии у животных забирали кровь под местным наркозом и оценивали в ней уровни постпрандиальной глюкозы, тТ3, тТ4, фТ3, фТ4, рассчитывали индекс периферической конверсии (ИПК) как отношение фТ3 к фТ4.

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией [29]. Для наркоза использовали наркозный аппарат Minor Vet Optima с испарителем ТЕС 3 (Zoomed, Россия) и изофлуран (Karizoo, Испания): 5%-ная газовая смесь для индукции наркоза и 2.5%-ная газовая смесь для поддержания наркоза. Животных помещали на подогреваемый столик, температура тела контролировалась с помощью ректального датчика температуры и поддерживалась на уровне 37–38 °С. У животных выделяли правую бедренную артерию и обе общие сонные артерии. Далее с использованием катетера 1.0 × 0.6 × 210 мм, 23G (SciCat, Россия) 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. Затем с помощью сосудистых зажимов пережимали кровоток через общие сонные артерии на 10 мин для индукции двухсосудистой ишемии переднего мозга. По истечении указанного времени восстанавливали мозговой кровоток для осуществления реперфузии и вводили отобранную ранее кровь со скоростью 1.5–2 мл/мин. Далее сшивали мягкие ткани с помощью стерильной полиамидной антимикробной хирургической нити для ветеринарии Polycon №000 (“Тонзос-95”, Болгария). Раневую поверхность обрабатывали комбинированным антимикробным порошком “Банеоцин” (Sandoz, Австрия), швы обрабатывали 5%-ным спиртовым раствором йода. В послеоперационный период у животных ежедневно контролировали физическое состояние и состояние швов. В качестве контроля использовали ложнооперированных крыс (SO), которым проводили выделение артерий, но без гипотензии и окклюзии. ИВИ (рекомбинантный инсулин человека USP grade USP RS, США), в форме раствора в цитратном буфере (0.1 М, рН 4.5), вводили в дозе 0.5 МЕ/крыса по 10 мкл в каждую ноздню через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно в 10:00 1 раз/сут до конца эксперимента, суммарно в течение 7 дней. SO-животным интраназально вводили цитратный буфер в том же объеме. Формировали и изучали следующие группы ($n = 6–8$ в каждой группе): С – интактные крысы; SO – ложнооперированные крысы; IschR – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; IschR-Ins-2 и IschR-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии соответственно. На 7-е сутки определяли уровни постпрандиальной глюкозы, тТ3, тТ4, фТ3, фТ4, рассчитывали ИПК, осуществляли взятие тканей мозга. Эвтаназия проводилась при наркотизации животных инъекцией хлоральгидрата (400 мг/кг массы тела, в/б) путем декапитации на гильотине. Мозг после декапитации животных разделяли

сагиттально на два полушария, одно фиксировали для исследования количества клеток в CA1-области гиппокампа окрашиванием по Нисслю, другое использовали для исследования экспрессии генов методом ПЦР.

Оценка количества клеток в CA1-области гиппокампа. Одно полушарие мозга фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида на 0.1 М натрий-фосфатном буфере (PBS) в течение 7 дней, затем инкубировали в 30%-ном растворе сахарозы в 0.1 М PBS в течение 7 дней для криопротекции. После этого ткани мозга замораживали в изопентане при $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$, готовили срезы (10 мкм) с помощью криостата (Leica, Германия) (три среза с координатами Bregma -2.8 , -3.3 и -3.8 мм) [30]. Монтировали чередующиеся серии срезов на предметные стекла, покрытые желатином, и далее окрашивали по Нисслю (“БиоВитрум”, Россия). Фиксацию изображений CA1-области гиппокампа проводили с помощью светооптического микроскопа NU-2 (Carl Zeiss, Германия) со встроенной видеокамерой Imager 4.1 и программным обеспечением для захвата изображения AxioVision-4.7.2. Подсчет количества клеток осуществляли с помощью программы ImageJ на участке гиппокампа длиной 300 мкм при увеличении $\times 20$.

Изучение экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени. Из второй половины мозга извлекали ткани гиппокампа и осуществляли выделение тотальной РНК фенол-хлороформной экстракцией с помощью реагента Extract RNA (ЗАО “Евроген”). После выделения измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре EzDrop 1000C (Blue-Ray Biotech, Китай). Рассчитывали отношение оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм, которое находилось в диапазоне 1.9–2.2, а также рассчитывали отношение при длинах волн 260 и 230 нм, свидетельствующее о содержании органических соединений, которое составило ≥ 1.8 . При отклонении от данных диапазонов проводили повторную отмывку РНК от примесей 3М ацетатом натрия и затем переосаждали РНК с помощью 75%-ного этанола. Образец, содержащий 1 мкг РНК, подвергали обратной транскрипции с использованием набора MMLV-RT kit (ЗАО “Евроген”) и Random Hexamer Primer в соответствии с инструкцией производителя. Для очистки проб от примесей геномной ДНК все образцы РНК предварительно обрабатывали ДНКазой E (ЗАО “Евроген”). Реакцию ПЦР амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 нг продукта после обратной транскрипции, 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров и реагента qPCRMix-HS SYBR+LowROX (ЗАО “Евроген”) на приборе 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения 7500 Software v 2.0.6. и Expression Suite Software v1.0.3 (Thermo Fisher Scientific). Для расчета экспрессии целевого гена использовали метод $\Delta\Delta\text{CT}$ [31]: $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{целевой ген}} - \text{CT}_{\text{эндогенный контроль}}$; $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{образец}} - \Delta\text{CT}_{\text{контроль}}$; $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, где CT – значение порогового цикла (cycle threshold), на котором детектировано значительное увеличение ΔRn . В качестве эндогенного контроля использовали гены 18S рРНК (*18S rRNA*), b-актин (*Actb*) и гипоксантин фосфорибозилтрансферазы-1 (*Hprt1*). Все данные представлены в виде относительных единиц уровня мРНК целевого гена (RQ), расчет которых проводили по отношению к группе интактных животных (группа C).

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.0.1. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения двух и более независимых выборок с нормальным распределением – однофакторный дисперсионный анализ с применением критерия Бонферрони для множественных сравнений. Для сравнения двух и более независимых выборок с распределением, отличающимся от нормального, применяли критерий Крускала–Уоллиса с использованием критерия Данна для множественных сравнений. Данные, имеющие нормальное распределение, представлены в виде $M \pm SEM$, в то время как данные, имеющие распределение, отличающееся от нормального, представлены в виде медианы и 25-го, 75-го процентиля. Достоверными в обоих случаях считали отличия при $p < 0.05$.

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени

№	Ген (продукт), NCBI номер	Последовательность	
		For 5'-3'	Rev 5'-3'
1	<i>18S rRNA</i> (18S rRNA) NM_046237.1	GGACACGGACAGGATTGACA	ACCCACGGAATCGAGAAAGA
2	<i>Actb</i> (б-актин)	GCGAGTACAACCTTCTTGCAG	CTGACCCATACCCACCATCAC
3	<i>Hprt1</i> (гипоксантин фосфорибозилтрансфераза-1)	GCGAAAGTGGAA AAGCCAAGT	GCCACATCAACAGGACTCTTGTA
4	<i>Insr</i> (InsR) NM_017071.2	CTGGAGAACTGCTCGGTCAAT	GGCCATAGACACGGAAAAGAAG
5	<i>Irs2</i> (IRS2) NM_001168633.1	TGGCTGCGATGACAAC TACG	CCGGACGACTGACTCTTGCT
6	<i>Akt1</i> (Akt1) NM_033230.2	TTCACAGCTCAGATGATCACCAT	CTCCGTTCCTGTCCACACACT
7	<i>Ptpn1</i> (PTP1B) NM_012637.2	CAACCGAGGAGGAACAAAAGG	CAGTCTGTCAAGTAAAACATACCCG
8	<i>Bax</i> (Bax) Nm_017059.2	TAGCAAAC TGGTGTCAAGG	TCTTGGATCCAGACAAGCAG
9	<i>Bcl2</i> (Bcl-2) nm_016993.1	TGGGATGCCTTTGTGGAAC TAT	AGAGACAGCCAGGAGAAAATCAAAC
10	<i>Tnfa</i> (TNF α) NM_012675.3	TATGGCCCAGAC CCTCACA	GGAGTAGACAAG GTACAACCCATC
11	<i>Il1b</i> (IL1 β) NM_031512.2	CCCATTAGACAG CTGCACT	CCATTGAGGTGG AGAGCT T
12	<i>Il6</i> (IL6) NM_012589.2	AGAGACTTCCAGCCAGTTGC	AGCCTCCGACTTGTGAAGTG
13	<i>Mmp9</i> (MMP9) NM_031055.2	GCCGGGAACGTATCTGGAAA	GGTTGTGGAAACTCACACGC
14	<i>Gfap</i> (GFAP) NM_017009	GGCCACCAGTAACATGCAA	CAGTTGGCGCGATAGTCAT
15	<i>Aif1</i> (IBA-1) NM_017196.3	GCAGCCTCATCGTCACT	CTCTCTTCCTGTTGGGCTT
16	<i>Bdnf</i> (BDNF) XM_006234684.5	AAACGT CCACGG ACAAGGCA	TTCTGGTCTCA TCCAGCAGC

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки нейропротекторного действия ИВИ, вводимого через разные промежуточные времени после окончания ишемии, проводили подсчет количества живых клеток в СА1-области гиппокампа, зоне мозга наиболее уязвимой к ишемии в используемой экспериментальной модели (рис. 1). Церебральная ишемия привела к выраженной гибели клеток в СА1-области гиппокампа по сравнению с SO ($p < 0.01$) (рис. 1a). На массовую клеточную гибель указывают многочисленные деформированные тела клеток, потерявшие округлую форму и приобретающие более интенсивную окраску (рис. 1b, 2). Более раннее введение ИВИ ишемическим крысам, через 2 ч после ишемии, повышало количество недеформированных клеток в исследуемой области мозга до уровня у SO-крыс ($p < 0.01$). Такое введение было более эффективным, чем обработка ИВИ через 4 ч после эпизода ишемии, при которой показано отсутствие изменений в количестве жизнеспособных клеток по сравнению с группой IschR-крыс, а также количество живых клеток было достоверно ниже по сравнению с группой IschR-Ins-2 ($p < 0.05$). Необходимо отметить, что в группе IschR-Ins-4 были выявлены животные ($n = 3$), у которых гибель клеток в СА1-области гиппокампа проходила по закону “все или ничего”, т.е. в случае полной гибели клеток в этой зоне на препарате не выявлялось ни одной клетки с морфологией, характерной для жизнеспособной клетки (округлое ядро, выраженное ядрышко). Однако подобного явления не было отмечено в группе с более ранним введением инсулина.

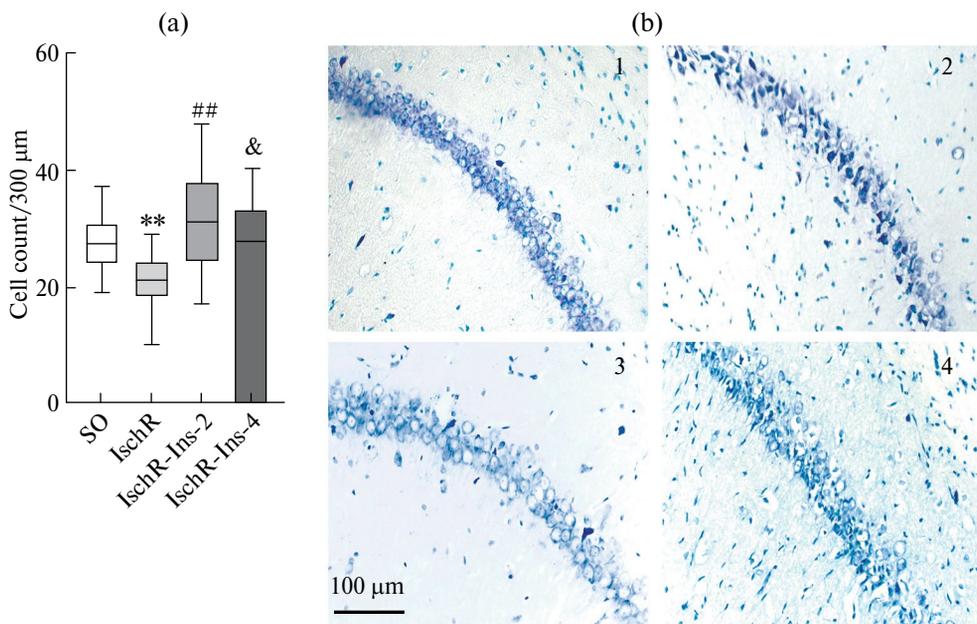


Рис. 1. Влияние интраназально вводимого инсулина на выживаемость клеток в СА1-области гиппокампа на 7-е сутки после перенесенной двухсосудистой ишемии/реперфузии переднего мозга. (a) – Гистограмма, отражающая количество Ниссель-позитивных клеток в СА1-области гиппокампа. Подсчет клеток проводился на участке 300 мкм, увеличение $\times 20$. Данные представлены в виде графиков box-and-whiskers (линия в середине – медиана, границы ящика – 25-й и 75-й перцентили, концы усов – минимальное и максимальное наблюдаемые значения), $n = 6$ во всех группах, проанализировано по 15–20 снимков для каждой области. **, ## – различия достоверны при $p < 0.01$; & – различия достоверны при $p < 0.05$. SO – ложнооперированные крысы; IschR – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; IschR-Ins-2 и IschR-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие инсулин интраназально в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно на протяжении 7 дней соответственно. (b) – Микрофотографии срезов мозга СА1-области гиппокампа. Окрашивание по Нисселю, увеличение $\times 20$, масштаб 100 μm . Обозначения: 1 – SO; 2 – IschR; 3 – IschR-Ins-2; 4 – IschR-Ins-4.

Методом ПЦР была оценена экспрессия ряда генов в гиппокампе крыс (рис. 2–5). На рис. 2 представлена экспрессия генов, кодирующих компоненты инсулинового сигналинга: рецептор инсулина (*Insr*), субстрат-2 рецептора инсулина IRS2 (*Irs2*), характерный для ЦНС, протеинкиназу Akt1 (*Akt1*), тирозиновую протеинфосфатазу PTP1B (*Ptpn1*). На 7-е сутки после начала реперфузии в группе IschR повышалась экспрессия генов *Insr* и *Ptpn1* по сравнению с SO ($p < 0.01$), но не было выявлено изменений в экспрессии генов *Irs2* и *Akt1*. В группе IschR-Ins-2 уровни экспрессии *Insr* и *Ptpn1* оставались повышенными по сравнению с SO, и было показано увеличение экспрессии *Irs2* по сравнению с IschR ($p < 0.05$). Изменения в экспрессии гена *Akt1* отсутствовали. Введение инсулина через 4 ч после ишемии не меняло экспрессию изученных генов (рис. 2).

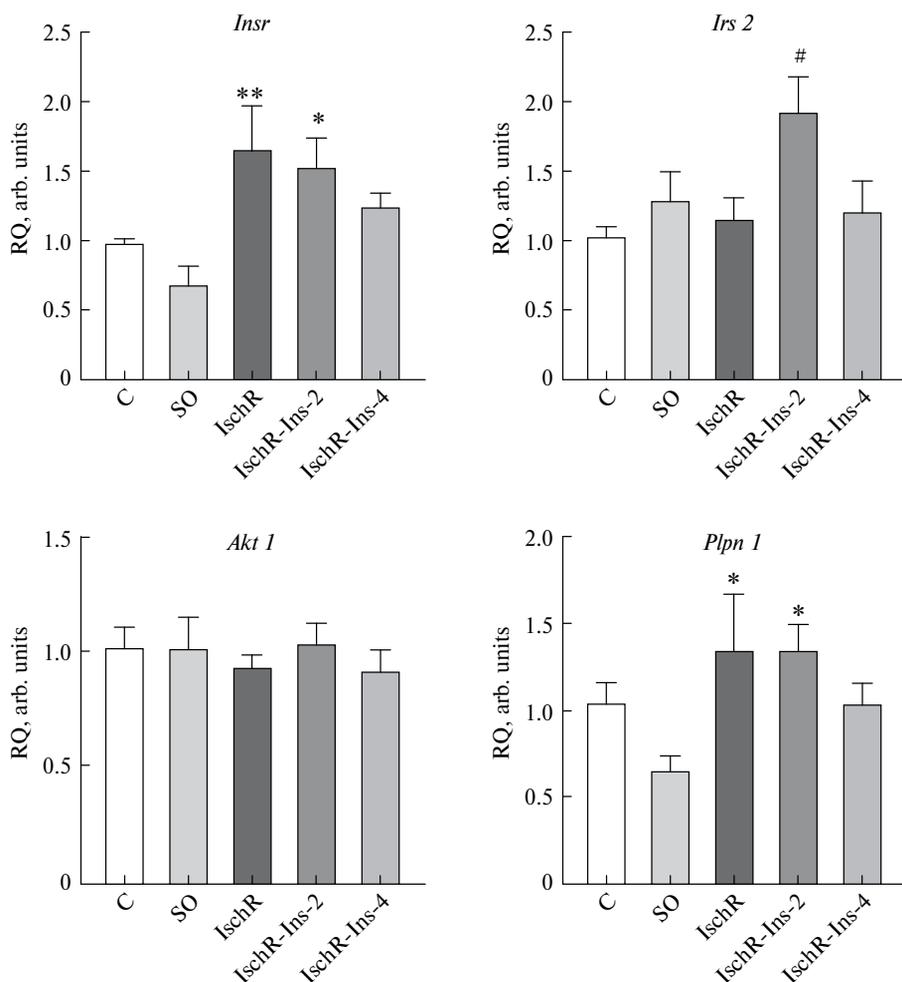


Рис. 2. Экспрессия генов рецептора инсулина (*Insr*), субстрата-2 рецептора инсулина IRS2 (*Irs2*), протеинкиназы Akt1 (*Akt1*) и фосфатазы PTP1B (*Ptpn1*) в гиппокампе крыс на 7-е сутки после перенесенной двухсосудистой ишемии/реперфузии переднего мозга и влияние на нее интраназально вводимого инсулина. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах). * и ** – различия достоверны с группой SO при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно; # – различия достоверны с IschR при $p < 0.05$. C – интактные крысы; SO – ложнооперированные крысы; IschR – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; IschR-Ins-2 и IschR-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие инсулин интраназально в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно на протяжении 7 дней соответственно.

По сравнению с SO-крысами в гиппокампе IschR-крысы была повышена экспрессия генов как проапоптотического белка *Bax*, так и антиапоптотического белка *Bcl-2*, но не менялось их соотношение *Bax/Bcl2* (рис. 3). При обработке ИВИ уровень экспрессии *Bax* оставался на уровне IschR-крысы, но повышалась экспрессия *Bcl2* в группе крыс, получавших ИВИ через 2 ч (но не через 4 ч) после эпизода ишемии, по сравнению как с SO, так и с IschR группами. В группе IschR-Ins-2 также снижалось соотношение *Bax/Bcl2*, что указывает на преобладание экспрессии гена антиапоптотического белка *Bcl-2* (рис. 3).

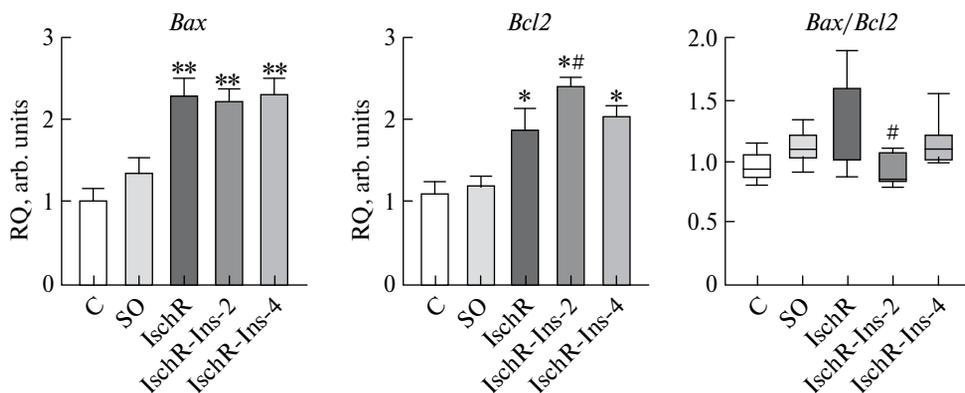


Рис. 3. Экспрессия генов проапоптотического белка *Bax* (*Bax*) и антиапоптотического белка *Bcl-2* (*Bcl2*), а также их соотношения *Bax/Bcl2* в гиппокампе крыс на 7-е сутки после перенесенной двухсосудистой ишемии/реперфузии переднего мозга, и влияние на нее интраназально вводимого инсулина. Во всех группах $n = 6$. Данные, распределенные нормально, представлены в виде $M \pm SEM$. Данные, имеющие распределение, отличающееся от нормального, представлены в виде графиков box-and-whiskers (линия в середине – медиана, границы ящика – 25-й и 75-й перцентили, концы усов – минимальное и максимальное наблюдаемые значения). * и ** – различия достоверны с группой SO при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно; # – различия достоверны с IschR при $p < 0.05$. C – интактные крысы; SO – ложнооперированные крысы; IschR – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; IschR-Ins-2 и IschR-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие инсулин интраназально в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно на протяжении 7 дней соответственно.

У крыс, перенесших ишемию/реперфузию, в гиппокампе повышена экспрессия нейротрофического фактора мозга BDNF (*Bdnf*) независимо от обработки ИВИ (рис. 4). В группе IschR-крысы без обработки ИВИ выявлено почти четырехкратное повышение экспрессии гена глиального фибриллярного кислого белка GFAP (*Gfap*) ($p < 0.01$) и более чем двукратное увеличение экспрессии гена маркера активации микроглии ИВА-1 (*Aif1*) ($p < 0.01$) (рис. 3). Введение инсулина через 2 ч после эпизода ишемии снижало экспрессию *Gfap* и *Aif1* по сравнению с IschR-крысами ($p < 0.05$) (рис. 4). Однако обработка крыс ИВИ через 4 ч после эпизода ишемии повышала экспрессию *Gfap* и *Aif1* не только по сравнению с группой IschR-Ins-2 ($p < 0.05$), но и с группой IschR, в которой крысы не получали ИВИ ($p < 0.01$).

Далее изучали экспрессию генов цитокинов $IL1\beta$ (*Il1b*), $IL6$ (*Il6*), $TNF\alpha$ (*Tnfa*) и матриксной металлопротеиназы MMP9 (*Mmp9*) в гиппокампе крыс. На 7-й день после ишемии/реперфузии переднего мозга в гиппокампе крыс показано увеличение экспрессии всех исследуемых маркеров по сравнению с SO (рис. 5). При обработке ИВИ повышенный уровень экспрессии *Il1b* и *Tnfa* сохранялся. Экспрессия генов *Il6* и *Mmp9* при введении ИВИ через 2 ч (но не через 4 ч) после эпизода ишемии не отличалась от группы SO, хотя и не отличалась от группы IschR.

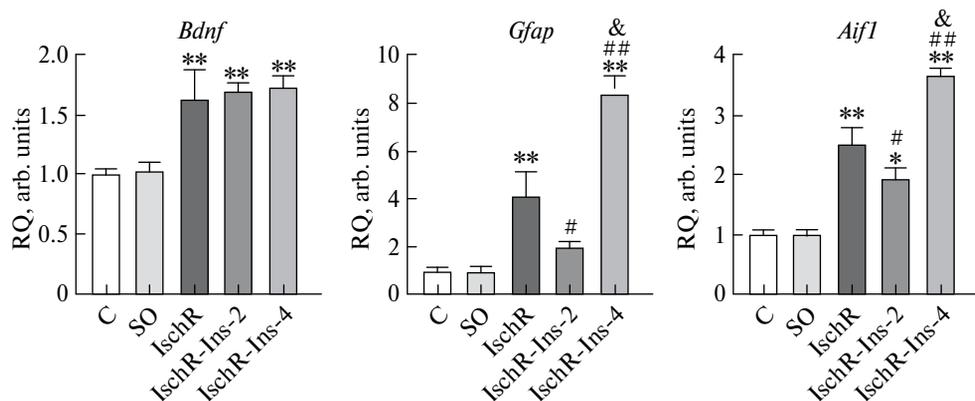


Рис. 4. Экспрессия генов нейротрофического фактора мозга BDNF (*Bdnf*), глиального фибриллярного кислого белка GFAP (*Gfap*) и маркера микроглии IBA-1 (*Aif1*) в гиппокампе крыс на 7-е сутки после перенесенной двухсосудистой ишемии/реперфузии переднего мозга, и влияние на нее интраназально вводимого инсулина. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах). * и ** – различия достоверны с группой SO при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно; # и ## – различия достоверны с IschR при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно; & – различия достоверны с IschR-Ins-2 при $p < 0.05$. C – интактные крысы; SO – ложнооперированные крысы; IschR – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; IschR-Ins-2 и IschR-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие инсулин интраназально в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно на протяжении 7 дней соответственно.

Для анализа системного действия ИВИ и его влияния на метаболизм оценивали уровень постпрандиальной глюкозы, содержание тиреоидных гормонов в крови крыс и рассчитывали ИПК на 7-й день после индукции ишемии/реперфузии (табл. 2). В ходе эксперимента ни в одной группе не было выявлено изменений уровня постпрандиальной глюкозы (табл. 2). Анализ уровней fT3 и fT4 в плазме крови крыс позволил выявить быстрые изменения в гормональном статусе тиреоидной системы. По сравнению с группой SO у крыс, перенесших IschR, показано снижение уровня fT3 на 18%, повышение уровня fT4 на 10%, а также снижение ИПК на 27%. В группе IschR также отмечено снижение уровня fT3 на 30%, в то время как уровень fT4 существенно не менялся (табл. 2). Введение ИВИ через 2 ч (но не через 4 ч) после окончания ишемии повышало уровни свободных форм тиреоидных гормонов и значение ИПК по сравнению с группой IschR. Более того, содержание fT3 и fT4 в крови крыс группы IschR-Ins-2 было выше ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно), чем в группе SO, в то время как ИПК между группами IschR-Ins-2 и SO не различался.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Острое уменьшение церебральной перфузии и связанный с ишемией дефицит энергетических ресурсов в мозговой ткани индуцируют активацию комплекса компенсаторных механизмов. По современным данным, интегративный ответ на острую церебральную ишемию формируется посредством скоординированного взаимодействия нервной, иммунной и эндокринной систем. Ключевое значение в этом принадлежит сигнальным путям, активируемым гуморальными факторами (гормоны, факторы роста, цитокины), обладающими функциональными характеристиками нейропротекторов и/или нейромодуляторов [32]. К отсроченным патологическим проявлениям ишемического повреждения относят нейровоспалительные процессы, обусловленные патологической активацией клеток глии и иммунокомпетентных клеток, дисфункцию микроциркуляторного русла мозга, дезинтеграцию ГЭБ, прогрессирующую гибель

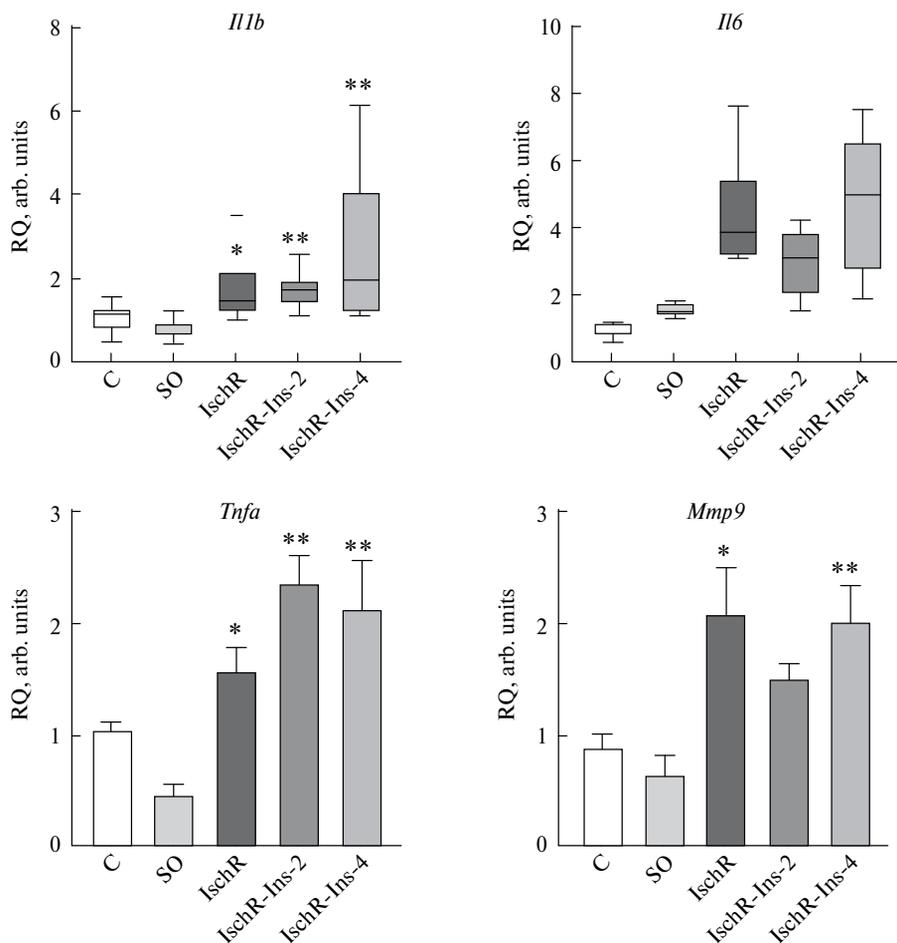


Рис. 5. Экспрессия генов цитокинов IL1 β (*Il1b*), IL6 (*Il6*), TNF α (*Tnfa*) и матричной металлопротеиназы MMP9 (*Mmp9*) в гиппокампе крыс на 7-е сутки после перенесенной двухсосудистой ишемии/реперфузии переднего мозга и влияние на нее интраназально вводимого инсулина. Во всех группах $n = 6$. Данные, распределенные нормально, представлены в виде $M \pm SEM$. Данные, имеющие распределение, отличающееся от нормального, представлены в виде графиков box-and-whiskers (линия в середине – медиана, границы ящика – 25-й и 75-й перцентили, концы усов – минимальное и максимальное наблюдаемые значения). * и ** – различия достоверны с группой SO при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно. C – intactные крысы; SO – ложнооперированные крысы; Ischr – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; Ischr-Ins-2 и Ischr-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие инсулин интраназально в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно на протяжении 7 дней соответственно.

клеток и нейродегенерацию [2, 3, 5]. Важным аспектом патофизиологии ишемических состояний является индукция стойких метаболических нарушений в периферических тканях, имеющих системный характер, в том числе в тироидной системе [6–8].

На 7-е сутки после ишемии/реперфузии мы оценили количество клеток в CA1-области гиппокампа с морфологией, характерной для жизнеспособных клеток. У Ischr-крыс была обнаружена выраженная гибель клеток в этой области мозга, тогда как при обработке крыс ИВИ через 2 ч после эпизода ишемии количество жизнеспособных клеток не отличалось от группы ложнооперированных животных. Тем самым ИВИ способствовал восстановлению клеток гиппокампа до жизнеспособного состояния (рис. 1).

Таблица 2. Уровень глюкозы и гормональные показатели в крови крыс на 7-е сутки после перенесенной двухсосудистой ишемии/реперфузии переднего мозга и влияние на них интраназально вводимого инсулина

Показатель	C	SO	IschR	IschR-Ins-2	IschR-Ins-4
Глюкоза, ммоль/л	6.0 ± 2.3	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.7 ± 0.1	5.3 ± 0.2
fT3, пмоль/л	3.62 ± 0.08	3.57 ± 0.16	2.94 ± 0.18*	4.31 ± 0.16*, ^{##}	3.41 ± 0.17 ^{&}
tT3, нмоль/л	3.59 ± 0.25	4.20 ± 0.19	2.93 ± 0.35*	3.58 ± 0.35	3.70 ± 0.36
fT4, пмоль/л	24.7 ± 0.4	25.1 ± 0.5	27.7 ± 1.1*	30.6 ± 0.8*, [#]	27.4 ± 0.8 ^{&}
tT4, нмоль/л	62.9 ± 6.1	59.8 ± 6.9	62.0 ± 4.8	67.1 ± 5.7	79.8 ± 8.5
ИПК, усл. ед.	0.146 ± 0.003	0.143 ± 0.008	0.105 ± 0.006**	0.141 ± 0.004 ^{##}	0.126 ± 0.008

Примечания. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 8$ во всех группах). * и ** – различия достоверны по сравнению с группой SO при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно; # и ^{##} – различия достоверны по сравнению с группой IschR при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно; & – различия достоверны по сравнению с группой IschR-Ins-2 при $p < 0.05$. fT3 и tT3 – общий трийодтиронин и тироксин. ИПК – индекс периферической конверсии, рассчитанный как отношение свободного T3 (fT3) к свободному T4 (tT4). C – интактные крысы; SO – ложнооперированные крысы; IschR – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию; IschR-Ins-2 и IschR-Ins-4 – крысы, перенесшие ишемию/реперфузию и получавшие инсулин интраназально в дозе 0.5 МЕ/крыса/сут через 2 и 4 ч после окончания ишемии и далее ежедневно на протяжении 7 дней соответственно.

По данным ПЦР, в гиппокампе IschR-крыс, получавших ИВИ, снижалось соотношение экспрессии генов проапоптотического белка *Bax* к антиапоптотическому белку *Bcl-2* (рис. 3), *Bax/Bcl2*, что свидетельствует о вкладе ИВИ-опосредованного ослабления апоптотического пути в повышение выживаемости гиппокампальных клеток. Наши предыдущие данные и сведения литературы о действии ИВИ при геморрагическом инсульте указывают на то, что предобработка ишемических крыс ИВИ снижает гибель клеток в СА1-области гиппокампа, и это может быть связано не только с подавлением апоптоза, но и аутофагии [14, 18, 27]. Оставалось неясным, способен ли ИВИ при его введении после индукции ишемии, в условиях, более релевантных клиническим, повышать выживаемость клеток. Описываемый нами эксперимент впервые показал, что ИВИ эффективен при раннем введении, через 2 ч после эпизода ишемии, но не при более позднем, через 4 ч, что указывает на “терапевтическое окно” применения ИВИ. Ранее было описано “терапевтическое окно” для интраназально вводимого инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и показано, что он более эффективен при введении через 1 ч после ишемического эпизода в модели неонатальной гипоксии-ишемии [33, 34]. Так, IGF-1 снижает апоптотическую гибель клеток через посредство активации Akt-зависимого сигналинга и усиливает пролиферацию клеток-предшественников нейронов и олигодендроцитов, тем самым улучшая неврологические функции [33, 34].

Распределяясь по ЦНС после интраназального введения, инсулин связывается со специфичными к нему инсулиновыми рецепторами и активирует инсулиновую сигнальную систему в нейронах и глиальных клетках. Дальнейшая активация Akt- и MAPK-зависимых каскадов является ключевым этапом в реализации защитного действия инсулина и компенсаторных процессов в подострый период ишемии головного мозга [13]. Нами установлено, что на 7-е сутки после ишемии/реперфузии в гиппокампе ишемических крыс экспрессия гена рецептора инсулина *Insr* была значимо повышена (рис. 2), что, вероятно, свидетельствует об активации инсулин/IGF-1-зависимых

сигнальных каскадов, необходимых для реализации механизмов нейропротекции [13, 33, 34]. Введение крысам ИВИ через 2 ч после ишемического эпизода и дальнейшая семидневная обработка гормоном сохраняли повышенный уровень экспрессии гена *Insr*, что необходимо для реализации механизмов ИВИ-индуцированной нейропротекции. Кроме того, та же стратегия применения ИВИ приводила к повышению экспрессии гена *Irs2*, кодирующего ключевой трансдукторный компонент инсулиновой сигнальной системы в ЦНС (рис. 2), и это может свидетельствовать об активном функционировании InsR/IRS2/Akt1-пути в клетках гиппокампа ишемических крыс, получавших ИВИ. Мы не выявили изменений экспрессии гена *Akt1* ни в одной экспериментальной группе (рис. 2), однако это не свидетельствует об отсутствии изменений функциональной активности фермента, что требует дополнительных исследований.

Негативное влияние на проведение инсулинового сигнала в ЦНС вносит развивающееся в постишемический период нейровоспаление. Следствием нейровоспаления и повышенной экспрессии/уровня провоспалительных цитокинов является усиление активности фосфатаз, в частности, тирозиновой фосфатазы PTP1B и гидролизующей 3-фосфоинозитиды фосфатазы PTEN, ослабляющих инсулиновый сигналинг [35], что может привести к центральной инсулинорезистентности и нейродегенерации [36]. Согласно нашим данным, после ишемии в гиппокампе крыс наблюдается значительное усиление экспрессии гена *Ptpn1*, кодирующего PTP1B (рис. 2). При этом введение ИВИ существенно не влияет на экспрессию этого гена, что может быть обусловлено компенсаторным поддержанием повышенного уровня экспрессии фосфатазы PTP1B в условиях длительной активации инсулиновой системы гиппокампа инсулином.

Нейровоспаление является ключевым фактором нейродегенерации после инсульта, и оно в значительной степени модулируется взаимодействием между астроцитами и другими клетками, участвующими в реализации процессов воспаления [3]. В контексте церебральной ишемии было высказано предположение, что микроглия в первую очередь реагирует на многие сигналы о травме, что приводит к высвобождению цитокинов и реактивному астроглиозу [4]. Реактивные астроциты усугубляют воспалительную реакцию, высвобождая большое количество провоспалительных факторов, которые влияют на жизнеспособность нейронов [5]. Мы обнаружили повышение экспрессии как *Gfap*, маркера активации астроцитов, так и *Aif1*, маркера активированной микроглии (рис. 4), а также значительный рост экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Il1b*, *Il6* и *Tnfa* в гиппокампе ишемических крыс (рис. 5). Это свидетельствует об усилении нейровоспаления в гиппокампе при IschR и является одной из причин гибели нейронов (рис. 1). Нами показано повышение экспрессии гена матриксной металлопротеиназы-9 *Mmp9*, которая синтезируется клетками нервной ткани, в том числе нейронами, и действие которой связано с развитием отека мозга, активацией нейровоспаления и нарушением целостности ГЭБ [37, 38].

Инсулин-индуцированная активация Akt-сигнального пути оказывает антиапоптотическое действие, связанное со снижением синтеза проапоптотического белка *Bax* и усилением экспрессии антиапоптотического белка *Bcl-2* [27, 39]. В настоящем исследовании при ранней обработке крыс ИВИ мы также обнаружили снижение соотношения *Bax/Bcl2* (рис. 3). Другим компонентом, вносящим вклад в защиту клеток от дегенерации и гибели в постишемический период, является фактор BDNF и его сигнальные каскады [40]. В гиппокампе ишемических животных, независимо от обработки ИВИ, сохранялся одинаково высокий уровень экспрессии *Bdnf* по сравнению с SO, что указывает на запуск BDNF-зависимых механизмов в условиях IschR и их сохранении при обработке ИВИ (рис. 4).

Ранее нами и другими авторами было описано противовоспалительное действие инсулина, в том числе ИВИ [17, 18, 21]. Косвенно о противовоспалительном эффекте ИВИ мы можем судить по изменениям уровня экспрессии генов белков GFAP и IBA-1, маркеров активации астроцитов и микроглии, которые способны продуцировать множество провоспалительных цитокинов и факторов в остром и подостром периоде

ишемии. Обработка крыс ИВИ через 2 ч после окончания ишемии снижала экспрессию генов белков GFAP и IBA-1 в гиппокампе ишемических крыс, что сопровождалось снижением экспрессии генов *I16* и *Mmp9*. Важно отметить, что введение инсулина через 4 ч после эпизода ишемии, напротив, усиливало экспрессию *Gfap* и *Aif1*, и это согласуется с повышенными уровнями экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* и *Mmp9*. В одной из работ показано снижение уровня TNF α у мышей, получавших ИВИ, в модели геморрагического инсульта [20]. Также показано, что ИВИ снижает экспрессию и других провоспалительных цитокинов [17] и MMP9 [19, 22]. Подобный эффект ИВИ может быть обусловлен сохранением целостности ГЭБ, предотвращением отека мозга, замедлением процессов воспаления.

Для изучения системного действия ИВИ при церебральной ишемии/реперфузии мы провели исследование состояния тиреоидной системы (табл. 2), активность которой отражает энергетическое состояние организма и регулируется гипоталамо-гипофизарной системой. Недостаток тиреоидных гормонов увеличивает риск инсульта, а при возникновении инсульта ухудшает его исход [6, 7]. С этой точки зрения поиск эффективных нейропротекторов у больных с гипотиреозом представляется актуальной задачей. Нами показано, что постинсультный период характеризуется снижением активности тиреоидной системы и развитием гипотиреоза, на что указывают уменьшение уровней fT3 и tT3 и показателя ИПК (табл. 2), что подтверждается данными других авторов и является маркером более тяжелого исхода ишемии [6, 7, 41]. Повышение уровня стресса в ответ на острую ишемию мозга приводит к угнетению гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси кортикостероидами, что ведет к снижению секреции тиролиберина и ослаблению гормон-продуцирующей функции щитовидной железы [6, 42]. Среди механизмов развития гипотиреоза выделяют: уменьшение активности тканевых дейодиназ [43] и связанное с этим снижение ИПК, а также системное воспаление и стрессовые воздействия [42], которые имеют место и при церебральной ишемии.

Мы впервые показали, что ИВИ при введении через 2 ч после ишемии и при последующем семидневном введении крысам повышает уровни всех исследуемых гормонов тиреоидной системы, кроме tT4. Более позднее введение инсулина после ишемического эпизода не было эффективным (табл. 2). Ранее нами было показано, что семидневная обработка крыс ИВИ препятствует потере массы тела крыс, перенесших церебральную ишемию/реперфузию [21], и, по-видимому, этот эффект связан с его активирующим влиянием на гипоталамо-гипофизарно-тиреоидную ось. Следует отметить, что инсулин может оказывать анксиолитическое действие и снижать активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [44], а это в свою очередь оказывает положительное влияние на функционирование тиреоидной оси. Активирующее действие ИВИ на тиреоидную систему ранее показано нами при длительной обработке (28 и 135 дней) крыс с сахарным диабетом 1-го типа [45]. Более того, в гипоталамусе, который является одной из основных мишеней инсулина, инсулин способен стимулировать синтез и секрецию тиролиберина [46], в то время как ослабление сигналинга инсулина в гипоталамусе приводит к снижению синтеза тиролиберина и развитию гипотиреоза [6, 42]. Поддержание эутиреоидного статуса при церебральной ишемии необходимо для повышения выживаемости нервной ткани. Эксперименты на животных показали, что обработка тиреоидными гормонами снижает размер инфаркта и улучшает неврологические функции [43, 47]. Следует отметить, что под контролем тиреоидных гормонов находится и синтез нейротрофинов, в том числе BDNF, антиапоптотических факторов и цитокинов [48], которые напрямую задействованы в механизмах нейропротекции при ишемии мозга с последующей реперфузией.

Интересными оказались полученные нами результаты по эффекту обработки крыс ИВИ через 4 ч после эпизода ишемии. Более позднее введение инсулина не только не оказало защитного действия на выживаемость нейронов гиппокампа ишемических крыс, но, напротив, усугубило процессы нейровоспаления. На это указывают данные

о повышении экспрессии генов маркеров активированных астроцитов и микроглии, *Gfap*, *Aif1* (рис. 4) по сравнению с группой ишемических крыс без обработки ИВИ, а также сохранение высокого уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов (рис. 5), сравнимого с таковым у *IshR*-крыс. Известно, что церебральная ишемия и подобные ей травматические воздействия на мозг приводят к интенсивному синтезу IGF-1 и других пептидов инсулинового семейства в качестве важнейших нейропротекторов. Более того, уровень IGF-1 рассматривают в качестве прогностического маркера исхода ишемии [49]. Мы полагаем, что подобный эффект может быть следствием взаимной конкуренции экзогенного инсулина и эндогенного IGF-1 за связывание с IGF-1-рецепторами или гибридными *InsR*/IGF-1-рецепторами, которые связывают инсулин с меньшей аффинностью в сравнении с *InsR*. По-видимому, ИВИ, вводимый через 4 ч после индукции ишемии, препятствует связыванию эндогенного IGF-1 с рецепторами, тем самым снижая его нейропротективный потенциал и усиливая повреждение нервных клеток в зоне ишемии. Необходимо подчеркнуть, временной интервал 4–6 ч после окончания ишемии считается критическим для применения любой нейропротективной стратегии, поскольку именно в течение этого периода эффективная нейропротекция считается достижимой [9, 10]. Противоречивые данные о действии ИВИ, вводимого через 4 ч после эпизода ишемии, следует принимать во внимание в ходе дальнейших доклинических и клинических исследований, хотя высказанные нами предположения требуют дополнительного изучения.

Таким образом, нами впервые исследовано “терапевтическое окно” для применения ИВИ при двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс, а также изучены некоторые механизмы его нейропротекторного и системного действия. По нашим данным, ИВИ более эффективен при его введении в первые 2 ч после начала эпизода ишемии с последующим ежедневным введением в течение 7 дней. Введение ИВИ через 4 ч после эпизода ишемии не было эффективным, несмотря на последующий недельный курс препарата. Впервые описано стимулирующее влияние более раннего введения ИВИ на состояние тиреоидной системы при церебральной ишемии крыс. В гиппокампе животных, получавших более раннюю обработку ИВИ, отмечены повышение уровня выживших клеток в CA1-области гиппокампа до уровня у контрольных крыс. Сохранение клеток в гиппокампе может быть обусловлено стимуляцией инсулиновой сигнализации с дальнейшим увеличением экспрессии гена антиапоптотического белка *Bcl-2*, а также повышения соотношения *Bax/Bcl2*, что способствует снижению гибели клеток путем апоптоза. ИВИ также оказывает противовоспалительное действие в гиппокампе, что проявляется в снижении экспрессии генов *Gfap* и *Aif1*, маркеров активированных астроцитов и микроглии, а также в нормализации экспрессии генов провоспалительных цитокина *IL6* и матриксной металлопротеиназы *MMP9*.

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-75-01083).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 8-1/2023 заседания № 8 Комитета по биоэтике от 24.08.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins SO, Pandian J, Lindsay P, Grupper M, Rautalin I* (2025) World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025. *Int J Stroke* 20: 132–144. <https://doi.org/10.1177/17474930241308142>
2. *Khoshnam 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>
3. *Alsbrook DL, Di Napoli M, Bhatia K, Biller J, Andalib S, Hinduja A, Rodrigues R, Rodriguez M, Sabbagh SY, Selim M, Farahabadi MH, Jafarli A, Divani AA* (2023) Neuroinflammation in Acute Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 23: 407–431. <https://doi.org/10.1007/s11910-023-01282-2>
4. *Liddelow SA, Barres BA* (2017) Reactive astrocytes: Production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 46: 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
5. *Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ* (2020) Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron* 108: 608–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>
6. *Sidorov E, Paul A, Xu C, Nouh CD, Chen A, Gosmanova A, Gosmanov N, Gordon DL, Baranskaya I, Chainakul J, Hamilton R, Mdzinarishvili A* (2023) Decrease of thyroid function after ischemic stroke is related to stroke severity. *Thyroid Res* 16: 28. <https://doi.org/10.1186/s13044-023-00160-w>
7. *Shafia S, Khoramirad A, Akhoundzadeh K* (2024) Thyroid hormones and stroke, the gap between clinical and experimental studies. *Brain Res Bull* 213: 110983. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.110983>
8. *Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E, Currò D* (2016) Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediatr Inflamm* 2016: 6757154. <https://doi.org/10.1155/2016/6757154>
9. *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>
10. *Savitz SI, Baron JC, Fisher M, STAIR X Consortium* (2019) Stroke Treatment Academic Industry Roundtable X: Brain Cytoprotection Therapies in the Reperfusion Era. *Stroke* 50: 1026–1031. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.023927>
11. *Agrawal R, Reno CM, Sharma S, Christensen C, Huang Y, Fisher SJ* (2021) Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. *Am J Physiol Endocrin Metab* 321: E156–E163. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2020>
12. *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>
13. *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>

14. *Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova DK, Tretyakova AD, Shpakov AO, Avrova NF* (2024) The Autophagic and Apoptotic Death of Forebrain Neurons of Rats with Global Brain Ischemia Is Diminished by the Intranasal Administration of Insulin: Possible Mechanism of Its Action. *Curr Issues Mol Biol* 46: 6580–6599.
<https://doi.org/10.3390/cimb46070392>
15. *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>
16. *Song Y, Ding W, Bei Y, Xiao Y, Tong HD, Wang LB, Ai LY* (2018) Insulin is a potential antioxidant for diabetes-associated cognitive decline via regulating Nrf2 dependent antioxidant enzymes. *Biomed Pharmacother* 104: 474–484.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.097>
17. *Simon KU, Neto EW, Tramontin NDS, Canteiro PB, Pereira BDC, Zaccaron RP, Silveira PCL, Muller AP* (2020) Intranasal insulin treatment modulates the neurotropic, inflammatory, and oxidant mechanisms in the cortex and hippocampus in a low-grade inflammation model. *Peptides* 123: 170175.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170175>
18. *Brabazon F, Wilson CM, Jaiswal S, Reed J, Frey WHN, 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>
19. *Guo J, Dhaliwall JK, Chan KK, Ghanim H, Al Koudsi N, Lam L, Madadi G, Dandona P, Giacca A, Bendek MP* (2013) In vivo Effect of Insulin to Decrease Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Activity after Arterial Injury. *J Vasc Res* 50: 279–288.
<https://doi.org/10.1159/000351611>
20. *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>
21. *Zorina II, Pechalnova AS, Chernenko EE, Derkach KV, Shpakov AO* (2024) Effect of Intranasal Insulin on Metabolic Parameters and Inflammation Factors in Diabetic Rats Exposed to Cerebral Ischemia-Reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 60: 1095–1107.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024030190>
22. *Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Bandyopadhyay A, Chaudhuri A* (2003) Insulin suppresses plasma concentration of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Diabetes Care* 26: 3310–3314.
<https://doi.org/10.2337/diacare.26.12.3310>
23. *Hallschmid M* (2021) Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol* 33: e12934.
<https://doi.org/10.1111/jne.12934>
24. *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>
25. *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>
26. *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>
27. *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>
28. *Smith CJ, Sims SK, 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>

29. *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
30. *Paxinos G, Watson C* (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, Acad Press, San Diego. (No. of pages: 456 Language: English Edition: 6 Published: November 2, 2006 Imprint: Acad Press. eBook ISBN: 9780080475134.
31. *Schmittgen TD, Livak KJ* (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
32. *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>
33. *Lin S, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z* (2009) Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol* 217: 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.03.021>
34. *Lin S, Rhodes PG, Cai Z* (2011) Whole body hypothermia broadens the therapeutic window of intranasally administered IGF-1 in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 18: 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.013>
35. *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>
36. *Zorina II, Shpakov AO* (2024) Brain Insulin Resistance in Neurological Disorders of Various Genesis: Current State and Treatment Approaches. *Neurochem J* 18: 603–616. <https://doi.org/10.1134/S1819712424700247>
37. *Saleem S, Wang D, Zhao T, Sullivan RD, Reed GL* (2021) Matrix Metalloproteinase-9 Expression is Enhanced by Ischemia and Tissue Plasminogen Activator and Induces Hemorrhage, Disability and Mortality in Experimental Stroke. *Neuroscience* 460: 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.01.003>
38. *Turner RJ, Sharp FR* (2016) Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci* 10: 56. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00056>
39. *Zakharova IO, Sokolova TV, Bayunova LV, Zorina II, Rychkova MP, Shpakov AO, Avrova NF* (2019) The Protective Effect of Insulin on Rat Cortical Neurons in Oxidative Stress and Its Dependence on the Modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK Activities. *Int J Mol Sci* 20: 3702. <https://doi.org/10.3390/ijms20153702>
40. *Tuwar MN, Chen W-H, Chiwaya AM, Yeh H-L, Nguyen MH, Bai C-H* (2023) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Translocator Protein (TSPO) as Diagnostic Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Diagnostics* 13: 2298. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13132298>
41. *Jiang X, Xing H, Wu J, Du R, Liu H, Chen J, Wang J, Wang C, Wu Y* (2017) Prognostic value of thyroid hormones in acute ischemic stroke – a metaanalysis. *Sci Rep* 7: 16256. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16564-2>. Erratum in: *Sci Rep* 8: 6651. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24995-8>
42. *Sahoo JP, Selviambigapathy J, Kamalanathan S, Nagarajan K, Vivekanandan M* (2016) Effect of steroid replacement on thyroid function and thyroid autoimmunity in Addison's disease with primary hypothyroidism. *Indian J Endocrinol Metab* 20: 162–166. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.176356>
43. *Murolo M, Di Vincenzo O, Cicatiello AG, Scalfi L, Dentice M* (2022) Cardiovascular and Neuronal Consequences of Thyroid Hormones Alterations in the Ischemic Stroke. *Metabolites* 13: 22. <https://doi.org/10.3390/metabo13010022>
44. *Chong AC, Vogt MC, Hill AS, Brüning JC, Zeltser LM* (2014) Central insulin signaling modulates hypothalamus-pituitary-adrenal axis responsiveness. *Mol Metab* 4: 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.001>
45. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. *Horm Metab Res* 47: 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
46. *Koudhi S, Clerget-Froidevaux MS* (2018) Integrating Thyroid Hormone Signaling in Hypothalamic Control of Metabolism: Crosstalk Between Nuclear Receptors. *Int J Mol Sci* 19: 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms19072017>

47. Sadana P, Coughlin L, Burke J, Woods R, Mdzinarishvili A (2015) Anti-edema action of thyroid hormone in MCAO model of ischemic brain stroke: Possible association with AQP4 modulation. *J Neurol Sci* 354: 37–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.04.042>
48. Bernal J (2017) Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development. *J Endocrinol* 232: R83–R97.
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0424>
49. Hayes CA, Valcarcel-Ares MN, Ashpole NM (2021) Preclinical and clinical evidence of IGF-1 as a prognostic marker and acute intervention with ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 41: 2475–2491.
<https://doi.org/10.1177/0271678X211000894>

Identifying a Therapeutic Window for Intranasal Insulin Administration in a Two-Vessel Rat Model of Forebrain Ischemia and Investigating the Mechanisms of Its Neuroprotective Action

**I. I. Zorina^{a,*}, A. S. Pechalnova^a, E. E. Chernenko^a, D. K. Avrova^a, K. V. Derkach^a,
and A. O. Shpakov^a**

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

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

Cerebral ischemia is a significant medical and social issue, necessitating the development of effective treatment strategies. Due to the complex pathogenesis and prolonged recovery period associated with this condition, drugs with pleiotropic effects, such as intranasally administered insulin (IAI), are of the greatest interest. IAI sprayed in the nasal cavity enters the brain, regulating metabolism through central mechanisms, has neuroprotective and neuro-regulatory effects. It has been proven to be effective in the treatment of neurodegenerative diseases, although data on its effectiveness in cerebral ischemia remain limited. The aim of the work was to search for a “therapeutic window” and evaluate the mechanisms of the neuroprotective effect of IAI when used in rats with cerebral ischemia. Rats with two-vessel forebrain ischemia were administered IAI 2 and 4 hours after an episode of ischemia at a dose of 0.5 IU/rat/day, and then daily for a 7-day period after ischemia. It has been demonstrated that IAI is more effective if animals were treated 2 hours after the ischemic event, compared with administration after 4 hours, despite the subsequent 7-day of IAI treatment. When administered 2 hours after an ischemic event, IAI has been shown to support the expression of components of insulin signaling genes in the hippocampus and normalize the number of cells in the CA1 region. It also stimulates the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 gene and reduces the expression of the *Gfap* and *Aif1* genes, which are markers of astrocytes and microglia, and this indicates the anti-inflammatory effect of IAI. In addition, for the first time IAI has been found to stimulate the activity of the thyroid system and prevent the development of post-ischemic hypothyroidism. All these effects were less pronounced or not observed when IAI was administered 4 hours after the ischemic event. Thus, for the first time, we described a “therapeutic window” for the use of IAI in cerebral ischemia and evaluated some of the mechanisms underlying its neuroprotective effects.

Keywords: Brain ischemia, intranasally administered insulin, neuroprotection, inflammation, hippocampus