

УДК 616.379:615.322.5



Нейропротективные свойства ГАМК и её производных при диабетической энцефалопатии у старых животных

И.Н. Тюренков¹, Д.А. Бакулин¹, А.В. Смирнов^{1,2}, М.Р. Экова^{1,2}, А.И. Бисинбекова^{1,2}, Г.Л. Снигур^{1,2}, Ю.И. Великородная^{1,2}, Е.И. Морковин^{1,2}, Д.В. Верхоляк¹, О.С. Васильева³

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

² Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»,

400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»

191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

E-mail: mbfdoc@gmail.com

Получена 26.12.2022

После рецензирования 15.06.2023

Принята к печати 11.08.2023

Цель. Оценить нейропротекторные свойства ГАМК и её структурных аналогов на старых животных после продолжительной гипергликемии (7 мес).

Материалы и методы. Сахарный диабет моделировали на белых аутбредных крысах-самцах в возрасте 12 мес посредством введения комбинации стрептозотоцина (65 мг/кг) и никотинамида (230 мг/кг). Через 6 мес для исследования были отобраны животные с уровнем постпрандиальной гликемии между 11 и 18 ммоль/л. После формирования групп, в течение 1 мес животные соответственно получали ГАМК и ГАМК-ергические соединения (композиция МФБА и ФПС), контрольная группа получала физиологический раствор. После лечения был выполнен пероральный тест на толерантность к глюкозе и комплекс поведенческих тестов, направленных на изучение сенсорно-моторных (Открытое поле, Адгезивный тест, Ротарод) и когнитивных функций (Распознавание нового объекта и Водный лабиринт Морриса), а также проведена оценка функционального состояния эндотелия. Далее был произведен забор образцов крови и тканей головного мозга (ГМ) для биохимического и иммуноферментного (уровень глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) в сыворотке и уровень белка Клото, BDNF, Nrf2, NF-κB и малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах ГМ), а также для морфологического анализа изменений нейронов CA1 и CA3 зон гиппокампа и соматосенсорной коры.

Результаты. ГАМК и композиции с её производными оказали выраженное нейропротекторное действие у старых животных с продолжительной гипергликемией. Гипогликемическое действие исследуемых композиций сопровождалось повышением продукции ГПП-1. У животных с СД после 6 нед введения исследуемых веществ регистрировали более высокие показатели сенсорно-моторных и когнитивных функций и меньшие структурные повреждения сенсорно-моторной коры и гиппокампа ГМ. Эти эффекты могут быть обусловлены более высоким уровнем белка Клото, BDNF, Nrf2 и BDNF, а также более низким уровнем NF-κB, что может лежать в основе подавления окислительного стресса, снижения МДА и воспаления (TNF-α).

Заключение. ГАМК и её композиции у старых животных (19 мес) после 6 нед введения значительно улучшали сенсорно-моторные и когнитивные функции, уменьшали негативные структурные изменения в гиппокампе и соматосенсорной коре ГМ.

Ключевые слова: ГАМК; белок Клото; сахарный диабет; стрептозотцин; NF-κB; Nrf2; ГПП-1; эндотелий; гиппокамп

Список сокращений: BDNF – нейротрофический фактор мозга; eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; ГМ – головной мозг; NF-κB – ядерный фактор каппа В; Nrf2 – ядерный фактор, родственник эритроидному фактору 2; STZ-NA – модель стрептозотцин-никотинамидного диабета; ФНО-α – фактор некроза опухоли альфа; vWF – фактор Виллибранта; БК – белок Клото; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1; ИД – индекс дискриминации в тесте Распознавания нового объекта; ИФА – иммуноферментный анализ; МК – мозговой кровотока; ОП – открытое поле; ПТТГ – пероральный тест на толерантность к глюкозе; РНО – тест Распознавание нового объекта; СД – сахарный диабет; ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки.

Для цитирования: И.Н. Тюренков, Д.А. Бакулин, А.В. Смирнов, М.Р. Экова, А.И. Бисинбекова, Г.Л. Снигур, Ю.И. Великородная, Е.И. Морковин, Д.В. Верхоляк, О.С. Васильева. Нейропротективные свойства ГАМК и её производных при диабетической энцефалопатии у старых животных. *Фармация и фармакология*. 2023;11(3):211-227. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-211-227

© И.Н. Тюренков, Д.А. Бакулин, А.В. Смирнов, М.Р. Экова, А.И. Бисинбекова, Г.Л. Снигур, Ю.И. Великородная, Е.И. Морковин, Д.В. Верхоляк, О.С. Васильева, 2023

For citation: I.N. Tyurenkov, D.A. Bakulin, A.V. Smirnov, M.R. Ekova, A.I. Bisinbekova, G.L. Snigur, Yu.I. Velikorodnaya, E.I. Morkovin, D.V. Verkholyak, O.S. Vasilyeva. Neuroprotective properties of GABA and its derivatives in diabetic encephalopathy in old animals. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(3):211-227. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-211-227

Neuroprotective properties of GABA and its derivatives in diabetic encephalopathy in old animals

I.N. Tyurenkov¹, D.A. Bakulin¹, A.V. Smirnov^{1,2}, M.R. Ekova^{1,2}, A.I. Bisinbekova^{1,2}, G.L. Snigur^{1,2}, Yu.I. Velikorodnaya^{1,2}, E.I. Morkovin^{1,2}, D.V. Verkholyak¹, O.S. Vasilyeva³

¹ Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Volgograd Medical Research Center,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

³ Herzen Russian State Pedagogical University,

48, Moika Embankment, St. Petersburg, Russia, 191186

E-mail: mbfdoc@gmail.com

Received 26 Dec 2022

After peer review 15 June 2023

Accepted 11 July 2023

The aim of the work was to evaluate the GABA neuroprotective properties and its structural analogues in old animals after seven months of hyperglycemia.

Materials and methods. Diabetes mellitus was modeled in white outbred male rats (12 months old) by the administration of a streptozotocin (65 mg/kg) and nicotinamide (230 mg/kg) combination. After 6 months, the animals with a postprandial glycemia level between 11 and 18 mmol/l were selected for the study. After the groups had been formed, the animals were administered with GABA and GABAergic compounds (Compositions MPB A and PPC), respectively, for 1 month, the control group animals were administered with saline. After the treatment, an oral glucose tolerance test and a set of behavioral tests aimed at studying sensory-motor (Open Field, Adhesion test, Rotarod) and cognitive functions (New Object Recognition and Morris Water Maze), as well as the functional state evaluation of the endothelium were performed. Further on, sampling of blood and brain tissues for a biochemical and enzyme immunoassay (the level of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and TNF- α in serum and the level of Klotho protein, BDNF, Nrf2, NF- κ B and malondialdehyde (MDA) in brain homogenates), as well as a morphological analysis of changes in CA1 and CA3 neurons of the hippocampus and somatosensory cortex, was carried out.

Results. GABA and compositions with its derivatives had a pronounced neuroprotective effect in old animals with prolonged hyperglycemia. The hypoglycemic effect of the studied compositions was accompanied by an increase in the production of GLP-1. In the animals with DM, after 6 weeks of the test substances administration, higher rates of sensory-motor and cognitive functions and a less structural damage to the sensory-motor cortex and the brain hippocampus were recorded. These effects may be due to higher levels of the Klotho proteins, Nrf2 and BDNF, as well as lower levels of NF- κ B, which may underlie the suppression of the oxidative stress, the reduction of MDA and inflammation (TNF- α).

Conclusion. After 6 weeks of the administration, GABA and its compositions in old animals (19 months old) significantly improved sensory-motor and cognitive functions, reduced negative structural changes in the hippocampus and somatosensory cerebral cortex.

Keywords: GABA; Klotho protein; diabetes mellitus; streptozotocin; NF- κ B; Nrf2; GLP-1; endothelium; hippocampus

Abbreviations: BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor; eNOS – endothelial nitric oxide synthase; NF- κ B – nuclear factor- κ B; Nrf2 – nuclear factor erythroid 2-related factor 2; STZ-NA – the streptozotocin-nicotinamide diabetes model; TNF α – tumour necrosis factor alpha; vWF – von Willebrand's factor; KP – Klotho protein; GABA – gamma-amino-butyric acid; GLP-1 – glucagon-like peptide-1; DI – Discrimination index (New Object Recognition test); ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; CBF – cerebral blood flow; OF – Open Field; OGTT – oral glucose tolerance test; NOR – New Object Recognition; DM – diabetes mellitus; CEC – circulating endothelial cells.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) – самое распространённое и прогрессирующее эндокринное заболевание. По оценкам Международной диабетической федерации (IDF) в настоящее время среди населения Земли в возрасте 20–79 лет зарегистрировано 537 млн. человек с СД, а к 2030 году численность достигнет 643, а затем и 783 млн. к 2045 году [1]. С увеличением числа больных с СД неуклонно растёт распространённость его осложнений, которые приводят к ранней инвалидизации и преждевременной смертности, также растут расходы на лечение [2, 3].

Гипергликемия провоцирует и усугубляет

множество патологических состояний практически во всех органах и тканях. Значительную роль длительная гипергликемия играет в развитии энцефалопатии, затрагивающей психоэмоциональные, сенсорно-моторные и когнитивные функции особенно у взрослых лиц и лиц пожилого возраста [4–6]. Установлено, что пациенты с диабетом более подвержены когнитивным нарушениям [7–9]. Так Хие М. с соавт. (2019) на основе метаанализа 122 исследований показали, что СД повышает риск развития когнитивных нарушений и деменции в 1,25–1,9 раза по сравнению с лицами без СД [7]. Поэтому важными задачами в лечении СД являются не только

нормализация гликемии, но и предупреждение и лечение его осложнений.

Длительная гипергликемия при СД провоцирует не только глюко- и липотоксичность, но также усиливает окислительный и нитрозативный стресс, воспаление и другие патологические процессы, что может приводить к ускорению апоптоза и гибели интенсивно функционирующих клеток в различных органах и тканях, а также ускорению процессов старения. Среди всех органов, наиболее чувствительным и уязвимым к указанным патологическим факторам является головной мозг (ГМ), особенно такие структуры, как гиппокамп и кора [10]. Исходя из вышесказанного, авторы пришли к выводу, что необходимо исследовать энцефалопатические эффекты, связанные с гипергликемией, при этом сосредоточившись на гиппокампе и соматосенсорной коре.

В последние годы коренным образом поменялись наши представления о физиологической роли ГАМК-ергической системы, которую первоначально рассматривали как основную тормозную систему, играющую решающую роль в обеспечении различных функций ГМ. В настоящее время ГАМК-рецепторы и синтезирующий ГАМК фермент (глутаматдекарбоксилаза) обнаружены в тканях сердечно-сосудистой и дыхательной системы, в иммунокомпетентных клетках, желудочно-кишечном тракте и др. [11, 12]. В β -клетках поджелудочной железы плотность ГАМК-рецепторов сопоставима с таковой в ГМ [13]. В многочисленных публикациях также отражено влияние ГАМК-ергических веществ на функцию поджелудочной железы [11, 12, 14]. Производные ГАМК широко используются в клинике как лекарственные средства с нейро- и психотропным действием и продолжают активно изучаться в экспериментальной фармакологии. Таким образом, поскольку СД сопряжён со снижением когнитивной функции и структурными изменениями в ГМ [4–6], представляется перспективным проведение поиска в ряду веществ с ГАМК-ергическим действием средств для коррекции диабетической энцефалопатии, вызванной длительной гипергликемией.

В ходе предварительного скрининга среди производных линейной и циклической ГАМК были выделены вещества с панкреопротекторным действием (Рис. 1). Полученные результаты стали основой выбора этих композиций для изучения их влияния на функцию и структуру ГМ старых животных с длительной гипергликемией.

ЦЕЛЬ. Оценить нейропротекторные свойства ГАМК и её структурных аналогов на старых животных после продолжительной гипергликемии (7 мес).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельные объекты

Все эксперименты были выполнены в соответствии с законодательством Российской Федерации и техническими стандартами

Евразийского экономического союза по надлежащей лабораторной практике (ГОСТ Р 53434-2009, ГОСТ Р 51000.4-2011). Дизайн исследования и протокол были одобрены Локальным этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета, протокол № 2022/116 от 04.03.2022 г. (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 [ONHRP]).

Экспериментальное исследование выполнено на 50 беспородных лабораторных крысах, полученных из питомника «Столовая» (Московская область, Россия), в возрасте 4–5 мес. Животных содержали в виварии Научного центра инновационных лекарственных средств Волгоградского государственного медицинского университета (НЦИЛС ВолгГМУ) при температуре 20–22°C, влажности воздуха 40–60%, световом режиме 12/12 ч и со свободным доступом к воде и пище (ГОСТ Р 51849-2001) (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия). К началу эксперимента, на момент введения стрептозотоцина животные достигли возраста 12 мес.

Исследуемые соединения

Композиция МФБА (композиция линейного производного ГАМК с L-аргинином) проявляет выраженные эндотелиопротекторные свойства [15, 16]. Что также указывает на целесообразность его изучения в качестве средства для профилактики сосудистых осложнений СД (Рис. 1).

Композиция ФПС (композиция производного 2-пирролидона с янтарной кислотой) обладает ноотропным, нейро-, кардиопротекторным действием [17, 18].

Обе композиции были отобраны среди различных производных ГАМК в предварительных скрининговых исследованиях по изучению их панкреопротекторного действия на аллоксановой модели СД по тестам выживаемости животных, сохранению массы β -клеток, способности стимулировать продукцию глюкагон-подобного пептида-1 (ГПП-1) и улучшать утилизацию глюкозы.

ГАМК была выбрана как референтное вещество для сравнения панкреопротекторных свойств, которые для неё хорошо отражены в литературе [12, 14].

Моделирование патологии

СД моделировали внутрибрюшинным (в/б) введением стрептозотоцина – 65 мг/кг с предварительным (за 15 мин) введением никотинамида (230 мг/кг, в/б). Стрептозотин разводили в холодном цитратном буфере (1 мМ, pH 4,5), никотинамид – в растворе NaCl (0,9%). Через 3 дня у всех животных определяли уровень глюкозы в крови. Затем для эксперимента были отобраны 50 особей с постпрандиальным уровнем гликемии больше 11 и меньше 18 ммоль/л. Уровень глюкозы измеряли с помощью глюкометра Contour TS и соответствующих тест-полосок (Bayer). Кровь для измерений забирали при пункции подязычной вены.

Дизайн эксперимента

В дальнейшем отобранные 50 животных в течение 6 мес (после моделирования СД) находились под постоянным наблюдением в виварии НЦИЛС ВолгГМУ. Каждые 4 недели проводили измерение уровня гликемии. В течение данного периода наблюдения продолжительный СД вызывал гибель 6 (12%) животных, а у 4 (8%) значительно повысился уровень постпрандиальной гликемии (>18 ммоль/л), и они были исключены из исследования до распределения на группы. После 6 мес у крыс оценивали тощаковую гликемию (через 4 ч после забора корма) и проводили пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ), при котором глюкозу вводили в дозе 4 г/кг (*per os*). Далее крыс случайным образом распределяли на 4 равные группы ($n=10$) со средним сопоставимым уровнем гликемии (от 7,5 до 9,5 ммоль/л после 4 ч голодания). После этого начинали ежедневно и непрерывно вводить ГАМК, МФБА и ФПС в дозе 1000, 20 и 50 мг/кг (*per os*) соответственно в течение 30 дней и затем ещё 2 недели, в течение которых проводили оценку состояния животных. Группе негативного контроля (СД+NaCl 0,9%) в качестве лечения аналогично вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме 0,1 мл/100 г ($n=10$). Для позитивного контроля использовали крыс без СД (интактных) того же возраста из той же партии завоза животных ($n=10$).

После 30 дней введения исследуемых веществ в течение 12 дней поочередно проводили следующие манипуляции: 1-й день ПТТГ – с определением глюкозы и ГПП-1, на 2–3-й день оценивали сенсорно-моторную функцию в тестах Открытое поле (ОП), Адгезивный тест, и координацию движений в тесте Ротарод; на 4-й день проводили тест РНО; в 5–9-й день тест Водный лабиринт Морриса; на 10–12-й день после тестирования эндотелиальной функции проводили эвтаназию с забором крови и ГМ для морфологического исследования и иммуноферментного анализа гомогенатов.

По совокупности исследуемых показателей давалась комплексная оценка морфофункционального состояния ГМ у старых животных с длительной гипергликемией, получавших в течение 6 нед производные ГАМК.

Разработанный дизайн исследования приведен на рисунке 2.

Оценка психоневрологического дефицита

Двигательную и исследовательскую активность животных оценивали в тесте ОП. Для этого использовали установку «Открытое поле» (НПК «Открытая Наука», Россия). Животное помещали в центр арены и с использованием web-камеры вели наблюдение за его поведением в течение 3-х мин, фиксируя количество пересечённых квадратов (пройденное расстояние) – показатель двигательной активности (ДА), а сумму актов «стойки» и число обследованных отверстий-норок оценивали как исследовательскую активность (ИА) животных.

Адгезивный тест применяли для оценки сенсорной функции и мелкой моторики. В качестве инородного предмета на волярную поверхность передних лап животного помещали стикеры – квадратные отрезки лейкопластыря на тканевой основе (6×6 мм, Верофарм, Россия), а затем в течение 3 мин фиксировали время обнаружения (сенсорная функция) и время снятия (моторная функция) стикера.

Координацию движений оценивали в тесте Ротарод (установка производства ООО «Нейроботикс», Россия), в котором фиксировали суммарную длительность удержания животного на вращающемся (25 об/мин) стержне за 3 попытки.

Тест Распознавания новых объектов (РНО) основан на естественной потребности животных исследовать новые объекты и не требующий наличия внешней мотивации, используется для оценки когнитивной функции (способности выявлять и сопоставлять информацию, хранящуюся в краткосрочной памяти) и был выполнен в 2 этапа: 1-й этап – ознакомление в домашней клетке (545×395×200 мм) с 2-мя одинаковыми объектами (А1 и А2) в течение 3 мин. Затем через 60 мин после ознакомления выполняли 2-й этап, когда животного сажали на 3 мин в ту же клетку, но один из старых (изученных) объектов (А2) заменяли на новый (объект Б). По результатам теста рассчитывали индекс дискриминации (ИД) – время, затраченное на исследование нового объекта (Б) минус время, затраченное на исследование старого объекта (А) во второй посадке.

После курса лечения обучаемость и сохранение долговременной пространственной памяти оценивали в Водном лабиринте Морриса. Установка «Водный лабиринт (тест Морриса)» (НПК «Открытая Наука», Россия). Животных в течение 5 сут (по 4 попытки в день) обучали поиску затопленной платформы по ориентирам на стенке установки, помещая крысу в разные стартовые точки относительно платформы. В данном исследовании фиксировали продолжительность поиска затопленной платформы при первой посадке в течение 5 дней эксперимента.

Оценка функционального состояния эндотелия мозговых сосудов

Функциональное состояние эндотелия тестировали по определению: эндотелий-зависимой вазодилатации и антитромботической функции, по числу десквамированных эндотелиоцитов, по уровню фактора фон Виллебранда (vWF) в сыворотке крови.

Эндотелий-зависимую вазодилатацию оценивали у наркотизированных животных (хлоралгидрат 400 мг/кг) по относительным изменениям уровня мозгового кровотока в ответ на внутривенное введение ацетилхолина (0,01 мг/кг, Acros Organics, США; активатор eNOS). Введение ацетилхолина вызывало повышение продукции NO, эндотелий-зависимую вазодилатацию сосудов и увеличение мозгового кровотока, который определяли в проекции средней мозговой

артерии методом ультразвуковой доплерографии Минимакс-Допплер_K (ООО «СП МИНИМАКС», Россия).

Антитромботическую функцию оценивали по времени развития полного тромбоза, т.е. прекращения кровотока по сонной артерии при аппликации на её адвентицию раствора хлорида железа (III).

Количество дескамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток (ЦЭК) в крови определяли по методу Hladovec J. [19]. Повышение числа ЦЭК позволяло судить о выраженности эндотелиальной дисфункции, степени повреждения эндотелия и его репаративной активности.

Фактор фон Виллебранда (vWF), который продуцируется эндотелием, определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) как фактор, при повышении которого можно судить о повреждении эндотелия и эндотелиальной дисфункции. Повышенный уровень vWF наблюдали при СД и является предиктором смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [20].

Подготовка гомогенатов

Образцы ГМ гомогенизировали в лизис-буфере (1 мл лизирующего буфера на 50 мг образца ткани) в стеклянном гомогенизаторе на льду. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком при помощи ультразвукового диспергатора до её осветления, затем растворы центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g. Полученный супернатант использовали для проведения иммуноферментного и биохимического анализа.

Проведение биохимического и иммуноферментного анализа

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах определяли с использованием реакции с тиобарбитуровой кислотой.

ИФА проводили с использованием готовых наборов (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для анализа использовали супернатант гомогенатов ГМ и сыворотку крови. Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного автоматического анализатора SPECTROstar Nano («BMGLabtech», Германия) при длине волны 450 нм.

Морфологическое исследование

Для морфологического исследования ГМ фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) при 22–24°C. Затем образцы обезживали в батарее спиртов восходящей крепости, просветляли в хлороформе с использованием гистопроцессора Cytadel 2000 (Shendon, Великобритания) и заключали в парафиновую среду HistoMix (Биовитрум, Россия). Парафиновые блоки резали на ротационном микротоме HM340E (MICROM, Германия), получали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на стекле, обработанные поли-L-лизин (Menzel,

Германия). Окраску проводили тионином по методу Ниссля.

Оценивали структурные изменения коры ГМ, удельное количество гиперхромных нейронов (обратимое повреждение) и гиперхромных сморщенных нейронов (необратимое повреждение).

Гистологические срезы фотографировали цифровой камерой AxioCam 305 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) на базе микроскопа AxioImager A2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и аналитической статистики с применением программного обеспечения Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Распределение количественных показателей оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Краскела–Уоллиса и апостериорного критерия Данна. Цифровые значения представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($M \pm m$). Для выражения удельного количества нейронов пирамидного слоя гиппокампа указывали интерквартильный размах Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 – 25 перцентиль, Q3 – 75 перцентиль. Различия признавали значимыми при $p < 0,05$.

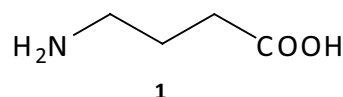
РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка психоневрологического дефицита

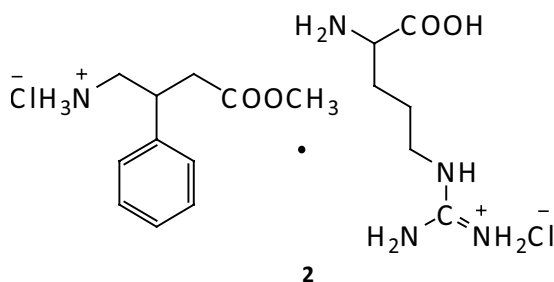
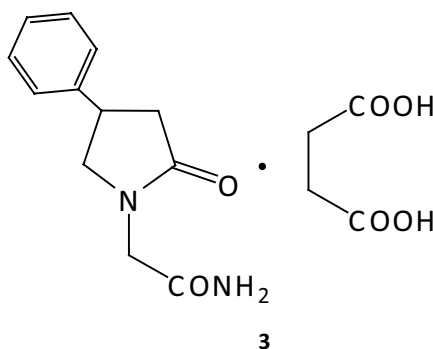
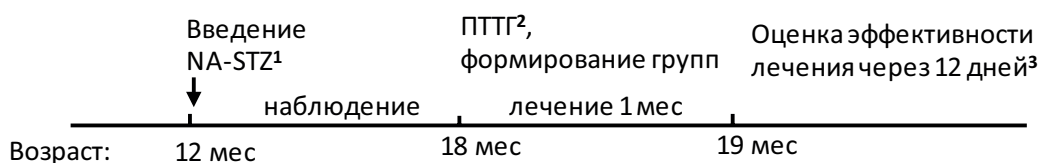
Предполагается, что при СД гипергликемия является основным патогенетическим фактором, способствующим ухудшению когнитивных функций, нейродегенерации, прогрессу старения, атрофии ГМ и деменции [21]. Используемый комплекс тестов был выбран с целью фиксирования нарушения, соответствующего клиническим последствиям для ГМ со стороны длительной неконтролируемой гипергликемии.

У животных в возрасте 19 мес с длительной гипергликемией (7 мес) в тесте ОП регистрировали более низкую двигательную активность и значительно сниженное исследовательское поведение, чем у интактных животных того же возраста. Во всех опытных группах, получавших лечение, регистрировали более высокие показатели исследовательской активности. В группе, которая получала композицию производного 2-пирролидона (ФПС) значительно выше была и двигательная активность (Рис. 3А).

В Адгезивном тесте у животных с хронической гипергликемией без лечения наблюдали нарушения сенсорной функции и выраженное ухудшение мелкой моторики по сравнению с животными интактной группы. В группе, получавшей ФПС, время обнаружения и избавления от инородного предмета было значимо меньше, чем у животных контрольной группы (Рис. 3Б).



4-Аминобутановая кислота (ГАМК)

(Тривиальная номенклатура: γ -Аминomásляная кислота или ГАМК)Гидрохлорид метилового эфира *DL*-4-амино-3-фенилбутановой кислоты и моногидрохлорид *L*-2-амино-5-гуанидинпентановой кислоты (моногидрохлорид *L*-аргинина) в соотношении 1:1
(Шифр соединения: МФБА)2-(2-Оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)ацетамид и бутандиовая (янтарная) кислота в соотношении 2:1
(Шифр соединения: ФПС)**Рисунок 1 – Исследуемые соединения****Рисунок 2 – Дизайн эксперимента**

Примечание: 1 – через 3 сут после введения стрептозотоцина с никотиномидом (NA-STZ) производили отбор животных с уровнем постпрандиальной гликемии >11 и <18 ммоль/л; 2 – после 6 мес проводили пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) и формировали 4 группы, сопоставимые по уровню гликемии; 3 – после лечения была произведена оценка следующих показателей:

День 1. Оценка углеводного обмена (ПТТГ и определение ГПП-1);

День 2. Двигательная и исследовательская активность (Открытое поле), сенсорно-моторные нарушения (Адгезивный тест);

День 3. Координационные расстройства (Ротарод);

День 4. Оценка кратковременной памяти (Распознавание нового объекта);

День 5–9. Оценка долговременной памяти (Водный лабиринт Морриса);

День 10–12. Оценка эндотелий-зависимой вазодилатации и антитромботической функции эндотелия, эвтаназия, забор образцов крови и головного мозга для морфологического и иммуноферментного анализа (ИФА).

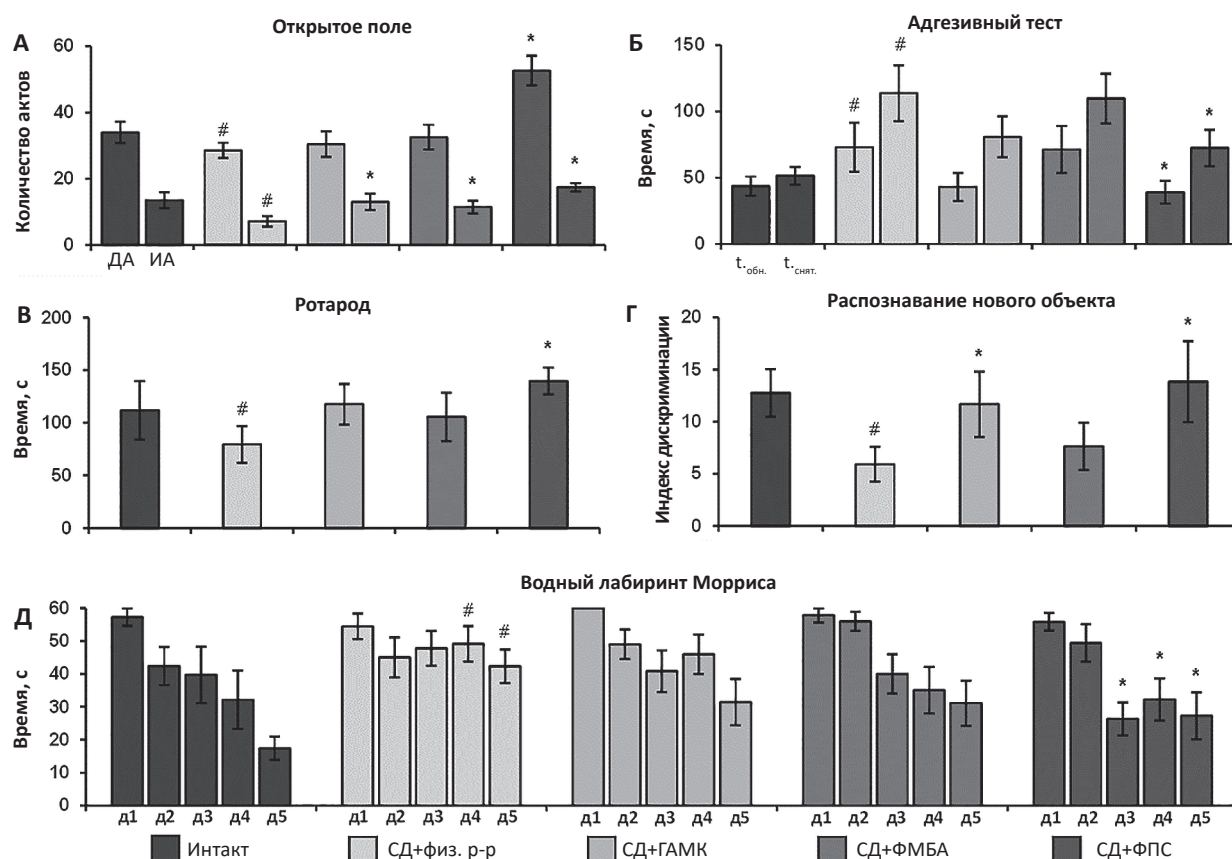


Рисунок 3 – Двигательная и исследовательская активность в тесте Открытое поле (А), среднее время обнаружения и снятия стикера в Адгезивном тесте (Б), продолжительность удержания на вращающемся стержне в тесте Ротарод (В), индекс дискриминации в тесте Распознавание нового объекта (Г) и продолжительность поиска затопленной платформы в тесте Водный лабиринт Морриса (Д)

Примечание: # – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «Интакт» ($p < 0,05$); * – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «СД+физ. р-р» ($p < 0,05$) (критерий Краскела-Уоллиса и Данна); данные представлены как $M \pm m$; в тесте Открытое поле: ДА – двигательная активность (левые столбики), количество пересеченных за 3 минуты секторов, ИА – исследовательская активность (правые столбики), сумма исследовательских актов; в Адгезивном тесте: t_{обн.} – среднее время обнаружения стикера на ладонной поверхности передних лап (левые столбики), t_{снт.} – среднее время снятия стикера (правые столбики); в тесте Водный лабиринт Морриса показана продолжительность поиска затопленной платформы при первой посадке в течение 5 дней эксперимента.

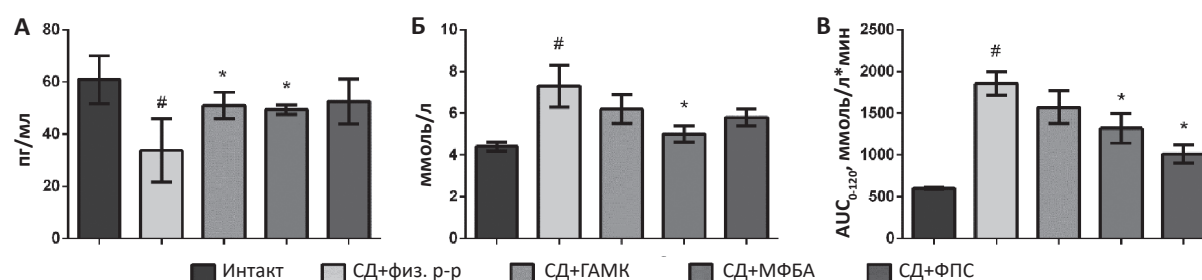


Рисунок 4 – Уровень ГПП-1 в сыворотке крови (А), уровень глюкозы в крови натощак (Б) и площадь под кривой «уровень глюкозы-время» (В)

Примечание: # – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «Интакт» ($p < 0,05$); * – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «СД+физ. р-р» ($p < 0,05$; критерий Краскела-Уоллиса и Данна); данные представлены как $M \pm m$.

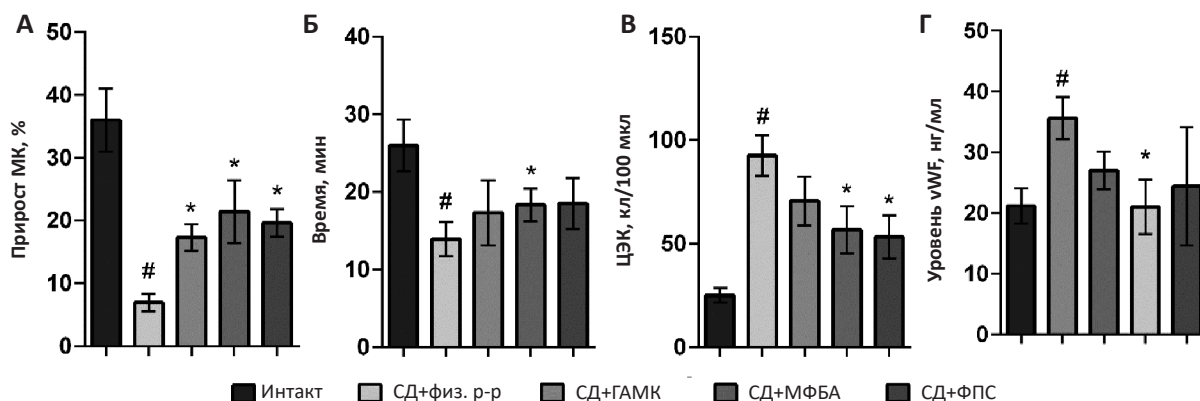


Рисунок 5 – Относительный прирост скорости мозгового кровотока после введения ацетилхолина (А), длительность тромбообразования в сонной артерии при аппликации хлорида железа (III) (Б), количество циркулирующих в плазме эндотелиальных клеток (ЦЭК) (В), сывороточный уровень фактора фон Виллебранда (vWF; Г)

Примечание: # – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «Интакт» ($p < 0,05$); * – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «СД+физ. р-р» ($p < 0,05$) (критерий Краскела-Уоллиса и Данна); данные представлены как $M \pm m$; МДА – малоновый диальдегид.

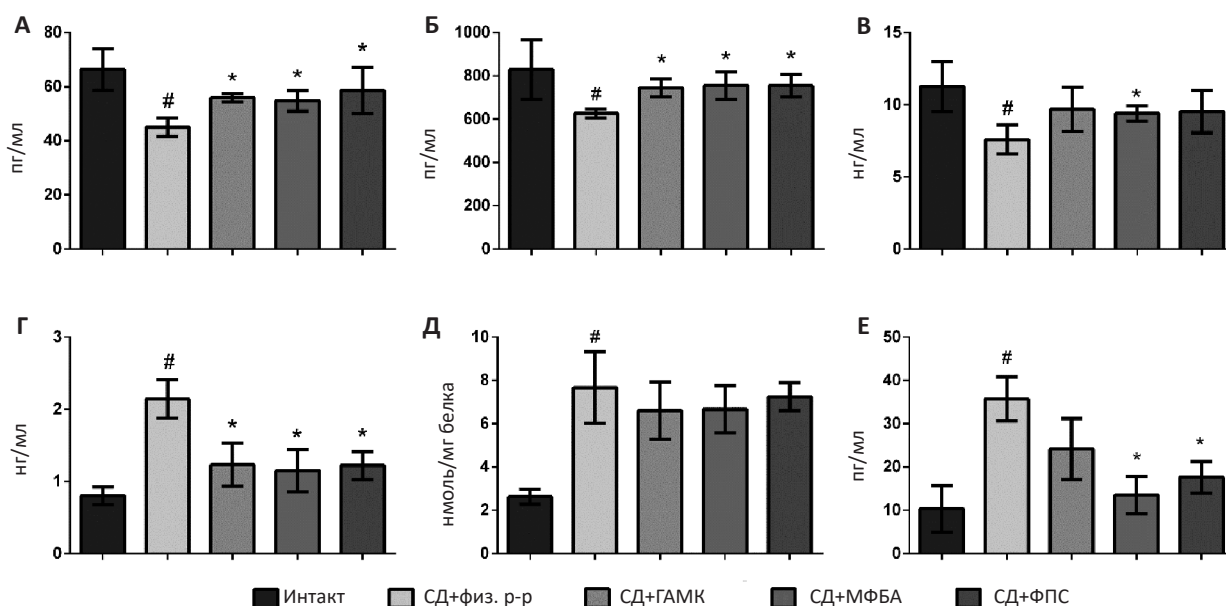


Рисунок 6 – Концентрация белка Клото (А), BDNF (Б), Nrf2 (В), Nf-kB (Г), МДА (Д) в тканях мозга и ФНО-α в сыворотке крови (Е) у животных с экспериментальным СД

Примечание: # – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «Интакт» ($p < 0,05$); * – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «СД+физ. р-р» ($p < 0,05$) (критерий Краскела-Уоллиса и Данна); данные представлены как $M \pm m$; МДА – малоновый диальдегид.

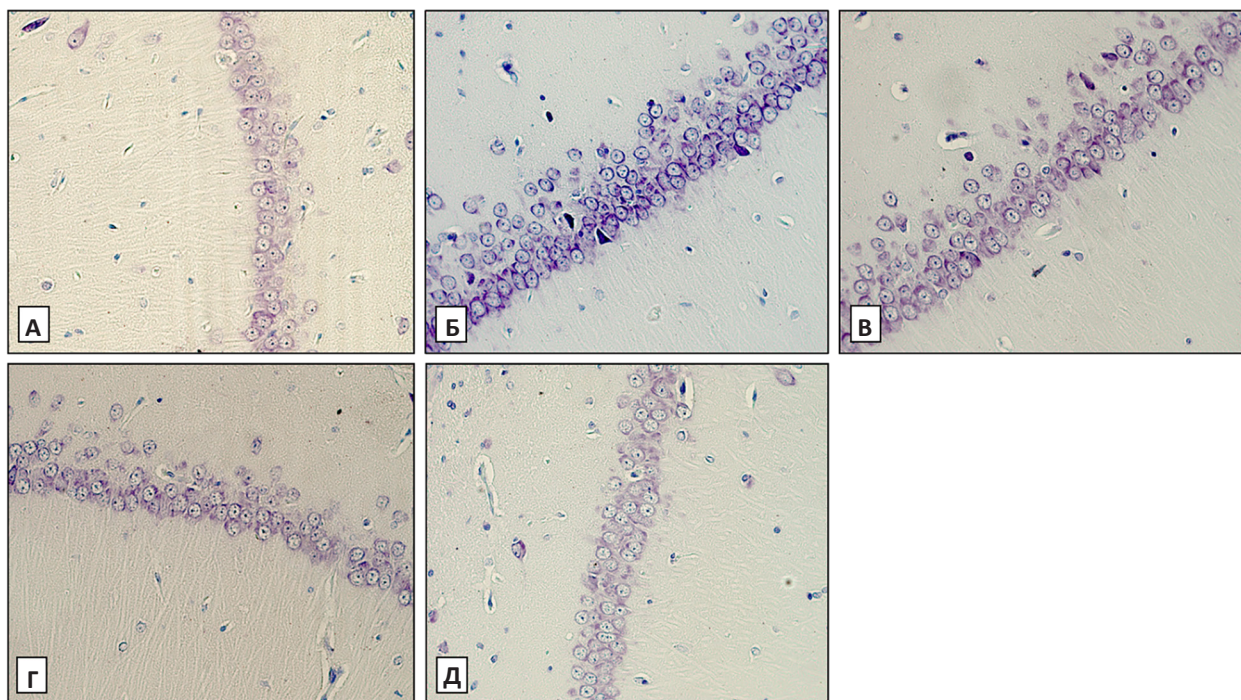


Рисунок 7 – Морфологические изменения в пирамидном слое СА1 гиппокампа

Примечание (здесь и в Рис. 8): А – Интакт; Б – СД+физ.р-р; В – СД+ГАМК; Г – СД+МФБА; Д – СД+ФПС. Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. $\times 400$.

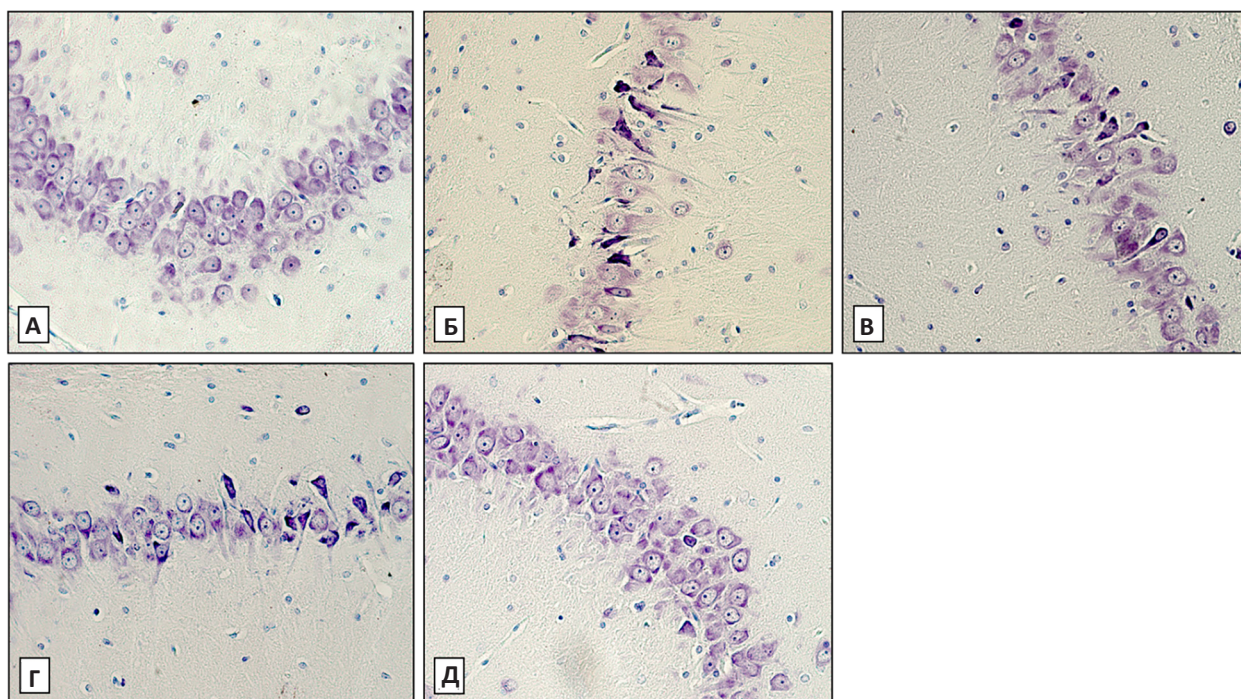


Рисунок 8 – Морфологические изменения в пирамидном слое СА3 гиппокампа

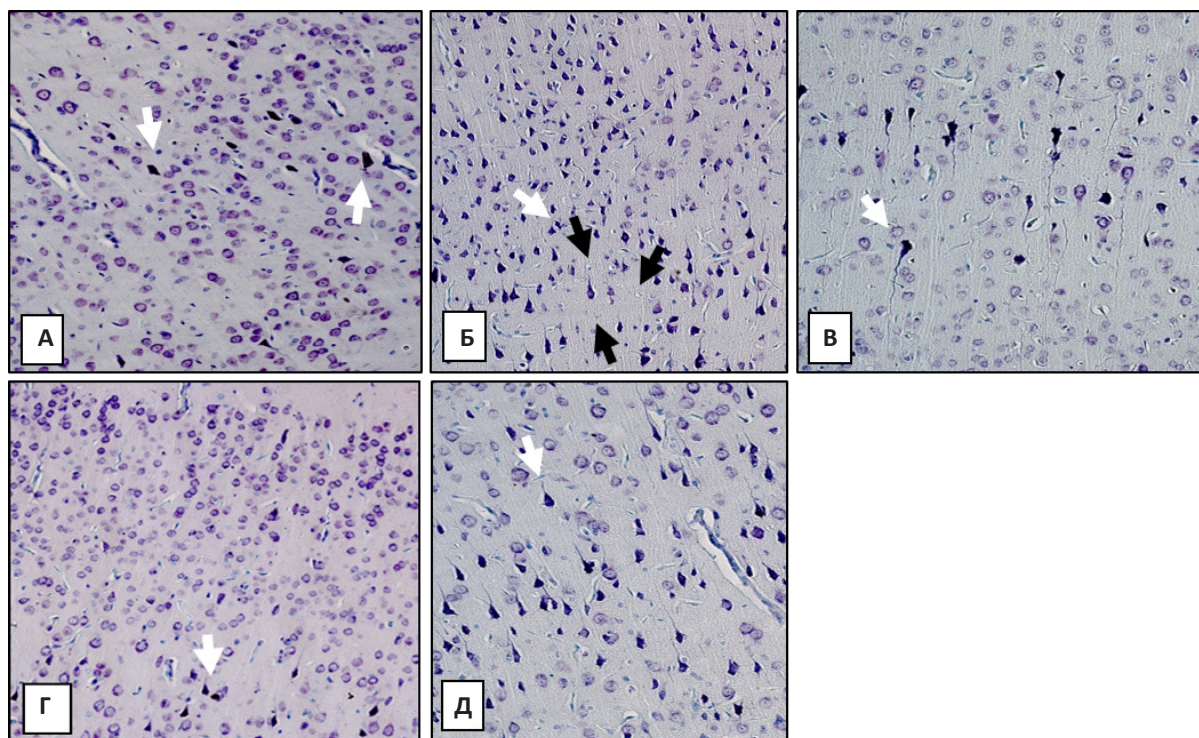


Рисунок 9 – Гистологическое строение первичной сенсомоторной коры исследуемых животных.

Примечание: А – Интакт (наличие во всех слоях единичных гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов); Б – СД+физ. р-р (выраженный гиперхроматоз во всех слоях, наличие зон «выпадения» нейронов); В – СД+ГАМК (гиперхроматоз во внутреннем пирамидном слое); Г – СД+МФБА (слабовыраженный гиперхроматоз); Д – СД+ФПС (наличие в наружном зернистом, наружном пирамидном и внутреннем пирамидном слоях значительного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы). Белые стрелки – гиперхромные сморщенные нейроны. Черные стрелки – зоны «выпадения» нейронов. Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. $\times 200$.

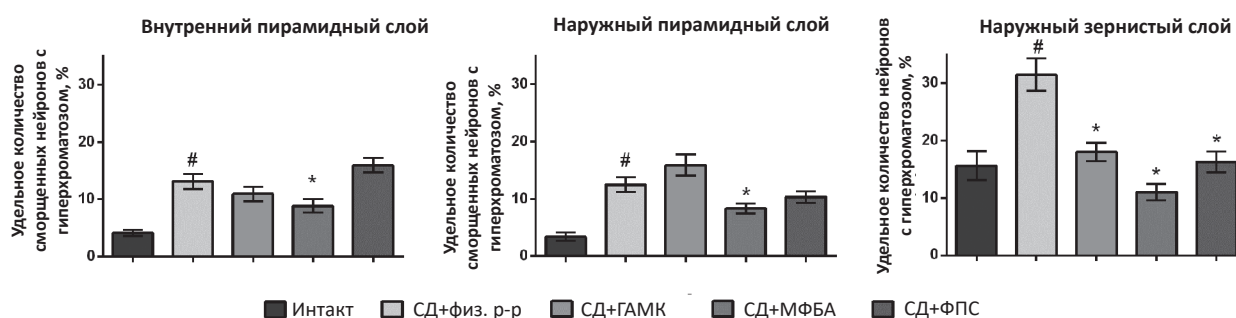


Рисунок 10 – Удельное количество гиперхромных, гиперхромно-сморщенных нейронов в первичной соматосенсорной коре ГМ крыс

Примечание: # – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «Интакт» ($p < 0,05$); * – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «СД+физ. р-р» ($p < 0,05$) (критерий Краскела-Уоллиса и Данна). Данные представлены как $M \pm m$.

Таблица 1 – Удельное количество нейронов пирамидного слоя гиппокампа с гиперхроматозом и сморщенных нейронов с гиперхроматозом

		Гиперхромные нейроны Ме (Q1–Q3), %			
Зона гиппокампа	Интакт	СД+физ. р-р	СД+ГАМК	СД+МФБА	СД+ФПС
CA1	0,8 (0–4,7)	11,6 (3,1–16,9) #	0 (0–0) *	0 (0–0)*	0 (0–0)*
CA3	0 (0–0)	17,5 (2,8–27,9) #	2,6 (0–18,8)	0 (0–5,9)*	0 (0–25,6)
		Гиперхромные сморщенные нейроны Ме (Q1–Q3), %			
Зона гиппокампа	Интакт	СД	СД + ГАМК	СД + ФПС	СД + МФБА
CA1	1,8 (0–4,4)	3,6 (0–9,2)	3,1 (1,9–6,9)	5,5 (0–18,4)	2 (0–10,9)
CA3	4,4 (0–11,5)	2,3 (0–21,9)	0 (0–7,8)	2,4 (0–31)	0 (0–4,2)

Примечание: # – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «Интакт» ($p < 0,05$); * – различия статистически значимы по сравнению с животными группы «СД+физ. р-р» ($p < 0,05$) (критерий Краскела-Уоллиса и Данна); ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; СД – сахарный диабет.

В тесте Ротарод у животных группы негативного контроля время удержания было статистически значимо меньше, чем у интактных, что свидетельствовало о нарушениях координации движений. Животные, получавшие ГАМК, МФБА и особенно ФПС дольше удерживались на вращающемся стержне (Рис. 3В).

В тесте Распознавание нового объекта отмечено значительное снижение ИД (индекса дискриминации, что указывает на нарушение кратковременной памяти) в группе животных с СД без лечения. После курсового введения у животных с СД ГАМК и ФПС регистрировали значимо большее время обследования нового объекта, по сравнению со старым объектом, т.е. животные отличались лучшей способностью выявлять и сопоставлять информацию, хранящуюся о ранее исследованном предмете (Рис. 3Г).

В тесте Водный лабиринт Морриса оценивали сохранность долговременной пространственной памяти по времени поиска затопленной платформы в течение 5 сут. В группе животных с хронической гипергликемией без лечения отмечено нарушение долговременной памяти: каждый день эксперимента в первую посадку они дольше, чем интактные, искали затопленную платформу (Рис. 3Д). В группах, получавших ГАМК, МФБА и особенно ФПС, с 3-го дня в каждую первую тестовую сессию животные быстрее, чем в контрольной группе, находили затопленную платформу, т.е. сохранность долгосрочной пространственной памяти была лучше.

Таким образом, у животных с СД в сравнении с интактными отмечались особенно выраженные нарушения когнитивной функции (Распознавание нового объекта, Водный лабиринт Морриса и ИА в ОП) и мелкой моторики (Адгезивный тест), также наблюдалось снижение двигательной активности (ОП), ухудшение координации (Ротарод) и сенсорной функции передних конечностей (Адгезивный тест).

Курсовое введение ГАМК, её линейного производного (МФБА) и особенно её циклического производного (ФПС) способствовало улучшению функционального состояния ГМ, снижая выраженность когнитивных, сенсорных и моторных нарушений у животных с длительной гипергликемией.

Влияние производных ГАМК на углеводный обмен

У животных с СД на момент оценки функционального состояния ГМ уровень ГПП-1 у контрольной группы был значимо ниже, чем у интактных животных того же возраста. У животных, получавших исследуемые вещества, уровень ГПП-1 в сыворотке крови был сопоставимо выше в среднем на 50%, чем у животных контрольной группы (Рис. 4А).

При проведении ПТТГ у животных на фоне курсового введения композиций МФБА и ФПС отмечалось нормализация углеводного обмена, что проявлялось в снижении уровня гликемии (после 4-часового голодания) и площади под кривой «уровень глюкозы-время» (Рис. 4Б и 4В).

Влияние исследуемых веществ на эндотелиальную дисфункцию

СД значительно увеличивает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, а последние повышают вероятность формирования сосудистой деменции [6, 22, 23]. При этом значительную роль в патогенезе отводят эндотелиальной дисфункции.

В настоящей работе, после оценки неврологического дефицита у данных животных, было проведено исследование функционального состояния эндотелия. У животных с СД без лечения отмечено выраженное снижение эндотелий-зависимой вазодилатации: незначительный прирост уровня мозгового кровотока в ответ на введение ацетилхолина по сравнению с животными интактной группы (Рис. 5А). У животных, которым вводили ГАМК, ФПС и особенно МФБА наблюдали значительно более выраженный прирост уровня мозгового кровотока в ответ на введение ацетилхолина, чем у контрольной группы животных.

При оценке антитромботической функции эндотелия установлено, что при аппликации хлорида железа (III) на адвентицию общей сонной артерии время остановки кровотока у животных контрольной группы было практически вдвое короче, чем у интактных (Рис. 5Б). У животных, получавших МФБА время тромбообразования было значимо больше, чем у животных контрольной группы.

Для оценки эндотелиальной дисфункции у животных с СД были использованы ещё два показателя: количество ЦЭК и фактор фон Виллебранда (vWF). Количество ЦЭК у контрольных животных с СД было в 4 раза больше, чем у интактных животных, а у животных, получавших производные ГАМК (МФБА и ФПС) количество ЦЭК было значимо меньше, чем у контрольной группы животных (Рис. 5В).

Уровень vWF у животных с СД без лечения был на 68% выше, чем у интактных животных (Рис. 5Г). У животных, получавших композицию МФБА содержание vWF в сыворотке крови было значимо меньше, чем у животных группы негативного контроля.

Таким образом, на фоне длительной гипергликемии происходит формирование выраженной эндотелиальной дисфункции, которая может лежать в основе структурно-функциональных изменений в ГМ. Исследуемые производные ГАМК (МФБА и ФПС) улучшали вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия, что может играть важную роль в адаптации и обеспечении адекватного кровотока в интенсивно функционирующих структурах.

Оценка уровня белка Клото, BDNF, Nrf2, NF-κB, ФНО-α и МДА

Литературные данные [12, 24] свидетельствуют о том, что ГАМК повышает выработку белка Клото (БК), который оказывает влияние на когнитивную функцию [25, 26]. Установлено, что основные

эффекты БК сопряжены с его влиянием на экспрессию транскрипционных ядерных факторов Nrf2 и NF-κB, играющих важную роль в развитии СД и его осложнений. Также при СД, наряду со снижением БК, отмечается и уменьшение экспрессии нейротрофического фактора (BDNF), который экспрессируется и синтезируется не только в ГМ, но и в поджелудочной железе, кишечнике и других тканях, где он играет важную роль в цитопротекции [27, 28].

По сравнению с интактными, у животных с СД без лечения в гомогенатах ГМ отмечался значимо низкий уровень БК, BDNF и транскрипционного фактора Nrf2, более высокий уровень транскрипционного фактора NF-κB, МДА, а также более высокий сывороточный уровень ФНО-α (Рис. 6). На фоне курсового ведения ГАМК, ФПС и особенно МФБА наблюдали нормализацию содержания отмеченных маркеров: БК BDNF и транскрипционных факторов, а также провоспалительного цитокина ФНО-α и основного продукта перекисного окисления липидов МДА.

Морфология гиппокампа

СД приводит к формированию структурно-функциональных изменений в ГМ. Некоторые области мозга, в первую очередь гиппокамп, особенно чувствительны к длительной гипергликемии, что является одной из причин снижения когнитивных функций [29, 30]. При этом доказана связь между степенью и продолжительностью гипергликемии и риском развития деменции у людей с СД [4].

В СА1 зоне гиппокампа старых интактных крыс большинство нейронов пирамидного слоя характеризовались близкой к округлой форме перикариона с центрально расположенным округлым светлым ядром и, как правило, хорошо выраженным ядрышком. Встречались единичные участки выпадения нейронов, нейроны с очаговым хроматолизом и сморщенные гиперхромные клетки (Рис. 7А). В СА3 нейроны пирамидного слоя располагались более дисперсно, чем в СА1, и имели полигональную форму с четко визуализируемым ядром и одним ядрышком, обнаруживались единичные гиперхромные нейроны, сморщенные нейроны с гиперхромией, нейроны с очаговым хроматолизом и единичные участки выпадения нейронов (Рис. 8А).

В группе животных с СД без лечения в СА1 пирамидного слоя по сравнению с интактом у части животных обнаруживали участки выпадений нейронов, а также в концевых отделах пирамидного слоя СА1 нейроны с очаговым хроматолизом, гиперхромные и гиперхромные сморщенные нейроны, которые располагались группой (Рис. 7Б). В СА3 пирамидного слоя нейроны располагались более рыхло, чем в СА1 (Рис. 8Б). У всех животных встречались участки выпадения нейронов, очаговый хроматолиз. Для большинства животных обнаруживали нейроны с гиперхромией цитоплазмы и гиперхромные нейроны со сморщиванием перикарионов. Отмечалось достоверное увеличение

удельного количества гиперхромных нейронов на 10,8 % в СА1 ($p < 0,05$) и на 17,5 % в СА3 гиппокампа ($p < 0,05$), по сравнению с интактными животными (Табл. 1). При этом достоверных различий в изменении удельного количества гиперхромных сморщенных нейронов с СА1 и СА3 не наблюдалось ($p > 0,05$) (Табл. 1).

У старых крыс с СД при фармакологической коррекции ГАМК, ФПС и МФБА большинство нейронов пирамидного слоя характеризовалось нормохромной цитоплазмой. У некоторых животных встречались нейроны с гиперхроматозом цитоплазмы и гиперхромные сморщенные нейроны, которые в концевых отделах СА1 располагались группой, наблюдались участки выпадения нейроцитов (Рис. 7В–7Д; Рис. 8В–8Д).

При статистической обработке данных в СА1 зоне гиппокампа при применении ГАМК, ФПС и МФБА нами было обнаружено достоверное снижение удельного количества гиперхромных нейронов ($p < 0,05$) по сравнению с группой СД (Табл. 1). Применение МФБА продемонстрировало статистически значимые различия и в СА3, удельное количество гиперхромных нейронов снижалось на 17,5 % ($p < 0,05$) (Табл. 1).

Морфология соматосенсорной коры

При гистологическом исследовании первичной соматосенсорной коры интактных крыс (Рис. 9) были обнаружены единичные гиперхромные и гиперхромно-сморщенные нейроны во всех слоях. Однако у отдельных животных встречались локусы выраженного гиперхроматоза во 2-м, 3-м и 5-м слоях, где, наряду с неизменными нейронами, обнаруживали нейроны, перикарионы которых имели неправильную сморщенную, вытянутую или извитую форму, ядрышко не визуализировалось. Обнаруженные нами патологические изменения в коре интактных крыс, мы связывали с возрастом исследуемых крыс.

При экспериментальном моделировании СД у стареющих крыс (в возрасте 12–19 мес) были обнаружены наиболее выраженные признаки повреждения в нейронах 2-го, 3-го, 5-го слоев первичной соматосенсорной коры. При этом увеличение участков выпадения перикарионов нейронов, выявленное в 4-м, 5-м слоях первичной соматосенсорной коры, свидетельствовало о развитии атрофических изменений в коре ГМ крыс, что подтвердилось снижением когнитивных функций.

После лечения у стареющих крыс (в возрасте 12–19 мес) обнаружены наименее выраженные патологические изменения в нейронах 2-го, 3-го, 5-го слоев первичной соматосенсорной коры в группе коррекции МФБА, участков выпадения перикарионов нейронов, в первичной соматосенсорной коре у животных данной группы практически отсутствовали, что свидетельствовало о протективном влиянии композиции на структуру коры ГМ крыс.

При морфологическом исследовании

соматосенсорной коры ГМ у крыс с СД без лечения отмечалось значимо большее относительное количество гиперхромных сморщенных нейронов по сравнению с животными без СД (Рис. 10).

В группе фармакоррекции МФБА выявлено статистически значимое снижение удельного количества гиперхромно-сморщенных нейронов во внутреннем пирамидном, в наружном пирамидном и в наружном зернистом слое в сравнении с группой СД без лечения.

У крыс с СД, получавших ГАМК, и ФПС обнаружено достоверное снижение удельного количества гиперхромных нейронов в наружном зернистом слое в сравнении с СД без лечения.

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях длительной гипергликемии в качестве ключевого фактора, противодействующего окислительному стрессу, рассматривается Nrf2, который активирует экспрессию генов, ответственных за экспрессию ферментов антиоксидантной защиты [31]. Поэтому поиск путей активации системы Nrf2 считается потенциальной цитопротекторной стратегией профилактики и лечения заболеваний в основе патогенеза которых лежит окислительный стресс, включая неврологические патологии [32–34].

Система Nrf2 и система NF-κB находятся в антагонистических отношениях. Например, при дефиците Nrf2 наблюдается повышенная активность NF-κB, а активация Nrf2 оказывает противовоспалительное действие во многих моделях воспаления на грызунах. Показано, что Nrf2 подавляет экспрессию генов провоспалительных цитокинов и обладает способностью негативно влиять на NF-κB посредством индукции антиоксидантного ответа [35].

С целью повышения трансляционного потенциала настоящее исследование выполнено на старых животных с экспериментальным СД, у которых уже имело место выраженные функциональные и структурные нарушения в ГМ. Подавляющее большинство исследований, направленных на изучение антидиабетогенных эффектов и диабетических осложнений, выполняли на молодых животных в возрасте 4–6 мес, а длительность моделируемого диабета ограничивали 12–16 нед. При том, что развитие возрастных изменений значительно усугублялось длительной гипергликемией и сопряженным с ней воспалением, глюкозо- и липотоксичностью, окислительным и нитрозативным стрессом.

Исследование носило комплексный характер с оценкой патогенетических изменений на основе морфофункционального подхода. Оно показало, что у старых животных (19 мес) с длительной (7 мес) гипергликемией отмечались выраженные нарушения сенсорных и моторных функций, координации движений, а также выраженное снижение кратковременной, долговременной и пространственной памяти. Эти когнитивные

нарушения в клинике имеют большое значение, т.к. снижают качество жизни больного, а при глубоких нарушениях становятся бременем для семьи и общества и пока смягчение когнитивных нарушений у больных СД остаётся нерешённой задачей, даже при нормализации уровня глюкозы в крови.

Функциональные расстройства в своей основе согласуются с отмеченными на следующем этапе структурными нарушениями. У старых крыс с СД были обнаружены наиболее выраженные признаки повреждения в пирамидных нейронах в СА1 и СА3 зонах гиппокампа, участки выпадений нейронов, значимое увеличение удельного количества нейронов с признаками обратимых изменений (нейроны с гиперхромией цитоплазмы перикарионов без сморщивания), увеличение числа сморщенных гиперхромных нейронов. Это согласуется с данными о прогрессирующих атрофических изменениях, ультраструктурных повреждениях нейронов и синапсов гиппокампа, которые сопровождаются усилением окислительного стресса, нейровоспаления, апоптоза нейронов, а также когнитивным дефицитом, нарушениями обучения и памяти при СД [21, 36, 37].

Использование нами для фармакологической коррекции производных ГАМК, ФПС и особенно МФБА, способствовало достоверному снижению признаков обратимых нарушений в пирамидных нейронах СА1 и СА3 зонах гиппокампа, снижению удельного количества гиперхромных нейронов по сравнению с группой СД без лечения. В то же время используемые препараты не оказали значимого влияния на уровень нейронов с признаками необратимых повреждений (гиперхромные сморщенные нейроны) в пирамидном слое в СА1 и СА3 зонах гиппокампа.

Комплексный анализ структурных изменений в первичной сенсомоторной коре ГМ и гиппокампе старых крыс при экспериментальном СД показал преобладание признаков необратимых и обратимых повреждений нейронов. Эти изменения были более выражены в наружном зернистом, в наружном пирамидном и внутреннем пирамидном слоях. Повреждение нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 зон гиппокампа сопровождалось появлением участков выпадения нейронов и снижением абсолютной и относительных площадей перикарионов нейронов в первичной сенсомоторной коре ГМ, что свидетельствовало о прогрессировании атрофических процессов.

Нарушения когнитивных функций (исследовательской активности, кратковременной и долговременной пространственной памяти) у крыс с СД по сравнению с интактными животными того же возраста (19 мес) сопровождалось развитием морфологических признаков повреждения нейронов и атрофических изменений в первичной сенсомоторной коре головного мозга и гиппокампе. Применение в качестве фармакологической коррекции производных ГАМК в течение 1 мес

способствовало снижению выраженности сенсорно-моторных и когнитивных нарушений, снижению морфологических признаков повреждения нейронов и атрофических изменений, в основе чего может лежать нормализация уровня глюкозы, улучшение вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия, что рассматривается в качестве ведущих патогенетических факторов при развитии диабетической энцефалопатии и ангиопатии [21].

Повреждению нейронов и глии способствует сочетанное влияние повышенного окислительного стресса, нейровоспаления, нейротрансмиттерных аномалий, соответственно, применения препаратов, нормализующих вышеупомянутые процессы, способствует нейропротекции, снижая нейродегенеративные изменения в гиппокампе и коре ГМ при прогрессировании диабетической энцефалопатии [38]. Поэтому мы обратили пристальное внимание на ГАМК, которая стимулирует выработку БК. В данном исследовании отмечено, что уровень БК в ГМ повышался под влиянием как ГАМК, так и её производных, которые применялись в значительно меньших дозах. При этом БК рассматривался как обоснованная терапевтическая мишень благодаря способности повышать активность различных систем защиты организма при воздействии ряда повреждающих факторов: окислительного и нитрозативного стресса, воспаления, митохондриальной дисфункции, апоптоза и гибели клеток, а также на предупреждение процессов раннего старения [12, 39].

Особого внимания заслуживает тот факт, что обнаруженные множественные гетерогенные признаки повреждений в коре ГМ и гиппокампе возникали при сочетании реализации возраст-зависимых факторов в условиях гипергликемии при СД. Соответственно, применение препаратов, оказывающих мультимодальные нейро-, геропротективные, гипогликемические эффекты, становится предпочтительной стратегией терапии. Так, например, показано, что старение и СД сопровождаются снижением выработки БК, экспрессирующегося в почках, головном мозге, бета-клетках поджелудочной железы и других тканях [24, 40, 41], а использование ГАМК приводит к панкреопротективным эффектам, увеличивает уровень циркулирующего БК. ГАМК и БК подавляют активацию белка NF-κB, способствующего стимуляции воспалительных реакций, запускающих апоптоз бета-клеток [12, 39], что позволяет рассматривать производные ГАМК в качестве перспективной группы для изучения их эффектов при лечении диабетической энцефалопатии у пожилых.

Что лежит в основе нейропротекторного действия ГАМК и её производных (МФБА и ФПС)? Ответ на этот вопрос имеет принципиальное значение. Они оказывали однонаправленное действие, улучшая сенсорно-моторную, когнитивную, а также эндотелиальную функцию у крыс с СД. Это может свидетельствовать о сходном механизме

действия. Учитывая аналогию действия ГАМК и БК на β-клетки поджелудочной железы, было показано, что цитопротективное действие ГАМК связано с повышением продукции и уровня БК [12]. У животных с нокаутом по белку БК панкреопротективное действие ГАМК значительно уменьшилось. Поэтому и мы в нашей работе после 30-дневного введения ГАМК определяли содержание БК в ГМ. У животных с СД, не получавших исследуемые вещества, содержание БК в мозге, было значительно ниже, чем у интактных животных. У животных, получавших производные ГАМК, уровень БК был статистически значимо выше, чем у животных контрольной группы. Это действие исследуемых веществ заслуживает особого внимания, потому что его содержание в ГМ, жидких средах, сыворотке крови, моче и др. может служить маркером диабетических осложнений, старения, прогноза деменции и сердечно-сосудистого риска, а также для оценки тяжести течения различных заболеваний, при которых его уровень снижается [42]. Дефицит БК играет важную роль в патогенезе когнитивных нарушений [26], сердечно-сосудистых заболеваний [43].

В настоящее время в литературе представлен широкий спектр биологической активности антивозрастного БК [12, 43, 44]. Установлено, что при многих патологиях (сердечно-сосудистые заболевания, СД, патология почек, старение) его уровень снижается. Поэтому поиск и разработка веществ, стимулирующих продукцию БК, является важной задачей. Применительно к трактовке наших результатов следует отметить его влияние на экспрессию ядерных факторов Nrf2 и NF-κB, которые играют ключевую роль в развитии осложнений СД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У старых животных (в возрасте 19 мес) с длительной (7 мес) гипергликемией были обнаружены нарушения сенсорно-моторных функций, координации движений, выраженное снижение кратковременной и долговременной памяти, а также значительное ухудшение вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов. Данные функциональные нарушения сопровождались развитием морфологических признаков повреждения нейронов и атрофических изменений в первичной сенсомоторной коре ГМ и гиппокампе. По сравнению с интактными животными, у животных с СД без лечения в гомогенатах ГМ были отмечены значимо низкие уровни БК, BDNF и транскрипционного фактора Nrf2, а также более высокие уровни транскрипционного фактора NF-κB, MDA и ФНО-α.

Курсовое введение ГАМК, её линейного и циклического производного (МФБА и ФПС) способствовало повышению продукции ГПП-1 и нормализации углеводного обмена, снижению выраженности когнитивных и сенсорно-моторных нарушений, улучшению вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия, что

сопровождалось уменьшением морфологических признаков повреждения нейронов.

Нейропротекторные свойства ГАМК и её производных при диабетической энцефалопатии у старых животных можно объяснить повышением в тканях ГМ уровня антивозрастного БК, мозгового нейротрофического фактора (BDNF), уровня

транскрипционного фактора Nrf2, который регулирует активность ферментов антиоксидантной защиты, а также снижением уровня ядерного транскрипционного фактора NfκB и ФНО-α, отвечающих за формирование и поддержание воспалительных процессов, лежащих в основе развития осложнений СД.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РНФ от 19.04.2021 г. № 21-15-00192.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.Н. Тюренков – идея и планирование исследования, написание черновика статьи, утверждение финальной версии рукописи; Д.А. Бакулин – моделирование и контроль патологии, оформление финальной версии рукописи; А.В. Смирнов, А.И. Бисинбекова, Г.Л. Снигур, Ю.И. Великородная, М.Р. Экова – проведение гистохимического окрашивания и оценка морфологических изменений в гиппокампе и сенсомоторной коре головного мозга, анализ и описание результатов; Е.И. Морковин – оценка психоневрологического дефицита; Д.В. Верхоляк – оценка мозгового кровотока и функционального состояния эндотелия сосудов головного мозга; О.С. Васильева – разработка исследуемых соединений. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Magliano D.J., Boyko E.J. IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. IDF DIABETES ATLAS [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2021. [cited 2023 August 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581934>
- Сваровская А.В., Гарганеева А.А. Сахарный диабет 2 типа и сердечная недостаточность — современный взгляд на механизмы развития. Сахарный диабет. — 2022. — Т. 25, № 3. — С. 267–274. DOI: 10.14341/DM12648
- Бондарь И.А., Демин А.А., Гражданкина Д.В. Сахарный диабет 2 типа: взаимосвязь исходных клинико-лабораторных и эхокардиографических показателей с отдалёнными неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями. Сахарный диабет. — 2022. — Т. 25, № 2. — С. 136–144. DOI: 10.14341/DM12823
- van Duinkerken E., Ryan C.M. Diabetes mellitus in the young and the old: Effects on cognitive functioning across the life span // *Neurobiol Dis.* — 2020. — Vol. 134. — Art. ID: 104608. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104608
- Dao L., Choi S., Freeby M. Type 2 diabetes mellitus and cognitive function: understanding the connections // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* — 2023. — Vol. 30, No. 1. — P. 7–13. DOI: 10.1097/MED.0000000000000783
- Sebastian M.J., Khan S.K., Pappachan J.M., Jeeyavudeen M.S. Diabetes and cognitive function: An evidence-based current perspective // *World J Diabetes.* — 2023. — Vol. 14, No. 2. — P. 92–109. DOI: 10.4239/wjd.v14.i2.92
- Xue M., Xu W., Ou Y.N., Cao X.P., Tan M.S., Tan L., Yu J.T. Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies // *Ageing Res Rev.* — 2019. — Vol. 55. — Art. ID: 100944. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100944
- Barbiellini Amidei C., Fayosse A., Dumurgier J., Machado-Fraga M.D., Tabak A.G., van Sloten T., Kivimäki M., Dugravot A., Sabia S., Singh-Manoux A. Association Between Age at Diabetes Onset and Subsequent Risk of Dementia // *JAMA.* — 2021. — Vol. 325, No. 16. — P. 1640–1649. DOI: 10.1001/jama.2021.4001
- Selman A., Burns S., Reddy A.P., Culbertson J., Reddy P.H. The Role of Obesity and Diabetes in Dementia // *Int J Mol Sci.* — 2022. — Vol. 23, No. 16. — Art. ID: 9267. DOI: 10.3390/ijms23169267
- Jiménez-Balado J., Eich T.S. GABAergic dysfunction, neural network hyperactivity and memory impairments in human aging and Alzheimer's disease // *Semin Cell Dev Biol.* — 2021. — Vol. 116. — P. 146–159. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.01.005
- Тюренков И.Н., Файбисович Т.И., Дубровина М.А., Бакулин Д.А., Куркин Д.В. ГАМК-ергическая система в регуляции функционирования бета-клеток поджелудочной железы в условиях нормы и при сахарном диабете // *Успехи физиологических наук.* — 2023. — Т. 54, № 2. — С. 86–104. DOI: 10.31857/s030117982302008x
- Prud'homme G.J., Glinka Y., Kurt M., Liu W., Wang Q. The anti-aging protein Klotho is induced by GABA therapy and exerts protective and stimulatory effects on pancreatic beta cells // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2017. — Vol. 493, No. 4. — P. 1542–1547. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.029
- Hagan D.W., Ferreira S.M., Santos G.J., Phelps E.A. The role of GABA in islet function // *Front Endocrinol (Lausanne).* — 2022. — Vol. 13. — Art. ID: 972115. DOI: 10.3389/fendo.2022.972115
- Soltani N., Qiu H., Aleksic M., Glinka Y., Zhao F., Liu R., Li Y., Zhang N., Chakrabarti R., Ng T., Jin T., Zhang H., Lu W.Y., Feng Z.P., Prud'homme G.J., Wang Q. GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes // *Proc Natl Acad Sci*

- USA. – 2011. – Vol. 108, No. 28. – P. 11692–11697. DOI: 10.1073/pnas.1102715108
15. Кустова М.В., Перфилова В.Н., Завадская В.Е., Варламова С.В., Кучерявенко А.С., Музыко Е.А., Прокофьев И.И., Тюренок И.Н. Влияние соединений РГПУ-238 и РГПУ-260 на вазодилатирующую и антитромботическую функции эндотелия крыс после хронической алкогольной интоксикации. Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2023. – Т. 18, № 1. – С. 54–58. DOI: 10.14300/mnnc.2023.18013
16. Тюренок И.Н., Бакулин Д.А., Борисов А.В., Абросимова Е.Е., Верхоляк Д.В., Васильева О.С. Эндотелиопротективное действие ГАМК и нового производного ГАМК - композиции МФБА у животных после длительной диабетической гипергликемии. Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86, № 7. – С. 13–18. DOI: 10.30906/0869-2092-2023-86-7-13-18
17. Бородин Л.Е., Багметова В.В., Тюренок И.Н. Сравнительное изучение нейротекторного и противосудорожного действия циклических аналогов ГАМК пирасетама, фенотропила, фепирона и его композиций с органическими кислотами. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 8. – С. 14–20.
18. Тюренок И.Н., Смирнов А.В., Бакулин Д.А., Великородная Ю.И., Быхалов Л.С. Патоморфоз экспериментальной диабетической кардиомиопатии при фармакологической коррекции сукцикардом. Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2023. – Т. 20, № 1. – С. 53–57.
19. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. *Physiol Bohemoslov.* – 1978. – Vol. 27, No. 2. – P. 140–144.
20. Peng X., Wang X., Fan M., Zhao J., Lin L., Liu J. Plasma levels of von Willebrand factor in type 2 diabetes patients with and without cardiovascular diseases: A meta-analysis // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2020. – Vol. 36, No. 1. – Art. ID: e3193. DOI: 10.1002/dmrr.3193
21. Hamed S.A. Brain injury with diabetes mellitus: evidence, mechanisms and treatment implications // *Expert Rev Clin Pharmacol.* – 2017. – Vol. 10, No. 4. – P. 409–428. DOI: 10.1080/17512433.2017.1293521
22. van de Vorst I.E., Koek H.L., de Vries R., Bots M.L., Reitsma J.B., Vaartjes I. Effect of Vascular Risk Factors and Diseases on Mortality in Individuals with Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis // *J Am Geriatr Soc.* – 2016. – Vol. 64, No. 1. – P. 37–46. DOI: 10.1111/jgs.13835
23. Anstey K.J., Ee N., Eramudugolla R., Jagger C., Peters R. A Systematic Review of Meta-Analyses that Evaluate Risk Factors for Dementia to Evaluate the Quantity, Quality, and Global Representativeness of Evidence // *J Alzheimers Dis.* – 2019. – Vol. 70, No. s1. – P. S165–S186. DOI: 10.3233/JAD-190181
24. Prud'homme G.J., Kurt M., Wang Q. Pathobiology of the Klotho Antiaging Protein and Therapeutic Considerations // *Front Aging.* – 2022. – Vol. 3. – Art. ID: 931331. DOI: 10.3389/fragi.2022.931331
25. Abraham C.R., Li A. Aging-suppressor Klotho: Prospects in diagnostics and therapeutics // *Ageing Res Rev.* – 2022. – Vol. 82. – Art. ID: 101766. DOI: 10.1016/j.arr.2022.101766
26. Hanson K., Fisher K., Hooper N.M. Exploiting the neuroprotective effects of α -klotho to tackle ageing and neurodegeneration-related cognitive dysfunction // *Neuronal Signal.* – 2021. – Vol. 5, No. 2. – Art. ID: NS20200101. DOI: 10.1042/NS20200101
27. Kim O.Y., Song J. The importance of BDNF and RAGE in diabetes-induced dementia // *Pharmacol Res.* – 2020. – Vol. 160. – Art. ID: 105083. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105083
28. Moosaie F., Mohammadi S., Saghaizadeh A., Dehghani Firouzabadi F., Rezaei N. Brain-derived neurotrophic factor in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis // *PLoS One.* – 2023. – Vol. 18, No. 2. – Art. ID: e0268816. DOI: 10.1371/journal.pone.0268816
29. Magariños A.M., McEwen B.S. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97, No. 20. – P. 11056–11061. DOI: 10.1073/pnas.97.20.11056
30. Wrighten S.A., Piroli G.G., Grillo C.A., Reagan L.P. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging // *Biochim Biophys Acta.* 2009. – Vol. 1792, No. 5. – P. 444–453. DOI: 10.1016/j.bbadis.2008.10.013
31. Kiani B., Yarahmadi S., Nabi-Afjadi M., Eskandari H., Hasani M., Abbasian Z., Bahreini E. A Comprehensive Review on the Metabolic Cooperation Role of Nuclear Factor E2-Related Factor 2 and Fibroblast Growth Factor 21 against Homeostasis Changes in Diabetes // *Clinical Diabetology.* – 2022. – Vol. 11, No. 6. P. – 409–419. DOI: 10.5603/dk.a2022.0051
32. Chun K.S., Raut P.K., Kim D.H., Surh Y.J. Role of chemopreventive phytochemicals in NRF2-mediated redox homeostasis in humans // *Free Radic Biol Med.* – 2021. – Vol. 172. – P. 699–715. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.031
33. Lee J., Jang J., Park S.M., Yang S.R. An Update on the Role of Nrf2 in Respiratory Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, No. 16. – Art. ID: 8406. DOI: 10.3390/ijms22168406
34. Wang Y.H., Gao X., Tang Y.R., Yu Y., Sun M.J., Chen F.Q., Li Y. The Role of NF- κ B/NLRP3 Inflammation Signaling Pathway in Attenuating Pyroptosis by Melatonin Upon Spinal Nerve Ligation Models // *Neurochem Res.* – 2022. – Vol. 47, No. 2. – P. 335–346. DOI: 10.1007/s11064-021-03450-7
35. van der Horst D., Carter-Timofte M.E., van Grevenynghe J., Laguet N., Dinkova-Kostova A.T., Olganier D. Regulation of innate immunity by Nrf2 // *Curr Opin Immunol.* – 2022. – Vol. 78. – Art. ID: 102247. DOI: 10.1016/j.coi.2022.102247
36. Milne N.T., Bucks R.S., Davis W.A., Davis T.M.E., Pierson R., Starkstein S.E., Bruce D.G. Hippocampal atrophy, asymmetry, and cognition in type 2 diabetes mellitus // *Brain Behav.* – 2017. – Vol. 8, No. 1. – Art. ID: e00741. DOI: 10.1002/brb3.741
37. Kirshenbaum G.S., Chang C.Y., Bompalaki M., Bradford V.R., Bell J., Kosmidis S., Shansky R.M., Orlandi J., Savage L.M., Harris A.Z., David Leonardo E., Dranovsky A. Adult-born neurons maintain hippocampal cholinergic inputs and support working memory during aging // *Mol Psychiatry.* – 2023. DOI: 10.1038/s41380-023-02167-z
38. Zhou X., Zhu Q., Han X., Chen R., Liu Y., Fan H., Yin X. Quantitative-profiling of neurotransmitter abnormalities in the disease progression of experimental diabetic encephalopathy rat // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2015. – Vol. 93, No. 11. – P. 1007–10013. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0118

39. Li X., Li Z., Li B., Zhu X., Lai X. Klotho improves diabetic cardiomyopathy by suppressing the NLRP3 inflammasome pathway // *Life Sci.* – 2019. – Vol. 234. – Art. ID: 116773. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116773
40. Landry T., Shookster D., Huang H. Circulating α -klotho regulates metabolism via distinct central and peripheral mechanisms // *Metabolism.* – 2021. – Vol. 121. – Art. ID: 154819. DOI: 10.1016/j.metabol.2021.154819
41. Youssef O.M., Morsy A.I., El-Shahat M.A., Shams A.M., Abd-Elhady S.L. The neuroprotective effect of simvastatin on the cerebellum of experimentally-induced diabetic rats through klotho upregulation: An immunohistochemical study // *J Chem Neuroanat.* – 2020. – Vol. 108. – Art. ID: 101803. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2020.101803
42. Yi S.S. Disease predictability review using common biomarkers appearing in diabetic nephropathy and neurodegeneration of experimental animals // *Lab Anim Res.* – 2022. – Vol. 38, No. 1. – Art. ID: 3. DOI: 10.1186/s42826-022-00113-8
43. Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Nesterova A.A., Glinka Y. Klotho Protein and Cardio-Vascular System // *Biochemistry (Mosc).* – 2021. – Vol. 86, No. 2. – P. 132–145. DOI: 10.1134/S0006297921020024
44. Нестерова А.А., Глинка Е.Ю., Тюреньков И.Н., Перфилова В.Н. Белок Клото – универсальный регулятор физиологических процессов в организме // *Успехи физиологических наук.* – 2020. – Т. 51, № 2. – С. 88–104. DOI: 10.31857/S0301179820020083

АВТОРЫ

Иван Николаевич Тюреньков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; член-корреспондент РАН. ORCID ID: 0000-0001-7574-3923. E-mail: fibfuv@mail.ru

Бакулин Дмитрий Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-4694-3066. E-mail: mbfdoc@gmail.com

Смирнов Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-5351-6105. E-mail: alexeysmirnov.volggmu@gmail.com

Экова Мария Рафаэлевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, сотрудник лаборатории морфофармакологии ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0001-8655-1441. E-mail: maria.ekova@mail.ru

Бисинбекова Айслу Ильнуровна – ординатор по специальности «Патологическая анатомия» ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; младший научный сотрудник ГБУ ВМНЦ. E-mail: aandm08@mail.ru

Григорий Леонидович Снигур – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; директор ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0002-8612-6186. E-mail: sgrigoryl@mail.ru

Великородная Юлия Ивановна – заочный аспирант кафедры фармакологии и фармации ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0003-2976-6352. E-mail: alta-u@mail.ru

Морковин Евгений Игоревич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией нейрорепродуктивной фармакологии НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7119-3546. Email: e.i.morkovin@gmail.com

Верхоляк Дмитрий Викторович – ассистент кафедры химии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6783-1867. E-mail: verholiakdima@mail.ru

Васильева Ольга Сергеевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории нитросоединений ФГБОУ ВО РГПУ им. А.И. Герцена. ORCID ID: 0000-0002-0309-1580. E-mail: ovasja@gmail.com