

ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЛИПОСОМИРОВАННЫХ ФОРМ АЦЕТИЛХОЛИНА И ИНСУЛИНА ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА КОГНИТИВНЫХ, ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫХ И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРЫС

В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин*, С.Л. Люблинский, И.А. Помыткин, О.В. Алимкина,
Л.А. Табоякова, А.В. Капцов, М.М. Борисова, Н.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Изучены центральные механизмы липосомированных форм ацетилхолина и инсулина при транскутальном введении крысам. Анализ параметров ультразвуковой вокализации, свободного поведения и когнитивных функций показал непосредственное влияние тестируемых веществ на основные механизмы высшей нервной деятельности. Посредством комплексного биомедицинского тестирования установлены и подтверждены анксиолитические признаки с седативным компонентом, обеспечивающие улучшение консолидации памяти и умственных способностей. Наиболее выраженный эффект по анализу ультразвуковой вокализации обнаруживается для инсулина, а наиболее информативные этологические параметры крыс по анализу антидепрессивных свойств в лабиринте установлены на фоне применения ацетилхолина. Курсовое применение в течение 7-ми дней липосомированного инсулина повышает когнитивные способности животных более чем в два раза, ацетилхолина — более чем в четыре раза, что отражает высокочастотные β - и γ -ритмы (выше 20 Гц) гиппокампа, связанные с активностью вставочных нейронов и пирамидных клеток головного мозга. Инновационная таргетная доставка лекарственных веществ на основе нейромедиаторов и гормонов оказывает убедительное влияние ацетилхолина и инсулина на холинергическую и ГАМК-ергическую системы, а также позволяет моделировать и изучать механизмы и способы лечения нейропатий.

Ключевые слова: ацетилхолин, инсулин, когнитивные функции, психоэмоциональное состояние, поведение, липосомы, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Помыткин И.А., Алимкина О.В., Табоякова Л.А., Капцов А.В., Борисова М.М., Каркищенко Н.Н. Центральные механизмы липосомированных форм ацетилхолина и инсулина посредством анализа когнитивных, психоэмоциональных и поведенческих параметров крыс. *Биомедицина*. 2022;18(1):32–55. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-1-32-55>

Поступила 20.09.2021

Принята после доработки 24.01.2021

Опубликована 10.03.2022

CENTRAL MECHANISMS OF LIPOSOMATED FORMS OF ACETYLCHOLIN AND INSULIN REVEALED BY AN ANALYSIS OF COGNITIVE, PSYCHO-EMOTIONAL AND BEHAVIORAL PARAMETERS OF RATS

Vladislav N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin*, Stanislav L. Lyublinskiy, Igor A. Pomytkin,
Oksana V. Alimkina, Lidiya A. Taboyakova, Alexander V. Kaptsov, Mariya M. Borisova,
Nikolay N. Karkischenko

*Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1*

Central mechanisms of the liposomal forms of acetylcholine and insulin were studied during their transmucosal administration to rats. An analysis of the parameters of ultrasonic vocalization, free behavior and cognitive functions showed a direct effect of the tested substances on the main mechanisms of higher nervous activity. By means of complex biomedical testing, anxiolytic signs with a sedative component were established and confirmed, providing an improvement in the consolidation of memory and mental abilities. The most pronounced effect in the analysis of ultrasonic vocalization was observed for insulin, while the most informative ethological parameters of rats in the analysis of antidepressant properties in the maze test were established for acetylcholine. The administration of liposomal insulin and acetylcholine for 7 days increases the cognitive abilities of animals by more than two times and four times, respectively. This reflects high-frequency β - and γ -rhythms (above 20 Hz) of the hippocampus associated with the activity of intercalary neurons and pyramidal brain cells. Innovative targeted delivery of the drugs based on neurotransmitters and hormones has a convincing effect of acetylcholine and insulin on the cholinergic and GABAergic systems. This also facilitates modeling and studying the mechanisms and methods of treating neuropathies.

Keywords: acetylcholine, insulin, cognitive functions, psycho-emotional state, behavior, liposomes, rats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L., Pomytkin I.A., Alimkina O.V., Tabolyakova L.A., Kaptsov A.V., Borisova M.M., Karkischenko N.N. Central Mechanisms of Liposomated Forms of Acetylcholine and Insulin Revealed by an Analysis of Cognitive, Psycho-Emotional and Behavioral Parameters of Rats. *Journal Biomed.* 2022;18(1):32–55. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-1-32-55>

Submitted 20.09.2021

Revised 24.01.2022

Published 10.03.2022

Введение

В доклинических исследованиях механизмов действия потенциальных лекарственных веществ и фармакологических средств особое место занимает изучение их влияния на характеристики поведения, эмоционального статуса и когнитивных способностей животных. Сведения о функциях всех уровней ЦНС могут быть получены с помощью различных неврологических тестов, включая «Открытое поле» и различные лабиринты. Помещение животного (крысы) в новое окружение ведёт к возникновению исследовательского поведения, которому в то же время препятствуют условия, вызывающие страх. Две антагонистические тенденции характеризуются различным временным ходом. По этой причине, несмотря на уменьшение страха, активность животного к концу опыта снижается.

Лучшим выражением уменьшения страха у животных является исследование ими внутренних секторов, которое постепенно становится более интенсивным от опыта к опыту. Как правило, ориентировочно-исследовательская реакция крыс оценивается по горизонтальной и вертикальной двигательной активности, времени реакции обнюхивания. В то же время эмоциональный статус животного оценивают по числу болюсов, уринаций, груминговой активности, времени выхода из центра и времени замирания [1]. Помимо этого, информативные данные о животных могут быть получены путём измерения их вокализации, существенная часть которой представлена в ультразвуковом диапазоне: она может служить мерой оценки текущего состояния животных и является важной коммуникативной особенностью, которая должна принимать-

ся во внимание при анализе различных социальных аспектов (спаривание, кормление, агрессия, защита и т. д.) [44].

Ацетилхолин (АЦХ) играет критическую роль в развитии и активности коры головного мозга, контроле мозгового кровотока и цикла «сон — бодрствование», а также в модуляции когнитивных функций и процессов обучения и памяти [37]. Уровни ацетилхолина зависят от активности двух противоположно действующих ферментов — холин-ацетилтрансферазы (ChAT; EC 2.3.1.6), катализирующей образование ацетилхолина из холина и ацетил-CoA, и ацетилхолинэстеразы (AChE; EC 3.1.1.7), катализирующей гидролитическое расщепление ацетилхолина. При старении холинэргические нейроны претерпевают умеренные дегенеративные изменения, приводящие к снижению уровней ацетилхолина и холинэргической гипofункции, а также к снижению памяти, наиболее выраженному при болезни Альцгеймера (БА). Ингибиторы ацетилхолинэстеразы, разработанные в рамках этой холинэргической гипотезы, продолжают оставаться основным фармакологическим классом среди средств симптоматического лечения БА [28].

Мозг является инсулинчувствительным органом. Инсулиновые рецепторы (InsR) широко распространены в структурах мозга, где они локализованы преимущественно в синапсах нейронов и в меньшей степени — в астроцитарных клетках [8, 16, 33]. InsR участвуют в формировании и ремоделировании синапсов [12], а также в регуляции синаптической пластичности [15]. Инсулин дозозависимо стимулирует транслокацию функциональных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) к клеточной мембране [39] и потенцирует токи рецепторов NMDA [19, 24, 25], облегчая таким образом возбуждающую нейротрансмиссию. Кроме того, инсулин стимулирует транслокацию субъединиц рецептора γ -аминомасляной кисло-

ты типа A (ГАМКА) к поверхности мембраны и увеличивает число функциональных ГАМКА в клеточной мембране [18, 43], тем самым способствуя ингибирующей нейротрансмиссии. InsR участвует в модуляции долговременной потенциации (LTD) и долговременной депрессии (LTD), обучении и памяти [27]. Функции инсулина в мозге не ограничиваются его синаптическими эффектами, но также связаны с его способностью повышать метаболизм глюкозы в мозге. Регулируемый инсулином транспортер глюкозы 4 (GLUT4) экспрессируется в областях мозга, связанных с когнитивным поведением, таких как базальные отделы переднего мозга, гиппокамп, миндалевидное тело, кора головного мозга и мозжечок [9], а также в гипоталамусе, контролирующем потребление пищи и массу тела [22]. Инсулин стимулирует транслокацию GLUT4 в плазматическую мембрану гиппокампа крысы [17], усиливая локальный гликолитический метаболизм и пространственную память [26], особенно во время обучения, сопровождающегося высокой потребностью в энергии [32]. Ингибирование GLUT4 предотвращало эффект усиления когнитивных функций инсулином [31]. Нарушенная передача сигналов InsR вместе с синаптической недостаточностью являются наиболее ранними признаками БА и предшествуют явной дегенерации нейронов [38, 40, 41]. Центральная инсулиновая резистентность, т. е. снижение биологического ответа на инсулин в клетках мозга, рассматривается как один из ключевых патогенетических факторов, находящихся на пересечении метаболических и когнитивных нарушений [23]. В подтверждение этой гипотезы интраназальный инсулин улучшал когнитивные функции у лиц с мягким когнитивным снижением и ранней БА при терапии в течение 4 мес. [14].

О взаимодействии холинэргической системы и инсулиновой сигнальной системы в мозге известно недостаточно,

но то, что известно, указывает на их кооперативное взаимодействие. Совместная локализация InsR и ChAT была обнаружена в нейронах коры головного мозга человека [35, 42]. Молекулярные компоненты сигнальной системы инсулина, такие как InsR, субстрат инсулинового рецептора 1 (IRS-1), протеинкиназа B (PKB или Akt) и гликогенсинтазы киназа 3β (GSK- 3β), ко-экспрессируются с маркерами холинэргической системы, такими как ChAT, в пирамидальных клетках CA1 региона гиппокампа мыши, что, по мнению авторов, указывает на участие инсулиновой сигнализации в выполнении холинэргическими нейронами их функций [42]. Данные о степени и направлении влияния инсулина на активность ферментов холинэргической системы ChAT и AChE во многом противоречивы и показывают зависимость этих эффектов от локализации нейронов. Инсулин повышал активность ChAT в культуре септальных холинэргических нейронов [10, 21], культуре нейрональных клеток человека PNET2 [35], в нейронах сетчатки глаза [34], но снижал активность ChAT в нейронах стриатума [10]. Инсулин не влиял на активность AChE в гомогенатах мозга крыс в физиологическом интервале концентраций, но повышал эту активность в концентрациях, превышающих физиологические [11]. Инсулин незначительно снижал мРНК AChE и не влиял на экспрессию белка AChE в культуре нейрональных клеток человека PNET2. У больных БА прогрессивное снижение экспрессии инсулина и InsR в коре мозга происходило с одновременным утяжелением клинических симптомов БА и снижением мРНК ChAT при неизменном уровне экспрессии AChE [35]. В целом эти данные указывают на то, что активность инсулина в областях мозга, связанных с выполнением когнитивных функций, по-видимому, направлена на повышение экспрессии ChAT в холинэргических нейронах и на усиление синтеза ацетилхолина,

что особенно важно при лечении гериатрической дисфункции памяти и БА (рис. 1).

Достичь эффективной концентрации в клетке-мишени позволяет адресная доставка лекарственных препаратов с помощью липосом. Основным преимуществом липосомальных частиц является их способность к биodeградации и иммунологической нейтральности, что позволяет улучшить профиль безопасности ЛС. Основным компонентом липосомальной мембраны являются фосфолипиды, которые обеспечивают её прочность и защиту от механических воздействий. Липосомальные частицы различаются по размеру и количеству бислойных оболочек, образующих везикулы; также выделяют липосомы с неламеллярной организацией. Состав и размер липосом выбирают в зависимости от поставленных целей, включая в мембрану вспомогательные вещества, влияющие на свойства и функции липосом, в т. ч. на скорость высвобождения содержимого везикул, сродство липосом к ткани-мишени и др. Создание липосом, чувствительных к различным внешним или внутренним физико-химическим стимулам, позволяет реализовать эффективность ЛС, локализовать место его действия и уменьшить количество и серьёзность побочных явлений.

Таким образом, применение липосомированных форм потенциальных лекарственных веществ в качестве инновационной системы их таргетной доставки определило область интересов настоящего исследования.

Целью работы явилось изучение центральных механизмов липосомированных форм ацетилхолина и инсулина посредством анализа психоэмоциональных, поведенческих и когнитивных параметров крыс.

Материалы и методы

Объекты исследований

Лабораторные крысы-самцы линии WAG/GY в возрасте 2 мес., конвенцио-

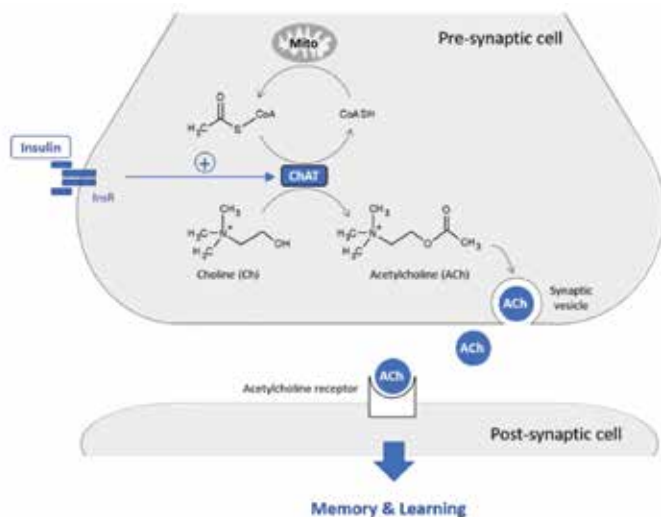


Рис. 1. Влияние инсулина на синтез ацетилхолина и холинэргическую нейротрансмиссию. Инсулиновый рецептор (InsR) и холинацетилтрансфераза (ChAT) ко-экспрессируются в холинэргических нейронах [35, 42]. Инсулин стимулирует экспрессию ChAT, усиливая таким образом синтез ацетилхолина (ACh) из холина (Ch) в коре головного мозга [35]. ACh накапливается в синаптических везикулах, секретируется в синаптическую щель и нейротрансмиссию, критически важную в процессах обучения и памяти.

Fig. 1. Effect of insulin on acetylcholine synthesis and cholinergic neurotransmission. The insulin receptor (InsR) and choline acetyltransferase (ChAT) are co-expressed in cholinergic neurons [35, 42]. Insulin stimulates ChAT expression, thus enhancing the synthesis of acetylcholine (ACh) from choline (Ch) in the cerebral cortex [35]. ACh accumulates in synaptic vesicles, is secreted into the synaptic cleft, and binds to acetylcholine receptors on the postsynaptic membrane, triggering cholinergic neurotransmission, which is critical in learning and memory processes.

нального статуса, с начальной средней массой 200±10 г, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл., Чеховский р-н). Животные методом рандомизации были разделены на контрольную и две опытные группы по 8 особей в каждой.

Животные содержались в микроизоляторной системе RAIR IsoSystem по 5 особей в клетке. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма — стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура возду-

ха — 18–22°C, относительная влажность — 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине в течение 7 дней в клетках. Кормление, содержание, карантин и обращение с животными соответствовали правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследования выполнялись согласно утверждённому письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию эксперимен-

тально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [6].

До эксперимента регистрировались фоновые данные, затем эксперимент проводился на 1-й, 2-й, 4-й и 7-й дни курсового введения (через 1 ч после введения) и через 2 дня (9-й день) после окончания курса введения.

Получение липосом с инсулином и ацетилхолином

Для включения в липосомы готовили р-ры инсулина и ацетилхолина в предварительно подогретой до $30 \pm 2^\circ\text{C}$ деионизованной воде.

В подготовленные р-ры постепенно, при постоянном медленном перемешивании, вносили 70%-й фосфатидилхолин с индексом окисленности не более 0,25 до его конечной концентрации 10%.

Подготовленные р-ры инсулина и ацетилхолина с лецитином диспергировали до образования гомогенной преддисперсии, постепенно увеличивая скорость оборотов до 20 тыс. об./мин.

Полученные преддисперсии обрабатывали на гомогенизаторе высокого давления в течение 3–5 циклов по 3–5 мин каждый, постепенно поднимая давление от 10 до 40–80 Мпа, при температуре $33 \pm 3^\circ\text{C}$, постоянно контролируя размер полученных частиц с помощью анализатора размера частиц методом лазерной дифракции света (638 нм). При достижении частицами среднего размера 150 ± 50 нм гомогенизация завершали.

По окончании гомогенизации в дисперсию добавляли криопротектор в соотношении к фосфолипидам 1:2 и вновь гомогенизировали в течение одного цикла при 10–20 МПа для получения конечного р-ра липосом.

Подготовленные липосомальные дисперсии лиофилизировали. В полученных конечных продуктах содержалось 100 мг (2860 МЕ) инсулина и 100 мг ацетилхолина.

Способ введения и дозы исследуемых нейротропных средств

Липосомированные формы АЦХ и инсулина вводились трансмукозально в дозах, эквивалентных массе тела крыс, ежедневно, однократно, в течение 7-ми сут, что позволяет установить информативные признаки их влияния на центральную нервную систему (ЦНС) животных.

Ежедневная доза АЦХ в липосомах составляла 2,5 мг/кг (по АЦХ), или 34 мг/кг (по лиофилизату); доза инсулина в липосомах — 270 мг/кг (исходя из расчёта 10 МЕ/организм).

Контрольная группа животных получала эквивоёмное количество липосом в физ. р-ре, вводимых аналогичным способом.

Выявление центральных механизмов действия нейротропных средств

Анализ когнитивных функций

Когнитивные функции, которые, по нашим собственным данным и сведениям зарубежной литературы [2, 3, 4, 29, 30], связаны с активностью высокочастотного γ -диапазона электрограмм мозга [7, 13, 20, 36], оценивались с помощью инструментальных методов измерения элементарных проявлений и перцептивных циклов сложных поведенческих эквивалентов психомоторных реакций человека.

Условная реакция активного избегания (УРАИ)

Каждое животное помещалось в камеру «Шелтер» (ООО «Нейроботикс», Россия). К программному обеспечению фирмы-производителя применялся следующий разработанный сценарий (УРАИ-НЦБМТ): 5 сек — свет, 2 сек — звук, 5 сек — электрораздражение. Суммарный цикл (12 сек) повторялся 5 раз. При первом измерении (фоновые данные) крысы обучались переходить из одного отсека камеры в другой таким образом, чтобы не получить электрокожного раздражения (запоминая, что сначала

в отсеке камеры, где они находятся, включается свет, потом звук, потом — электроток). Регистрировалось время реакции в секундах по каждому из 5-ти циклов (максимально — 12 сек), а также суммарное перемещение (пройденный путь) в метрах. Таким образом, общее время теста составляло 1 мин, после чего крыса извлекалась из камеры и возвращалась в клетку.

Анализ психоэмоциональных параметров

Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack («Metris B.V.», Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20–25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрацию ультразвуковых колебаний осуществляли в течение 15 мин, непрерывно. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнявая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам. Для оценки статистической значимости изменений внутри группы использовали 95%-й доверительный интервал.

Анализ поведенческих параметров

Тест «Открытое поле»

Регистрация поведенческих компонентов происходила с применением компьютерной системы Laboras («Metris B.V.», Нидерланды), которая позволяла вычислять длительность таких форм поведения, как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность (иммобилизация), стойки

(вертикальная активность), умывание (груминг). Кроме того, оценивалось время прочих элементов системного поведения.

По каждому животному определяли длительность каждой формы поведения от общего интервала исследования, составлявшего 15 мин (900 сек). Полученные данные группировали в зависимости от тестируемого препарата, временного промежутка и формы поведения, рассчитывали среднее значение каждого показателя по группе животных и сравнивали с сопоставимым результатом контрольной группы.

Приподнятый крестообразный лабиринт

Регистрация этологических компонентов, отражающих психоэмоциональные и ориентировочно-исследовательские функции животных, происходила с применением установки «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ООО «Открытая наука», Россия) и видеокамеры «Минотавр» (ООО «Нейроботикс», Россия), которая записывала данные в цифровом формате, а с помощью программного обеспечения вычислялись такие формы поведения, как длительность нахождения в центральной зоне лабиринта, открытых и закрытых «рукавах», количество стоек (вертикальная активность).

Общая длительность исследования составляла 1 мин (60 сек). Полученные данные группировали в зависимости от тестируемого препарата, временного промежутка и формы поведения, рассчитывали среднее значение каждого показателя по группе животных и сравнивали с сопоставимым результатом контрольной группы.

Результаты и их обсуждение

Анализ когнитивных функций

Результаты исследования когнитивных функций крыс с помощью УРАИ-теста представлены в табл. 1.

Установлено, что оба исследованных вещества значительно улучшают когнитивные

Таблица 1. Время реакции (среднее по группе) крыс в тесте «Условная реакция активного избегания», сек
Table 1. Reaction time (average for the group) of rats in the conditioned active avoidance test, sec

| Период | Группа | M±m, сек | % к фону | Разница с контролем, % |
|----------|--------------|-----------|----------|------------------------|
| Фон | АЦХ-липо | 7,2±1,05 | 100 | |
| | Инсулин-липо | 6,4±1,16 | 100 | |
| | Контроль | 5,9±0,86 | 100 | |
| 1-й день | АЦХ-липо | 9,9±0,99 | 137 | 35 |
| | Инсулин-липо | 9,2±1,27 | 144 | 28 |
| | Контроль | 10,2±0,62 | 172 | |
| 2-й день | АЦХ-липо | 8,5±1,40 | 117 | 47 |
| | Инсулин-липо | 10,8±0,66 | 170 | 6 |
| | Контроль | 9,7±1,16 | 164 | |
| 4-й день | АЦХ-липо | 11,3±0,41 | 156 | 36 |
| | Инсулин-липо | 11,4±0,39 | 179 | 14 |
| | Контроль | 11,4±0,43 | 193 | |
| 7-й день | АЦХ-липо | 11,7±0,37 | 161 | 39 |
| | Инсулин-липо | 10,9±0,63 | 171 | 30 |
| | Контроль | 11,8±0,19 | 201 | |
| 9-й день | АЦХ-липо | 11,1±0,74 | 153 | 51 |
| | Инсулин-липо | 11,5±0,57 | 180 | 24 |
| | Контроль | 12,0±0,00 | 204 | |

Фоновые данные

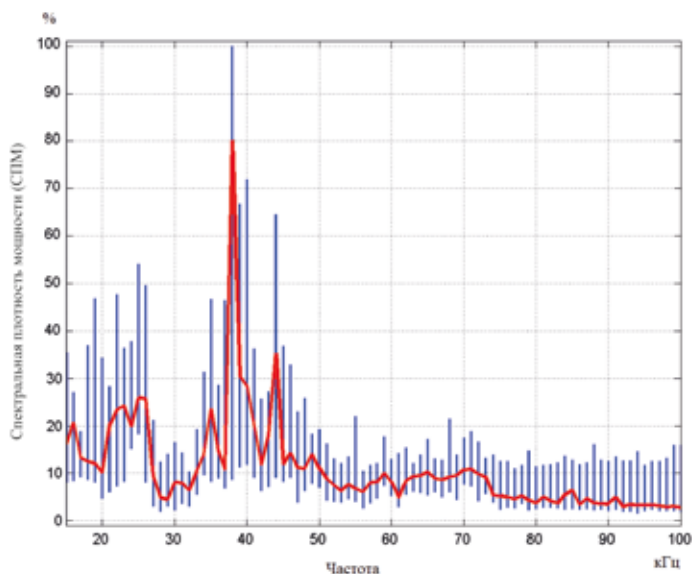


Рис. 2. УЗВ крыс группы «Контроль» в фоновых измерениях. По оси абсцисс — частота УЗВ, кГц. По оси ординат — спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Красная кривая — медианы частот, синие линии — 95%-й доверительный интервал (25-й и 75-й процентили).

Fig. 2. USV of rats in the control group in background measurements. The abscissa shows the USV frequency, kHz. The y-axis shows the power spectral density (PSD) of USV, %. Red curve — medians of frequencies, blue lines — 95% confidence interval (25th and 75th percentiles).

функции (обучение, память) крыс: на всех этапах эксперимента обнаруживается уменьшение времени реакции (более быстрый переход из одного отсека камеры в другой до включения электрокожного раздражения) по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. Наибольший суммарный результат отмечается в группе «АЦХ-липо» (208%) по сравнению с группой «Инсулин-липо» (102%).

Анализ психоэмоциональных параметров

Информативные параметры психоэмоционального состояния крыс, исследованные с помощью анализа их ультразвуковой вокализации (УЗВ), представлены на рис. 2–19.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается на частоте около 38 кГц, что свидетельствует о преимущественно позитивном, комфортном эмоциональном состоянии животных (рис. 2).

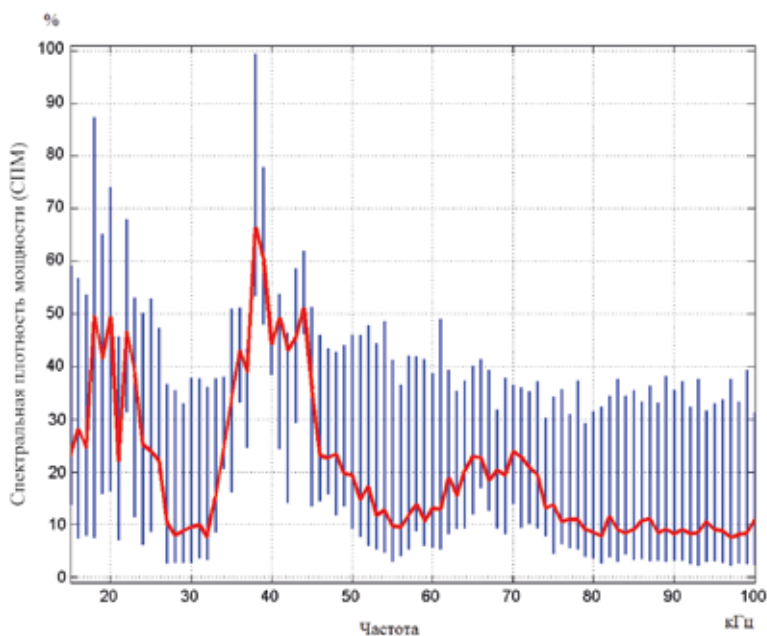


Рис. 3. УЗВ крыс группы «АЦХ-липо» в фоновых измерениях. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 3. USV of rats in the acetylcholine liposomal group in background measurements. All designations are similar to those in Fig. 2.

Пики УЗВ сходной мощности регистрируются в диапазонах 18–22 и 37–39 кГц, что свидетельствует о переходном, погра-

ничном эмоциональном состоянии животных (рис. 3).

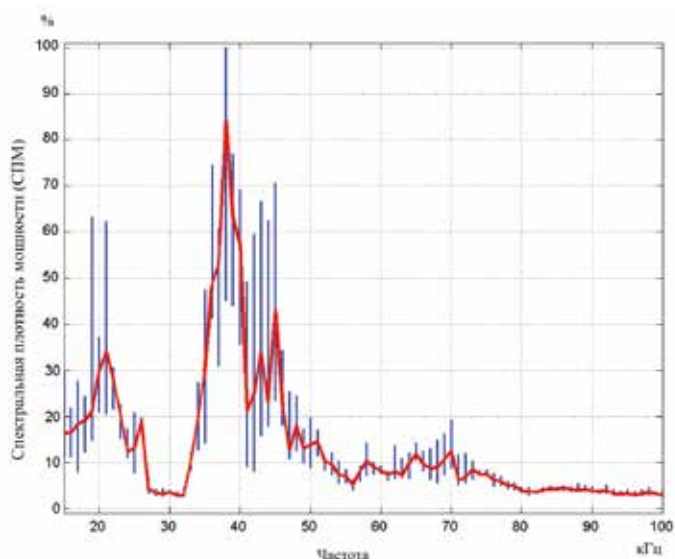


Рис. 4. УЗВ крыс группы «Инсулин-липо» в фоновых измерениях. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 4. USV of rats in the insulin liposomal group in background measurements. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается на частоте около 38 кГц, что свидетельствует о преимущественно позитивном, комфортном эмоциональном состоянии животных (рис. 4).

1-й день эксперимента

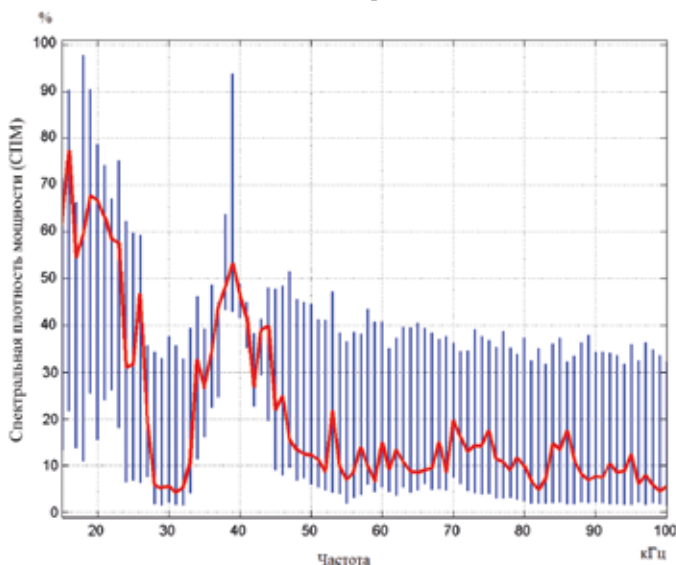


Рис. 5. УЗВ крыс группы «Контроль» в 1-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 5. USV of rats in the control group on the 1st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается в диапазоне 16–26 кГц. Дополнительные пики мощности регистрируются на частоте около 39 кГц, однако их

СПМ почти на 30% меньше доминирующей. На основании этого можно заключить о преимущественно тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 5).

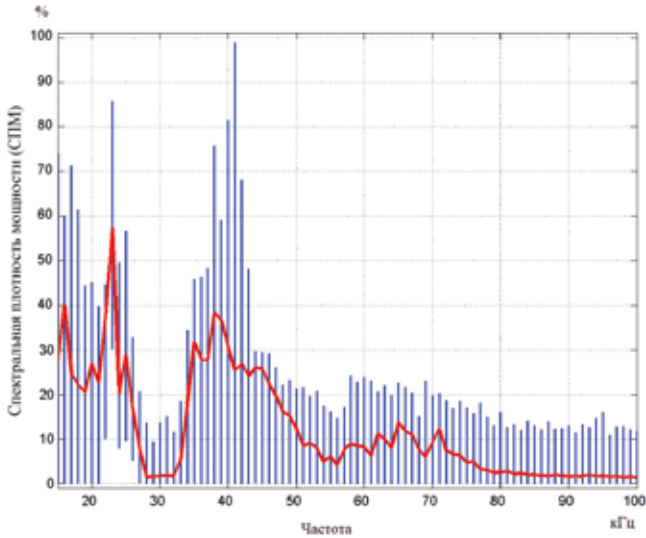


Рис. 6. УЗВ крыс группы «АЦХ-липо» в 1-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 6. USV of rats in the acetylcholine liposomal group on the 1st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Пики УЗВ сходной мощности регистрируются на частотах около 16, 23 и 38 кГц, что свидетельствует о переходном, погра-

дничном эмоциональном состоянии животных (рис. 6).

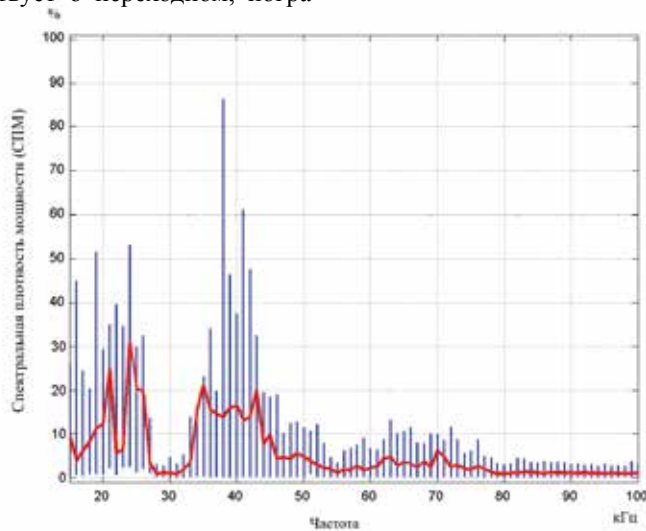


Рис. 7. УЗВ крыс группы «Инсулин-липо» в 1-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 7. USV of rats in the insulin liposomal group on the 1st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Пики УЗВ сходной мощности регистрируются на частотах около 21, 25 и 35–43 кГц, что свидетельствует о переходном, пограничном эмоциональном состоянии животных (рис. 7).

2-й день эксперимента

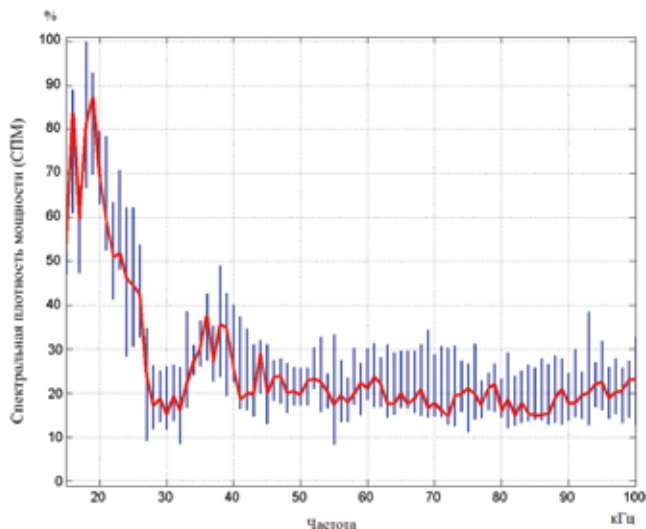


Рис. 8. УЗВ крыс группы «Контроль» во 2-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 8. USV of rats in the control group on the 2st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается в диапазоне 16–19 кГц, что свидетельствует о тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 8).

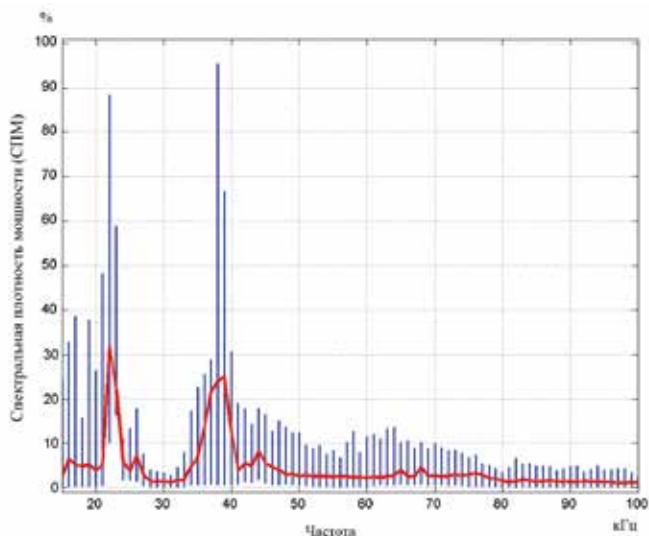


Рис. 9. УЗВ крыс группы «АЦХ-липо» во 2-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 9. USV of rats in the acetylcholine liposomal group on the 2st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Пики УЗВ сходной мощности регистрируются на частотах около 22 и 39 кГц, что свидетельствует о переходном, пограничном эмоциональном состоянии животных (рис. 9).

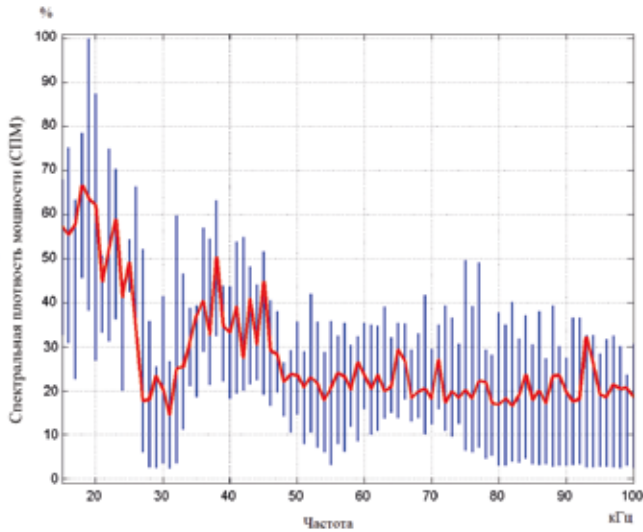


Рис. 10. УЗВ крыс группы «Инсулин-липо» во 2-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 10. USV of rats in the insulin liposomal group on the 2st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Пики УЗВ сходной мощности регистрируются в диапазонах 18–25 и 37–45 кГц, что свидетельствует о переходном, пограничном эмоциональном состоянии животных (рис. 10).

4-й день эксперимента

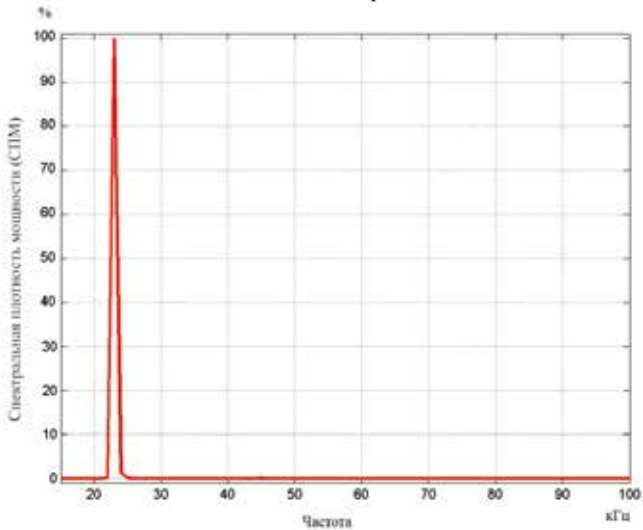


Рис. 11. УЗВ крыс группы «Контроль» в 4-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 11. USV of rats in the control group on the 4st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Вся СПМ УЗВ животных обнаруживается на частоте около 23 кГц, что свидетельствует о дискомфортном, дистрессовом эмоциональном состоянии животных (рис. 11).

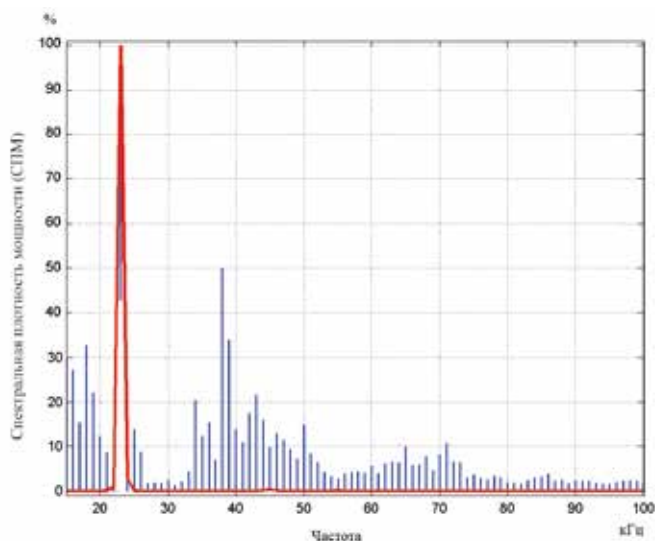


Рис. 12. УЗВ крыс группы «АЦХ-липо» в 4-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 12. USV of rats in the acetylcholine liposomal group on the 4th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается на частоте около 23 кГц, что свидетельствует о дискомфортном эмоциональном состоянии животных (рис. 12).

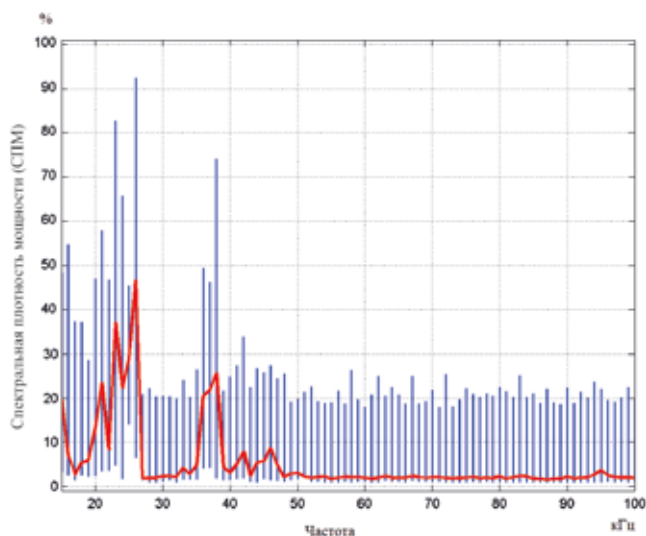


Рис. 13. УЗВ крыс группы «Инсулин-липо» в 4-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 13. USV of rats in the insulin liposomal group on the 4th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается на частоте около 27 кГц. Дополнительные пики мощности регистрируются на частоте около 38 кГц, однако их

СПМ на 20% меньше доминирующей. На основании этого можно заключить о преимущественно тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 13).

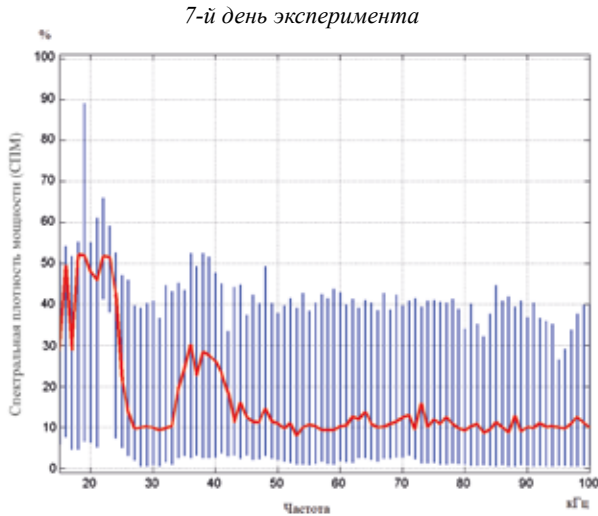


Рис. 14. УЗВ крыс группы «Контроль» в 7-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 14. USV of rats in the control group on the 7st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается в диапазоне 16–23 кГц. Дополнительные пики мощности регистрируются в диапазоне 36–38 кГц, однако их

СПМ на 20–25% меньше доминирующей. На основании этого можно заключить о преимущественно тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 14).

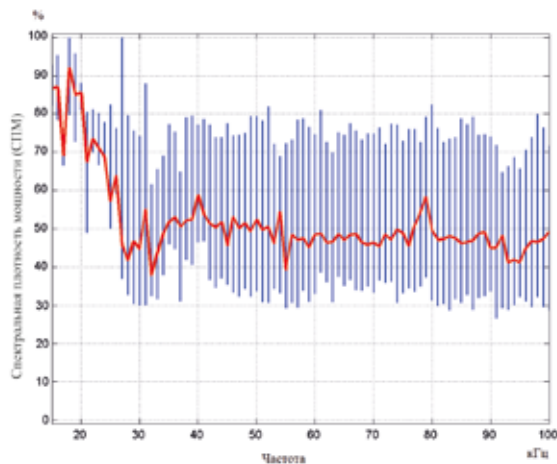


Рис. 15. УЗВ крыс группы «АЦХ-липо» в 7-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 15. USV of rats in the acetylcholine liposomal group on the 7st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается в диапазоне 16–19 кГц. Дополнительные пики мощности регистрируются на частоте около 40 кГц, однако их

СПМ на 20% меньше доминирующей. На основании этого можно заключить о преимущественно тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 15).

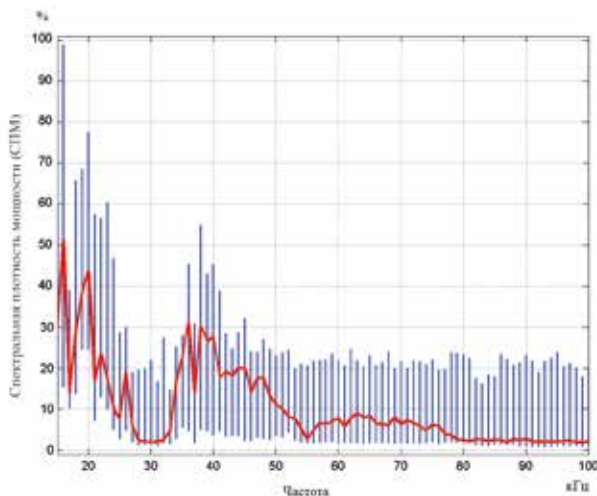


Рис. 16. УЗВ крыс группы «Инсулин-липо» в 7-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 16. USV of rats in the insulin liposomal group on the 7st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается в диапазоне 16–20 кГц. Дополнительные пики мощности регистрируются в диапазоне 36–40 кГц, однако их

СПМ на 20% меньше доминирующей. На основании этого можно заключить о преимущественно тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 16).

9-й день эксперимента

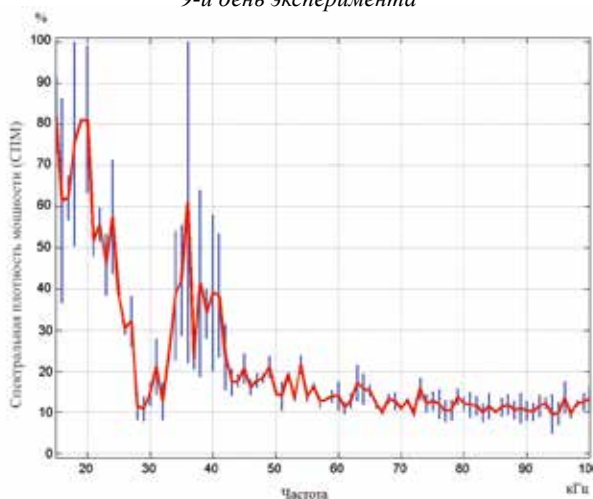


Рис. 17. УЗВ крыс группы «Контроль» в 9-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 17. USV of rats in the control group on the 9st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Максимум СПМ УЗВ животных обнаруживается в диапазоне 15–20 кГц и на частоте около 25 кГц. Дополнительные пики мощности регистрируются на частоте около 37 кГц, однако их СПМ на 20% меньше

доминирующей. На основании этого можно заключить о преимущественно тревожном, напряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 17).

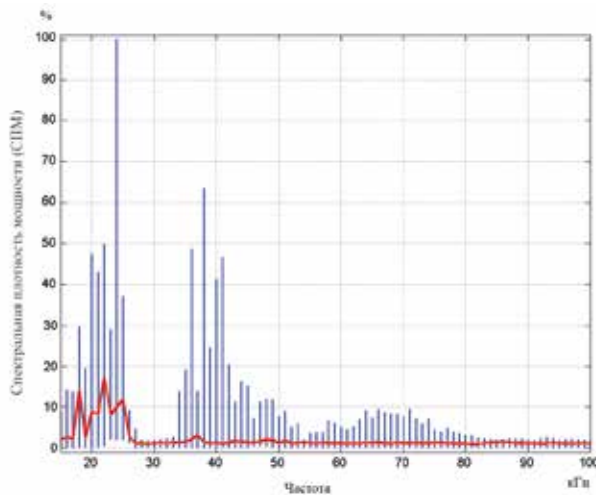


Рис. 18. УЗВ крыс группы «АЦХ-липо» в 9-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 18. USV of rats in the acetylcholine liposomal group on the 9th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Обнаруживается в диапазоне 17–25 кГц, что свидетельствует о тревожном, на-

пряжённом эмоциональном состоянии животных (рис. 18).

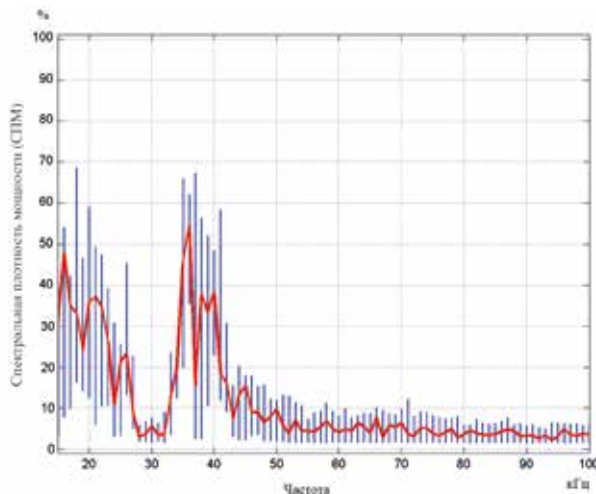


Рис. 19. УЗВ крыс группы «Инсулин-липо» в 9-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 2.

Fig. 19. USV of rats in the insulin liposomal group on the 9th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 2.

Пики УЗВ сходной мощности регистрируются на частотах около 16, 22, 36 и 38–40 кГц, что свидетельствует о переходном, пограничном эмоциональном состоянии животных (рис. 19).

Установлено, что до начала введения тестируемых веществ психоэмоциональное состояние животных оценивалось как близкое к комфортному. В 1-й день введения во всех группах обнаруживается переходное (пограничное) состояние, что связано с проводимыми манипуляциями. Однако во 2-й день эксперимента в опытных группах СПМ УЗВ существенно выше в диапазоне «комфорта» по сравнению с результатом в контрольной группе. В 4-й день курсового введения данный эффект прослеживается в группе вещества «Инсулин-липо». На 7-й день эксперимента убедительных отличий

в УЗВ животных контрольной и опытных групп не обнаруживается, а спустя 2 дня после окончания курса введения (9-й день) животные группы «Инсулин-липо» снова характеризуются более благоприятным психоэмоциональным состоянием по сравнению с контролем.

В целом следует заключить, что тестируемые вещества обладают признаками анксиолитических средств с седативным компонентом, наиболее выраженный эффект обнаруживается для вещества «Инсулин-липо».

Анализ поведенческих параметров

Тест «Открытое поле»

Результаты исследования свободного поведения крыс представлены в табл. 2. В контрольной группе животных на протяжении всего эксперимента наблюдались

Таблица 2. Средняя длительность поведенческих форм крыс в тесте «Открытое поле» (Laboras), сек
Table 2. Mean duration of behavioral forms in rats in the Open Field test (Laboras), sec

| Период исследования | Длительность формы поведения (сек) | | | | |
|---------------------------|------------------------------------|-------|-----|-------|-----|
| | ЭСП | Г. а. | Им. | В. а. | Гр. |
| Контрольная группа | | | | | |
| Фон | 197 | 44 | 116 | 371 | 172 |
| 1-й день | 234 | 36 | 163 | 248 | 219 |
| 2-й день | 235 | 58 | 186 | 200 | 221 |
| 4-й день | 285 | 43 | 144 | 206 | 222 |
| 7-й день | 225 | 38 | 180 | 219 | 238 |
| 9-й день | 238 | 56 | 95 | 297 | 214 |
| Инсулин-липо | | | | | |
| Фон | 289 | 52 | 110 | 329 | 120 |
| 1-й день | 323 | 33 | 161 | 184 | 199 |
| 2-й день | 345 | 25 | 280 | 143 | 107 |
| 4-й день | 336 | 35 | 182 | 210 | 137 |
| 7-й день | 317 | 44 | 143 | 281 | 115 |
| 9-й день | 298 | 47 | 84 | 272 | 199 |
| АЦХ-липо | | | | | |
| Фон | 181 | 68 | 150 | 261 | 240 |
| 1-й день | 222 | 40 | 165 | 224 | 249 |
| 2-й день | 295 | 47 | 176 | 203 | 179 |
| 4-й день | 200 | 43 | 225 | 188 | 244 |
| 7-й день | 220 | 55 | 161 | 245 | 219 |
| 9-й день | 278 | 36 | 124 | 202 | 260 |

Примечание: ЭСП — элементы системного поведения; Г. а. — горизонтальная активность (локомоции); Им. — иммобилизация (неподвижность); В. а. — вертикальная активность (стойки); Гр. — груминг (умывание).
Note: ЭСП — elements of systemic behavior; Г. а. — horizontal activity (locomotion); Им. — immobilization (immobility); В. а. — vertical activity (ascents); Гр. — grooming (washing).

повышение длительности умывания и ЭСП, преимущественное повышение неподвижности, снижение вертикальной активности и полифазные изменения в горизонтальной активности.

В обеих опытных группах также наблюдались повышение длительности ЭСП, преимущественное повышение неподвижности, снижение вертикальной активности, полифазные изменения в горизонтальной активности и длительности умывания.

Можно отметить, что отличия эффектов опытных групп от сопоставимых эффектов контрольной группы заключаются в снижении горизонтальной активности во 2-й и 9-й

дни эксперимента, а также длительности умывания во 2-й и 7-й дни эксперимента.

Таким образом, исследуемые препараты, по всей видимости, обладают седативными признаками.

Приподнятый крестообразный лабиринт

Результаты исследования информативных этологических параметров крыс представлены в табл. 3.

В контрольной группе животных на протяжении всего эксперимента наблюдались преимущественное снижение длительности пребывания животных в центральной зоне и закрытых «рукавах» лабиринта, преимущественное повышение количества

Таблица 3. Информативные этологические параметры (средние по группе) крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Table 3. Informative ethological parameters (group averages) of rats in the Elevated Plus Maze test

| Период исследования | Этологические параметры | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------|--------------|---------|
| | Т з. р., сек | Т о. р., сек | Т ц. з., сек | Н в. а. |
| <i>Контрольная группа</i> | | | | |
| Фон | 10,98 | 10,00 | 3,51 | 0,13 |
| 1-й день | 11,04 | 8,51 | 2,70 | 0,39 |
| 2-й день | 8,41 | 11,56 | 2,95 | 0,76 |
| 4-й день | 12,30 | 7,50 | 2,88 | 0,89 |
| 7-й день | 6,23 | 9,68 | 1,01 | 0,39 |
| 9-й день | 10,89 | 6,94 | 2,19 | 0,25 |
| <i>Инсулин-липо</i> | | | | |
| Фон | 15,76 | 7,09 | 3,68 | 0,26 |
| 1-й день | 8,65 | 8,11 | 3,49 | 0,00 |
| 2-й день | 11,24 | 7,12 | 2,52 | 0,50 |
| 4-й день | 5,87 | 12,10 | 1,59 | 0,75 |
| 7-й день | 8,49 | 7,93 | 4,50 | 0,38 |
| 9-й день | 7,25 | 11,99 | 3,61 | 0,00 |
| <i>АЦХ-липо</i> | | | | |
| Фон | 15,53 | 7,94 | 2,95 | 1,64 |
| 1-й день | 11,25 | 9,03 | 2,83 | 0,76 |
| 2-й день | 6,11 | 12,04 | 2,30 | 0,13 |
| 4-й день | 4,30 | 10,43 | 2,71 | 0,26 |
| 7-й день | 4,66 | 10,83 | 2,83 | 0,51 |
| 9-й день | 7,58 | 7,76 | 2,59 | 0,00 |

Примечание: Т з. р. — время нахождения в закрытых «рукавах» лабиринта; Т о. р. — время нахождения в открытых «рукавах» лабиринта; Т ц. з. — время нахождения в центральной зоне лабиринта; Н в. а. — количество эпизодов вертикальной активности (стоек).

Note: Т з. р. — the time spent in the closed spaces of the labyrinth; Т о. р. — the time spent in the open spaces of the labyrinth; Т ц. з. — the time spent in the central zone of the labyrinth; Н в. а. — the number of vertical activity episodes (ascents).

стоек и полифазные изменения длительности пребывания в открытых «рукавах» лабиринта. Такая этологическая картина в целом типична для данного исследования и отражает привыкание животных к новым условиям среды.

В обеих опытных группах наблюдалось: тотальное снижение длительности пребывания животных в закрытых «рукавах» лабиринта; преимущественное (для препарата «Инсулин-липо») и тотальное (для препарата «АЦХ-липо») снижение длительности пребывания животных в центральной зоне; преимущественное (для препарата «АЦХ-липо») и тотальное (для препарата «Инсулин-липо») повышение длительности пребывания в открытых «рукавах» лабиринта; тотальное снижение количества стоек (для препарата «АЦХ-липо») и полифазные изменения этого показателя для препарата «Инсулин-липо».

Таким образом, наблюдаемая этологическая картина, характеризующаяся повышением времени пребывания в открытых «рукавах» лабиринта и снижением – в закрытых «рукавах», центральной зоне и вертикальной активности, свидетельствует об улучшении психоэмоционального состояния животных (снижении тревожности, повышении ориентировочно-исследовательской активности) на фоне применения исследуемых препаратов. По сумме эпизодов, когда были зафиксированы отличия от контрольной группы, наиболее предпочтительным следует считать препарат «АЦХ-липо».

Ацетилхолин – распространённый медиатор нервной системы, контролирующий процесс возбуждения в коре головного мозга, нейронах спинного мозга (клетках Реншоу), парасимпатическом отделе вегетативной нервной системы, в результате чего обеспечиваются линейные изменения в поведении и психоэмоциональном состоянии животных, а также улучшение их когнитивных способностей.

Сопоставляя описанные результаты с полученными нами ранее при изучении основных нейромедиаторов, включая АЦХ, можно проследить общность в установленных седативных эффектах и информативных параметрах УЗВ [5]. Схожие эффекты наблюдаются при использовании липосомированных форм гормона инсулина, контролирующего опосредованное влияние ГАМК на интрацентральные отношения головного мозга и высшую нервную деятельность животных. Это даёт основания предполагать, что действие АЦХ и инсулина отражает центральные механизмы холинергической и ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса, а также оказывает позитивное влияние на умственную работоспособность и когнитивные процессы.

Выводы

Установлено, что нейромедиатор ацетилхолин и гормон инсулин, применяемые в липосомированных формах, оказывают влияние на центральные механизмы высшей нервной деятельности и коррелируют посредством преобразования частотно-спектральных характеристик ультразвуковой вокализации, параметров свободного поведения и когнитивных способностей лабораторных крыс.

Основной результат исследования состоит в том, что липосомированные инсулин и ацетилхолин обладают односторонним действием. Тестируемые вещества обладают признаками анксиолитических средств с седативным компонентом. Наиболее выраженный эффект по анализу ультразвуковой вокализации обнаруживается для инсулина, а наиболее информативные этологические параметры крыс по анализу антидепрессивных свойств в лабиринте установлены на фоне применения ацетилхолина. Курсовое недельное применение липосомированного инсулина повышает когнитивные способности жи-

вотных более чем в два раза, ацетилхолина – более чем в четыре раза, что отражает высокочастотные β - и γ -ритмы (выше 20 Гц) гиппокампального отдела головного мозга, связанные с активностью вставочных нейронов и пирамидных клеток, модулирующих противотревожное, антидепрессивное, обезболивающее и прочие сходные действия исследуемых веществ, а также улучшение консолидации памяти и когнитивных функций.

Полученные результаты указывают на перспективность применения липосомированных форм ацетилхолина и инсулина

в качестве инновационных средств лечения заболеваний центральной нервной системы, вызванных дисфункцией холинэргической системы, в т. ч. гериатрических нарушений памяти и деменции. Найденное нами однонаправленное действие липосомированных форм инсулина и ацетилхолина является основанием для экспериментальной проверки гипотезы о том, что совместное применение инсулина и ацетилхолина может обладать синергическим эффектом на холинэргическую систему, что является предметом дальнейших исследований и публикаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.: Высшая школа, 1991. 399 с. [Buresh Ya., Bureshova O., Houston J.P. *Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya* [Methods and basic experiments in the study of the brain and behavior]. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1991. 399 p. (In Russian)].
2. Канаян А.С., Пермаков Н.К., Титова Г.П. и др. Влияние синтетических аналогов лей-энкефалина на жизнеспособные отделы поджелудочной железы при экспериментальном панкреатите. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1988;4:447–450. [Kanayan A.S., Permakov N.K., Titova G.P., et al. Vliyaniye sinteticheskikh analogov lej-enkefalina na zhiznesposobnyye otdely podzheludochnoy zhelezy pri eksperimenatal'nom pankreatite [Effect of synthetic analogs of leuencephalin on viable pancreas in experimental pancreatitis]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1988;4:447–450. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н. *Психонитропизм лекарственных средств*. М.: Медицина, 1993:208. [Karkischenko N.N. *Psihounitropizm lekarstvennykh sredstv* [Psychunitropism of medicines]. Moscow: Medicina Publ., 1993:208. (In Russian)].
4. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Табокова Л.А., Алимкина О.В., Борисова М.М. Между когнитивностью и нейропатиями: нейровизуализация эффектов ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса по нормированным электрограммам мозга. *Биомедицина*. 2020;16(2):12–38. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Borisova M.M. Mezhdru kognitivnost'yu i nejropatiyami: nejrovizualizaciya effektivov GAMK-ergicheskoy modulyacii gippokampa i prefrontal'nogo neokorteksa po normirovannym elektrogrammam mozga [Between cognitvity and neuropathies: neuroisualization of effects of GABA-ergic modulation of the hippocampus and prefrontal neocortex on normed brain electrograms]. *Biomedicine*. 2020;16(2):12–38. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-2-12-38.
5. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Сахаров Д.С., Алимкина О.В. Роль нейромедиаторных систем мозга в генерации ультразвуковой вокализации и её корреляции с поведением животных. *Биомедицина*. 2011;4:8–18. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Sakharov D.S., Alimkina O.V. Rol' nejromediatornykh sistem mozga v generacii ul'trazvukovoy vokalizacii i eyo korrelyacii s povedeniem zhivotnykh [The role of brain neurotransmitter systems in the generation of ultrasonic vocalization and its correlation with animal behavior]. *Biomedicine*. 2011;4:8–18. (In Russian)].
6. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
7. Узбеков М.Г. Активность триптофан-5-гидролазы в синапсоммах мозга кролика после однократного введения опиоидного пептида Tur D – Ala – Gly – Phe – NH₂. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1986;2:159–160. [Uzbekov M.G. Aktivnost' triptofan-5-gidrolazy v sinaptosomah mozga krolika posle odnokratnogo vvedeniya opioidnogo peptida Tur D – Ala – Gly – Phe – NH₂ [Tryptophan-5-hydrolase activity in rabbit brain synaptosomes af-

- ter a single administration of the Tur D – Ala – Gly – Phe – NH₂ opioid peptide]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1986;2:159–160. (In Russian)].
8. Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J. Neurosci.* 1999;19:7300–7308.
9. Apelt J., Mehlhorn G., Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 1999;57(5):693–705.
10. Brass B.J., Nonner D., Barrett J.N. Differential effects of insulin on choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in neuron-rich striatal cultures. *J. Neurochem.* 1992;59(2):415–424.
11. Catalan R., Martinez A., Mata F., Aragones M. Effect of insulin on acetylcholinesterase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981;101:1216–1220.
12. Chiu S.L., Cline H.T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural. Dev.* 2010;5:7.
13. Costa L.E. Hepatic cytochrom p-450 in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am. J. Physiol.* 1987;259(4):654–659.
14. Craft S., Baker L.D., Montine T.J., Minoshima S., Watson G.S., Claxton A., Arbuckle M., Callaghan M., Tsai E., Plymate S.R., Green P.S., Leverenz J., Cross D., Gerton B. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* 2012;69:29–38.
15. Ferrario C.R., Reagan L.P. Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. *Neuropharmacology*. 2018;136(Pt B):182–191. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.001.
16. Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Morgan S.V., et al. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes *in vitro* and *in vivo*; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol. Brain.* 2015;8:51.
17. Grillo C.A., Piroli G.G., Hendry R.M., Reagan L.P. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 2009;1296:35–45.
18. Jin Z., Jin Y., Kumar-Mendu S., Degerman E., Groop L., Birnir B. Insulin reduces neuronal excitability by turning on GABA(A) channels that generate tonic current. *PLoS One*. 2011;6(1):e16188.
19. Jones M.L., Leonard J.P. PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. *J. Neurochem.* 2005; 92(6):1431–1438.
20. Kann O. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. *Neurobiol. Dis.* 2016;90:75–85. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.08.005.
21. Knusel B., Michel P.P., Schwaber J.S., Hefti F. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.* 1990;10(2):558–570.
22. Komori T., Morikawa Y., Tamura S., Doi A., Nanjo K., Senba E. Subcellular localization of glucose transporter4 in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob mice under basal conditions. *Brain Res.* 2005;1049(1):34–42.
23. Kullmann S., Heni M., Hallschmid M., Fritsche A., Preissl H., Häring H.U. Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans. *Physiol. Rev.* 2016;96(4):1169–1209.
24. Liao G.Y., Leonard J.P. Insulin modulation of cloned mouse NMDA receptor currents in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.* 1999;73(4):1510–1519.
25. Liu L., Brown J.C. 3rd, Webster W.W., Morrisett R.A., Monaghan D.T. Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 1995;192(1):5–8.
26. McNay E.C., Ong C.T., McCrimmon R.J., Cresswell J., Bogan J.S., Sherwin R.S. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2010;93(4):546–553.
27. McNay E.C., Recknagel A.K. Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011;96(3):432–442.
28. Moreta M.P., Burgos-Alonso N., Torrecilla M., Marco-Contelles J., Bruzos-Cidón C. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors on cognitive function in Alzheimer's disease. Review of reviews. *Biomedicines*. 2021;9(11):1689.
29. Mueller E., Cenazzani A. *Central and peripheral endorphins. Basic and clinical aspects*. Raven New York Press, 1984:178.
30. Patel A. Inhibitors of enkephalin-degrading enzymes as potential therapeutic agents. *Prag. Med. Chem.* 1993;30:327.
31. Pearson-Leary J., Jahagirdar V., Sage J., McNay E.C. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav. Brain Res.* 2018;338:32–39.
32. Pearson-Leary J., McNay E.C. Novel roles for the insulin-regulated glucose transporter-4 in hippocampally dependent memory. *J. Neurosci.* 2016;36(47):11851–11864.
33. Pomytkin I., Costa-Nunes J.P., Kasatkin V., Veniaminova E., Demchenko A., Lyundup A., Lesch K.P., Ponomarev E.D., Strekalova T. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci. Ther.* 2018;24(9):763–774.
34. Ren Y., Holdengreber V., Ben-Shaul Y., Shah B.H., Varanasi J., Hausman R.E. Causal role for Jun protein in the stimulation of choline acetyltransferase by insulin in embryonic chick retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;232(3):788–793.

35. Rivera E.J., Goldin A., Fulmer N., Tavares R., Wands J.R., de la Monte S.M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers Dis.* 2005;8(3):247–268. DOI: 10.3233/jad-2005-8304.
36. Sawynok J., Pinsky C., Labella F. Minireview of the specificity of naloxone as the opiate antagonist. *Life Sci.* 1979;25:1621–1632.
37. Schliebs R., Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 2006;113:1625–1644.
38. Selkoe D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002;298(5594):789–791.
39. Skeberdis V.A., Lan J., Zheng X., Zukin R.S., Bennett M.V. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001;98(6):3561–3566. DOI: 10.1073/pnas.051634698.
40. Stanley M., Macauley S.L., Holtzman D.M. Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer's disease: cause or consequence? *J. Exp. Med.* 2016;213(8):1375–1385.
41. Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R.S., Arvanitakis Z., Schneider J.A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. Demon-strated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 2012;122(4):1316–1338.
42. Wang H., Wang R., Zhao Z., Ji Z., Xu S., Holscher C., Sheng S. Coexistences of insulin signaling-related proteins and choline acetyltransferase in neurons. *Brain Res.* 2009;1249:237–243.
43. Wan Q., Xiong Z.G., Man H.Y., Ackerley C.A., Brauntun J., Lu W.Y., Becker L.E., MacDonald J.F., Wang Y.T. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature.* 1997;388(6643):686–690.
44. Wöhr M., Borta A., Schwarting R.K.W. Overt behavior and ultrasonic vocalization in fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat. *Neurobio. Learn. Mem.* 2005;84:228–240.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Фокин Юрий Владимирович*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Yuriy V. Fokin*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Капцов Александр Владимирович, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru

Борисова Мария Михайловна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н.,
проф., акад. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Biome-
dical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Alexander V. Kaptsov, Scientific Center of Biome-
dical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;
e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru

Mariya M. Borisova, Scientific Center of Biome-
dical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Academician of the Russian Academy of Rocket
and Artillery Sciences, Corresponding Member
of the Russian Academy of Sciences, Scientific
Center of Biomedical Technologies of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author