

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНСУЛИНА КРЫСАМ С ИШЕМИЕЙ И РЕПЕРФУЗИЕЙ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА УМЕНЬШАЕТ ИНТЕНСИВНОСТЬ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В ГИППОКАМПЕ И ЛОБНОЙ КОРЕ МОЗГА, ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. И. О. Захарова¹, Л. В. Баюнова¹, Д. К. Аврова¹, Н. Ф. Аврова^{1,*}

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

*E-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Найдено, что ишемия и последующая трехдневная реперфузия переднего мозга приводят к увеличению уровня маркера аутофагии LC3B-II, уровня глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и активации каспазы-3 в гиппокампе и лобной коре мозга крыс. При этом интраназальное введение крысам с ишемией и реперфузией мозга 0.5 МЕ инсулина (до ишемии и ежедневно при реперфузии) достоверно и значительно снижает уровень LC3B-II и активность каспазы-3 в изучаемых структурах. Это показывает способность инсулина ингибировать активацию аутофагии и апоптоза в переднем мозге при его ишемии и реперфузии. Не удалось выявить достоверного снижения уровня GFAP в этих районах мозга под влиянием введения животным инсулина. Показано, что интраназальное введение инсулина активирует протеинкиназу Akt (активирующую комплекс mTORC1, ингибирующий процессы аутофагии) и ингибирует протеинкиназу AMPK (инициирующую процессы аутофагии) в гиппокампе и коре мозга крыс, что, очевидно, лежит в основе его способности снижать аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов. Данные о модуляции инсулином активности протеинкиназ Akt и AMPK в опытах *in vivo* согласуются с результатами исследования возможного механизма нейропротекторного действия инсулина, проведенными нами ранее *in vitro* на нейронах коры мозга в состоянии окислительного стресса.

Ключевые слова: ишемия и реперфузия переднего мозга, аутофагия, апоптоз, интраназальное введение инсулина, протеинкиназы

DOI: 10.31857/S0044452924010053, EDN: ZFNXTY

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения от цереброваскулярных заболеваний в мире ежегодно умирают миллионы людей [1]. Как показал анализ систематических исследований, проведенных в 1990–2019 гг. в 204 странах, выполненный в рамках “The Global Burden of Diseases Study”, инсульт мозга является одной из основных причин смерти людей в мире, по суммарному показателю как причина смерти и инвалидности он занимает в мире третье место. За период с 1990 по 2019 г. число инсультов в мире значительно увеличилось, причем он уносит больше жизней в развивающихся странах, чем в развитых государствах [2]. При этом в развитых странах ишемические поражения мозга чаще приводят к длительной и тяжелой инвалидности людей [3]. Одним из патологических состояний, значительно повышающих риск возникновения инсультов мозга, является болезнь

малых сосудов мозга (cerebral small vessel disease), вызывающая поражение ткани мозга и нарушение когнитивных функций [4–5]. Изучению ее проявлений и патогенеза, возможных подходов к лечению и профилактике этой болезни в настоящее время уделяется большое внимание [4–6].

Инсулин представляет собой не только гормон, но и один из наиболее важных нейротрофических факторов и перспективных для клинического применения нейропротекторов. Наиболее эффективными способами доставки инсулина при исследовании его влияния на процессы, протекающие в мозге, является интраназальное и интрацеребровентрикулярное (ICV) введение. При этих способах введения инсулин доставляется в мозг, не проходя через гематоэнцефалический барьер [7–8]. При этом интраназальное введение инсулина не является травматичным. Оно может быть применено для лечения больных. Клинические испытания интраназального введения инсулина при болезни

Альцгеймера были достаточно успешными (см., например, [9–10]), начаты его испытания при болезни Паркинсона [11] и других нейродегенеративных патологиях. Защитный эффект инсулина был также показан на животных с моделями нейродегенеративных заболеваний [12–13].

Но работ по изучению нейропротекторного эффекта интраназального введения инсулина при ишемических поражениях мозга пока крайне мало [14–15]. Существенным пробелом в понимании механизма нейропротекторного действия инсулина являлось до недавнего времени полное отсутствие данных о способности инсулина при каких бы то ни было способах его введения предотвращать аутофагическую гибель нейронов мозга при ишемических воздействиях и последующей реперфузии. При этом по современным представлениям гибель нейронов от чрезмерной активации аутофагии играет важнейшую роль в поражении мозга от ишемических воздействий и последующей реперфузии. От наших знаний о способах предотвращения гибели нервных клеток мозга при активации аутофагии в большой мере зависит успешность разработки подходов к лечению разных форм ишемического поражения мозга, прежде всего инсульта головного мозга [16–18].

Неоспоримо, что аутофагии принадлежит важнейшая роль в поддержании клеточного гомеостаза и, следовательно, она выполняет защитные функции. Но, как оказалось, активация аутофагии может не только способствовать повышению жизнеспособности клеток при патологических воздействиях на мозг, но и часто приводит к их гибели. Так, во многих работах показано, что при ишемии и реперфузии мозга, которая сопровождается активацией аутофагических и апоптотических процессов, происходит гибель нейронов как от активации аутофагии, так и от активации апоптоза [16, 19–24]. Объективности ради, следует отметить, что в ряде современных публикаций можно найти и примеры того, что увеличение интенсивности аутофагии в мозге при ишемических воздействиях может приводить к повышению жизнеспособности нейронов и улучшению функций мозга [25–27]. Но, по-видимому, при достаточной силе ишемического воздействия на мозг активация аутофагии, как правило, приводит к гибели нейронов. В этой связи актуальным является выявление соединений, обладающих нейропротекторными свойствами, способных снижать или предотвращать аутофагическую гибель нейронов и других клеток мозга при ишемических и других патологических воздействиях на мозг. Особый интерес, очевидно, представляют те из них, которые могут найти применение в клинической практике. К таким нейропротекторам, несомненно, относится инсулин.

Нами недавно было впервые показано, что интраназальное введение инсулина практически полностью предотвращает гибель нейронов в СА1 районе гиппокампа при двухсосудистой ишемии и последующей реперфузии мозга. При этом в проведенном исследовании получены свидетельства того, что основными причинами смерти нейронов являлась их аутофагическая и апоптотическая гибель, что позволило нам прийти к выводу о способности инсулина при его интраназальном введении предотвращать и аутофагическую, и апоптотическую гибель нейронов [28]. В опытах *in vitro* на изолированных нейронах коры мозга нами было показано, что инсулин способен достоверно и значительно снижать активацию процессов аутофагии и апоптоза, происходящую под влиянием окислительного стресса [29]. Выявлены те сигнальные пути, модуляция которых инсулином может лежать в основе его антиаутофагического и антиапоптотического воздействия [29]. Но необходимо было также показать способность инсулина не только *in vitro*, но и *in vivo* снижать уровень маркеров аутофагии и апоптоза и, соответственно, интенсивность этих процессов в гиппокампе и других структурах переднего мозга, а также способность этого нейропротектора модулировать активность протеинкиназ, которые оказывают влияние на степень аутофагической и апоптотической гибели нейронов мозга. Именно этим вопросам посвящена настоящая статья.

Целью проведенной работы является изучение способности инсулина, ингибиторов аутофагии (3-метиладенина) и апоптоза (Ac-DEVD-CHO) уменьшать уровень одного из основных маркеров аутофагии LC3B-II и астроглиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в гиппокампе и коре мозга крыс, увеличенных при ишемии и реперфузии переднего мозга; в цели работы входит также изучение способности инсулина снижать активность каспазы-3 и модулировать в этих структурах активность протеинкиназ, от которых в наибольшей мере может зависеть предотвращение им аутофагической и апоптотической гибели нейронов мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и материалы. Для интраназальных введений использовался бычий инсулин (I5500, Sigma, США), для интрацеребровентрикулярных введений — ингибитор аутофагии 3-метиладенин (M9281, “Sigma”, США), ингибитор каспаз Ac-DEVD-CHO (BD Pharmigen, “BD Biosciences”, США). Животных наркотизировали хлоралгидратом (#15307, “Sigma-Aldrich”, США). Для катетеризации бедренной артерии применялся катетер (1.0×0.6×210 мм, 23G) от компании “SciCat”

(Россия). Материал шовный хирургический стерильный (нерассасывающиеся лавсановые нити MP1,5 USP4–0, ООО “Линтекс”, Россия) накладывался для скрепления мягких тканей в области бедра и шеи. Антитела и другие реактивы, использовавшиеся для иммуноблоттинга, приведены в соответствующем разделе.

Интраназальное введение инсулина. Опыты проводили на самцах крыс линии Вистар массой тела 270–330 г. Инсулин (“Sigma”, США) в дозе 0.5 МЕ на крысу вводили интраназально за 1 ч до окклюзии каротидных артерий и гипотензии, а затем ежедневно в течение 3 дней на стадии реперфузии. Для этого в каждую ноздрю животного вводили по 10 мкл раствора, содержащего 1 мг инсулина в 1 мл цитратного буфера, что соответствует 0.5 МЕ инсулина. Цитратный буфер готовили как смесь равных объемов растворов 100 мМ лимонной кислоты и 100 мМ цитрата натрия, pH 4.4.

Операция по введению ингибиторов апоптоза и аутофагии в боковой (I) желудочек мозга крыс. Для того, чтобы определить, как влияет активация процессов аутофагии и апоптоза на жизнеспособность нейронов при двухсосудистой ишемии переднего мозга с гипотензией и последующей реперфузией, крысам интрацеребровентрикулярно вводили ингибиторы аутофагии и апоптоза. Для того, чтобы уравнивать возможные последствия такого введения всем остальным группам животных вводили интрацеребровентрикулярно стерильный фосфатный буфер, использовавшийся для растворения ингибиторов.

После наркотизации крыс хлоралгидратом, видимым внутримышечно в дозе 400 мг/кг веса крыс, животных помещали в стереотаксис. Для трепанации черепа использовался стоматологический бор в области, расположенной над I желудочком мозга (координаты: AP = –0.92 мм, L = 1.5 мм, V = 3.5 мм относительно брегмы) в соответствии со стереотаксическим атласом [30]. Крысам вводили интрацеребровентрикулярно 20 мкг 3-метиладенина (3-MA) или 10 мкг Ac-DEVD-CHO, в виде растворов в фосфатном буфере объемом 4.5 мкл или аналогичный объем фосфатного буфера за 30 минут до ишемического воздействия с помощью шприца (“Hamilton”, США).

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией. Двухсосудистую ишемию переднего мозга вызывали у наркотизированных хлоралгидратом крыс путем пережатия на 10 мин каротидных артерий в сочетании с гипотензией — снижением артериального давления до 50 мм ртутного столба путем отбора крови в шприц с гепарином, как это описано ранее [31]. Реперфузию переднего мозга проводили, разжимая каротидные артерии и возвращая в кровяное русло кровь с гепарином, отобранную шприцом

на стадии ишемии [32]. В качестве контрольных животных использовали ложно-оперированных крыс. Животным после завершения ишемии обрабатывали раны стрептоцидом и накладывали швы. Послеоперационный уход за животными осуществлялся в течение 3 дней при содержании на стандартном рационе.

Определение активности каспазы-3. Измерение активности проводили с помощью набора от компании “Abcam” (#ab39401, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение методом иммуноблоттинга уровня маркера аутофагии LC3B-II, GFAP и уровень ингибирующего фосфорилирования IRS-2 по Ser⁷³¹, на активность Akt и AMPK-альфа, а также общего уровня этих протеинкиназ в гиппокампе и лобной коре. Образцы гиппокампа и лобной коры гомогенизировали в соотношении 1:20 в лизисном буфере следующего состава: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25% дезоксихолата натрия, 0.5% Triton X-100, 15 mM NaF, 10 mM глицерофосфата натрия, 10 mM пироглицилат натрия, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM фенилметилсульфонил фторид (PMSF), 0.02% NaN₃, протеазный ингибиторный коктейль (“Roche”, Швейцария). Крупные клеточные фрагменты и неразрушенные клетки осаждали центрифугированием при 500g в течение 10 мин (4°C). Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта [33]. Для разделения белков использовали гели, содержащие 9% или 13% акриламида в зависимости от молекулярной массы анализируемого белка. Пробы загружали в количестве 30 мкг белка на лунку. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 80 V, по окончании которого белки переносили на PVDF мембрану (0.22 мкм, “Bio-Rad”, США). Неспецифическое связывание блокировали, как было описано ранее [33]. Уровень маркера аутофагии определяли с помощью специфического антитела к LC3B-II (1:1000, #2775, “Cell Signaling Technology”, США). Уровень маркерного белка астроцитов GFAP оценивалась с помощью моноклонального мышиного IgG2a к KTVEMRDGEVIK участку белка. Антитело к GFAP получено в дар от федерального центра Мозга и Нейротехнологий (Москва, Россия). Антитела для определения уровней фосфорилирования pAkt (Ser⁴⁷³) (1:1000, #4058), pAMPK-alpha (Thr¹⁷²) (1:1000, #2535) были приобретены у компании “Cell Signaling Technology” (США), для pIRS-2 (Ser⁷³¹) (1 мкг/мл, #ab3690) — от “Abcam” (Великобритания). Специфические антитела к общей Akt (1:1000, #4691), AMPK-alpha (1:1000, #2793), IRS-2 (1:1000, #3089) от “Cell Signaling Technology” (США) использовались для оценки содержания данных белков и выявления изменений в уровне их экспрессии. Мембраны инкубировались с первич-

ными антителами в течение ночи при +4°C. После 3-х кратной промывки в 0.1% Tween 20, приготовленном на TBST (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl), мембраны обрабатывались в течение 1 ч при комнатной температуре анти-мышинными (#7076) или анти-кроличьими (#7074) вторичными антителами IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) ("Cell Signaling Technology", США) в 5% обезжиренном молоке на TBST. Для нормализации данных после стриппинга на мембранах выявлялся GAPDH с помощью антитела (1:3000, #T0004) от компании «Affinity Biosciences» (Китай). Для визуализации белков сигнал HRP усиливали с помощью Novex ECL ("Invitrogen", США). Сигнал хемилюминесценции фиксировали на фотопленку. Изображения сканировали на сканере CanoScan 8800F. Оптическую плотность затемненных участков измеряли с помощью программы Bio7 (США).

Статистическая обработка. Статистическую достоверность различий определяли, используя *t* критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Все данные представлены как среднее арифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе изучено влияние двух-сосудистой ишемии мозга крыс и последующей трехдневной реперфузии на уровень одного из основных маркеров аутофагии LC3B-II. Показано достоверное увеличение уровня LC3B-II, представляющего собой липидированную форму LC3B (в отличие от растворимой формы LC3B-I), как в гиппокампе, так и в лобной коре мозга (рис. 1). На рисунке приведены данные, полученные как при расчете соотношения LC3B-II/LC3B-I, так и LC3B-II, нормализованного к GAPDH. При обоих способах расчета полученных результатов как ICV введение крысам ингибитора аутофагии 3-МА (20 мкг на крысу до ишемического воздействия на мозг), так и интраназальное введение 0.5 МЕ инсулина (до ишемического воздействия на мозг и затем ежедневно в течение трех суток реперфузии) достоверно снижали уровень этого маркера аутофагии LC3B-II до его значения у ложно-оперированных животных, т. е. имела место полная нормализация этого показателя.

Для оценки влияния интраназального введения инсулина на интенсивность апоптоза определяли активность каспазы-3 в мозге крыс с ишемией и реперфузией и ложно-оперированных животных. При воздействии ишемии переднего мозга и последующей трехдневной реперфузии (рис. 2) активность каспазы-3 достоверно возрастала как в гиппокампе, так и в лобной коре мозга

($p < 0.02$). Но, если крысам вводили интраназально инсулин, то каспазная активность в гиппокампе снижалась практически до контрольных величин, т. е. до ее уровня в том же районе мозга ложно-оперированных животных ($p < 0.02$). В лобной коре мозга, подвергнутой ишемии и реперфузии, снижение каспазной активности под влиянием введенного инсулина также было достоверным, но различие было менее выраженным, чем в гиппокампе ($p < 0.05$). У ложно-оперированных крыс эффект интраназально введенного инсулина на активность каспазы-3 не был достоверным в изученных структурах мозга (рис. 2).

Об активации астроглии при ишемии и реперфузии переднего мозга судили, определяя методом иммуноблоттинга уровень глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в гиппокампе и в лобной коре мозга. Как видно из результатов, представленных на рис. 3, ишемия и реперфузия увеличивали уровень GFAP в гиппокампе и в лобной коре мозга ($p < 0.02$). В гиппокампе ни введение инсулина, ни введение крысам, подвергнутым ишемии и реперфузии, ингибитора аутофагии 3-МА или ингибитора апоптоза Ac-DEVD-CHO не снижали достоверно уровень GFAP, однако при их действии он переставал достоверно отличаться от контроля.

В коре мозга крыс высокий уровень GFAP, намного превышающий контрольные значения у ложно-оперированных крыс, был характерен не только для ишемических животных, которым не вводили какие-либо протекторы, но сохранялся и у крыс, которым вводили интраназально инсулин или интрацеребровентрикулярно (ICV) ингибиторы аутофагии или апоптоза. У ложно-оперированных животных инсулин не только не снижал уровень GFAP в лобной коре мозга, но и достоверно повышал его, как и ингибитор апоптоза.

Одной из целей предпринятого исследования было подтвердить в опытах *in vivo* основные результаты по изучению механизма действия инсулина, полученные *in vitro* на нейронах коры мозга. Мы изучили влияние ишемии и реперфузии, а также интраназального введения инсулина крысам на активность протеинкиназ Akt и АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) в мозге. При этом в опытах, проведенных ранее *in vitro* [29] сигнальные системы, принимающие участие в реализации нейропротекторного действия инсулина, были изучены более детально, о чем речь пойдет в Обсуждении.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, ишемия и реперфузия на ранних этапах воздействия активировали протеинкиназу Akt как в гиппокампе, так и в лобной коре мозга. При этом инсулин, введенный интраназально до начала ишемического воздействия, еще больше увеличивал активность Akt, его эффект был хорошо выраженным и достоверным.

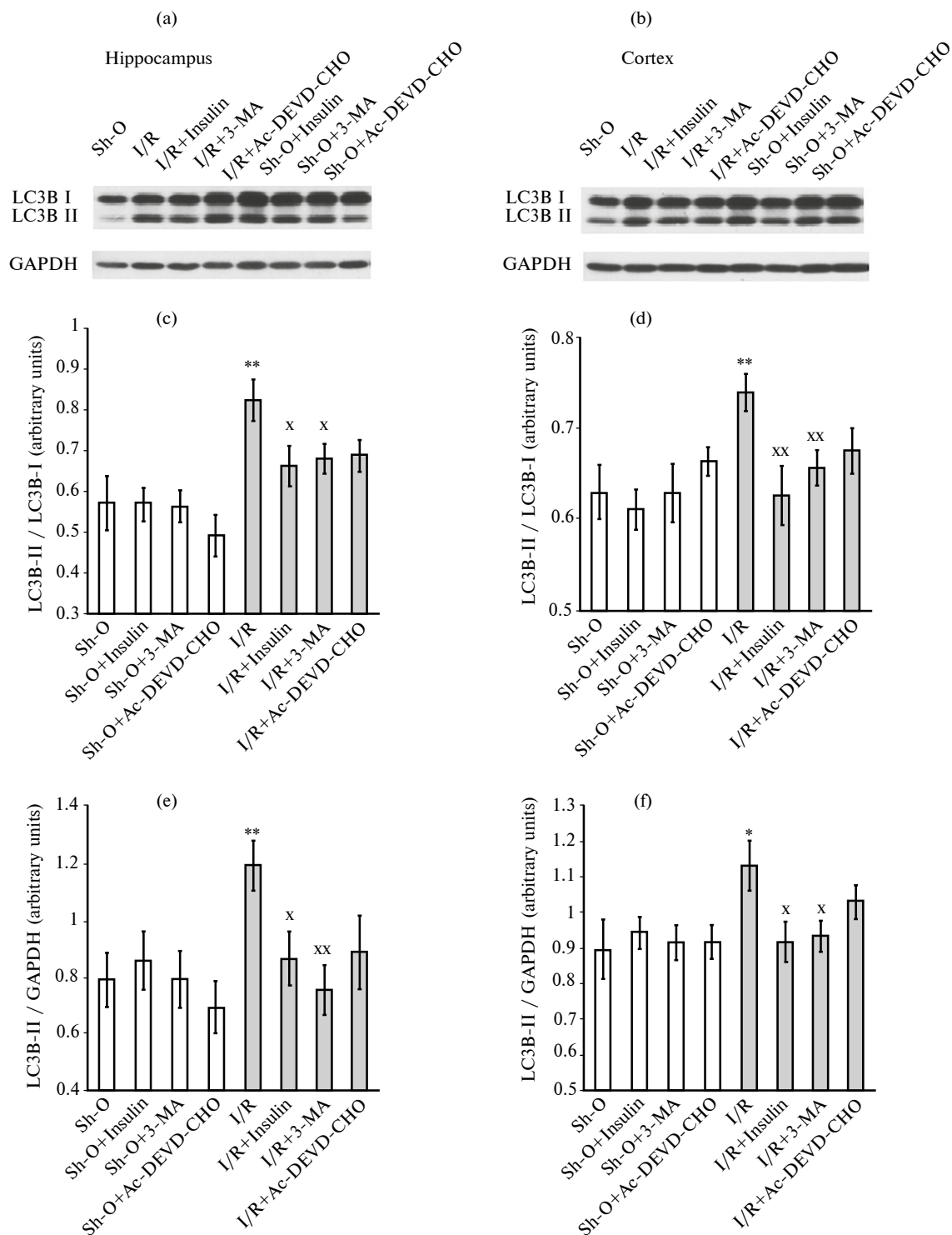


Рис. 1. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-метиладенина и Ac-DEVD-CHO, соответственно) на уровень маркера аутофагии LC3B-II в гиппокампе и лобной коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. (а), (с) и (е) — уровень LC3B-II в гиппокампе, (б), (д) и (ф) — уровень LC3B-II в лобной коре мозга. (а) и (б) — иммуноблоты, (с), (д), (е) и (ф) — результаты денситометрии в расчете на LC3B-I (с) и (д) или на GAPDH (е) и (ф) показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 проведенных опытов. Сокращения на рисунке: Sh-O — ложно-оперированные крысы, I/R — крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии, 3-MA — 3-метиладеннин. Крыс подвергали двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией в течение 3 суток. Ингибиторы аутофагии и апоптоза вводили крысам интрацеребровентрикулярно (ICV) до ишемического воздействия, а 0.5 МЕ инсулина вводили интраназально до ишемического воздействия и затем ежедневно во время 3 суток реперфузии. Различия достоверны по *t*-критерию Стьюдента: * и ** — по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга у ложно-оперированных животных: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.02$, x и xx — по сравнению с данными у крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга: x — $p < 0.05$, xx — $p < 0.02$.

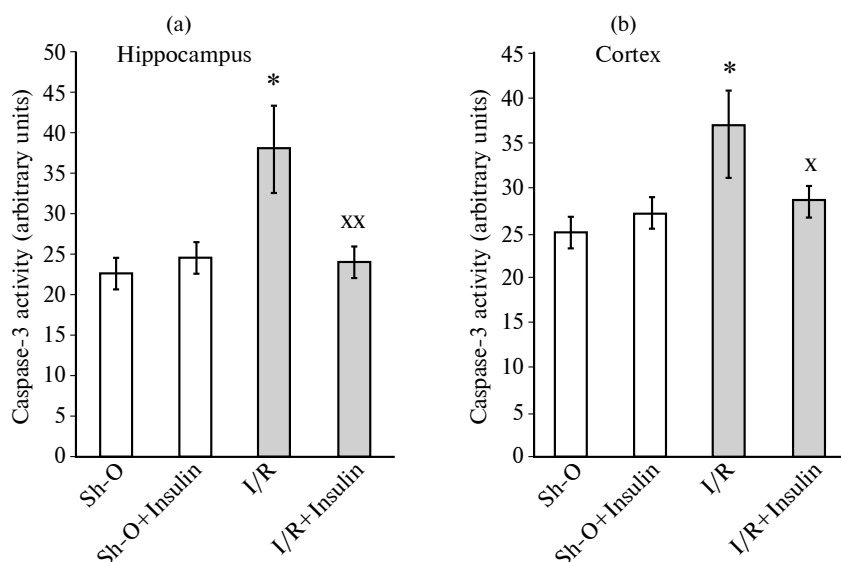


Рис. 2. Влияние введения инсулина на активность каспазы-3 в гиппокампе и лобной коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 опытов. (a) — активность каспазы-3 в гиппокампе, (b) — активность каспазы-3 в лобной коре мозга. Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента: * — по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс, $p < 0.02$, ^x и ^{xx} — по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга, ^x — $p < 0.05$, ^{xx} — $p < 0.02$.

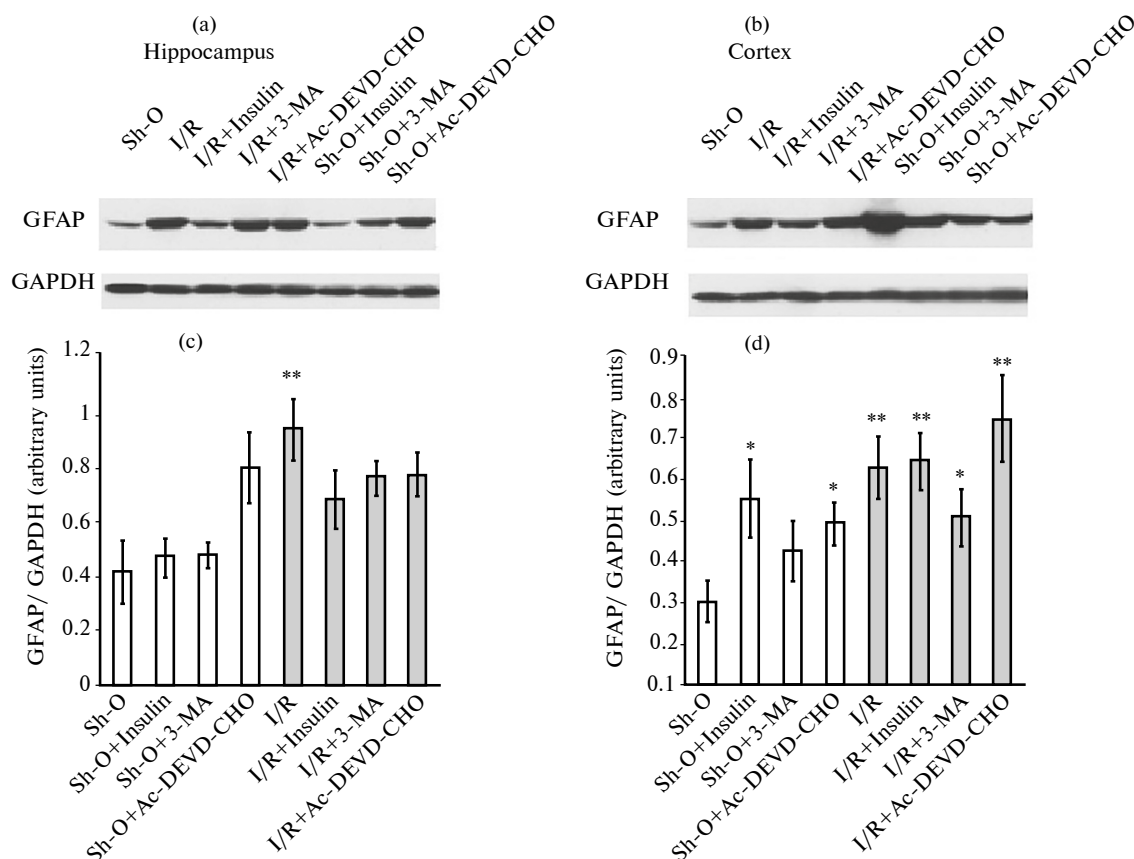


Рис. 3. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-MA и ас-DEVD-CHO, соответственно) на уровень глиального кислого фибриллярного белка (GFAP) в гиппокампе и коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 6–8 опытов. (a) и (c) — уровень GFAP в гиппокампе, (b) и (d) — уровень GFAP в лобной коре, (a) и (b) — иммуноблоты, (c) и (d) — результаты денситометрии представлены как GFAP/GAPDH. Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.02$.

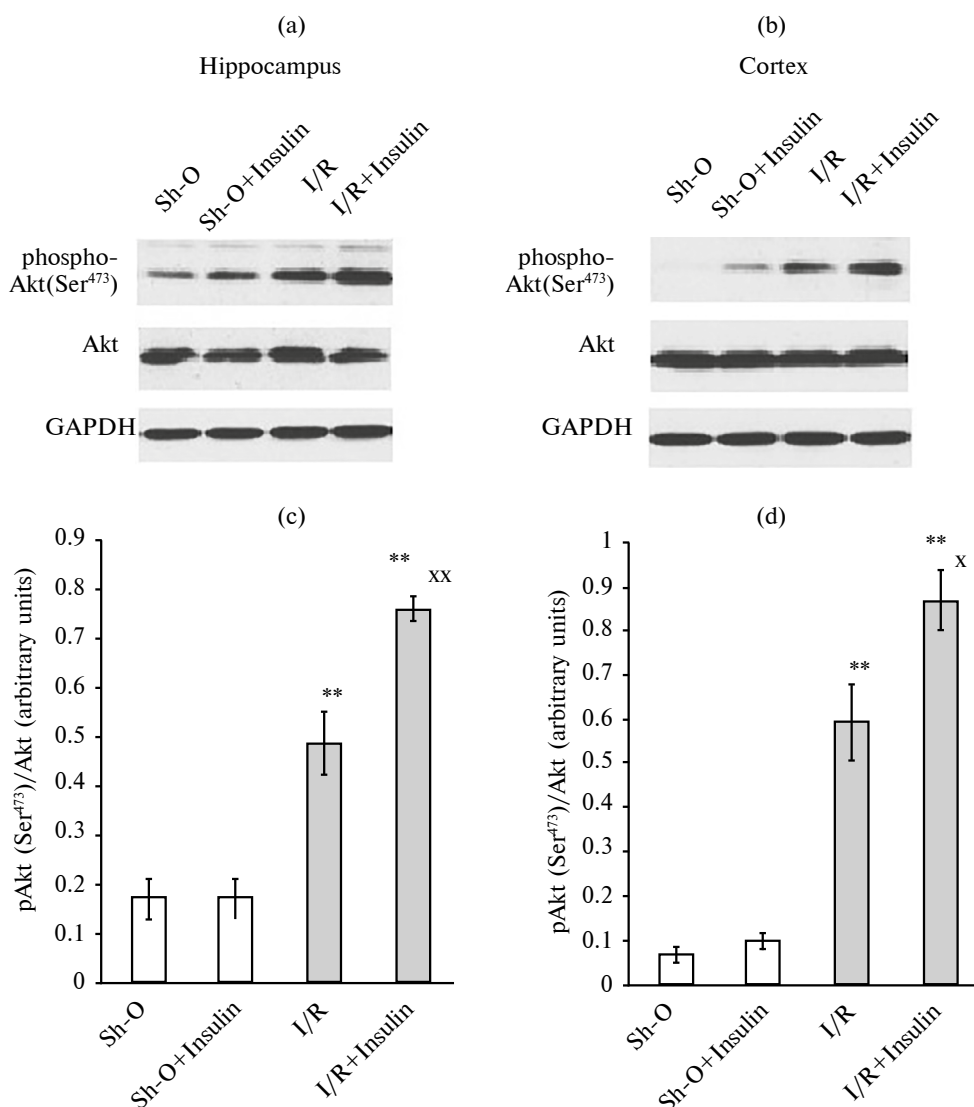


Рис. 4. Влияние введения инсулина на активность протеинкиназы В (Akt) в гиппокампе и лобной коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 5–7 опытов. (a) и (c) – активность протеинкиназы Akt в гиппокампе, (b) и (d) – активность протеинкиназы Akt в лобной коре, (a) и (b) – иммуноблотты, (c) и (d) – результаты денситометрии представлены как pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt. Сокращения на рисунке: Sh-O – ложно-оперированные крысы, I/R – крысы с ишемией и реперфузией мозга. Крыс подвергали двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией в течение 2 часов. 0.5 МЕ инсулина вводили интраназально за 1 ч до ишемического воздействия. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента: * и ** – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$, x и xx – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга, x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

Нам не удалось выявить достоверного эффекта инсулина на активность другой изученной протеинкиназы – AMPK на этом раннем сроке реперфузии (через 2 ч после ее начала). Но было показано, что инсулин достоверно снижает активность этой протеинкиназы у ишемических крыс в гиппокампе и в лобной коре мозга через 3 дня после начала реперфузии (рис. 5). В этом случае инсулин вводился не только до ишемического воздействия на мозг, но и ежедневно в период реперфузии. При этом в гиппокампе интраназально вводимый инсулин вызывал также достоверное снижение активности AMPK у ложно-оперированных животных (рис. 5).

Мы изучили, как влияют ишемия и реперфузия, инсулин, ингибитор аутофагии (3-MA) и ингибитор апоптоза (Ac-DEVD-CHO) на уровень фосфорилирования субстрата рецептора инсулина-2 (IRS-2) по Ser⁷³¹ в гиппокампе и в лобной коре мозга. Фосфорилирование IRS по сериновым остаткам играет важную роль в регуляции эффектов инсулина. Так, показано, что оно может значительно снижать уровень форм IRS-1 и IRS-2, фосфорилированных по тирозину, и, соответственно, инсулиновый сигналинг [34]. Результаты представлены на рис. 6. Как видно из этих данных, в условиях наших опытов ни ишемия и репер-

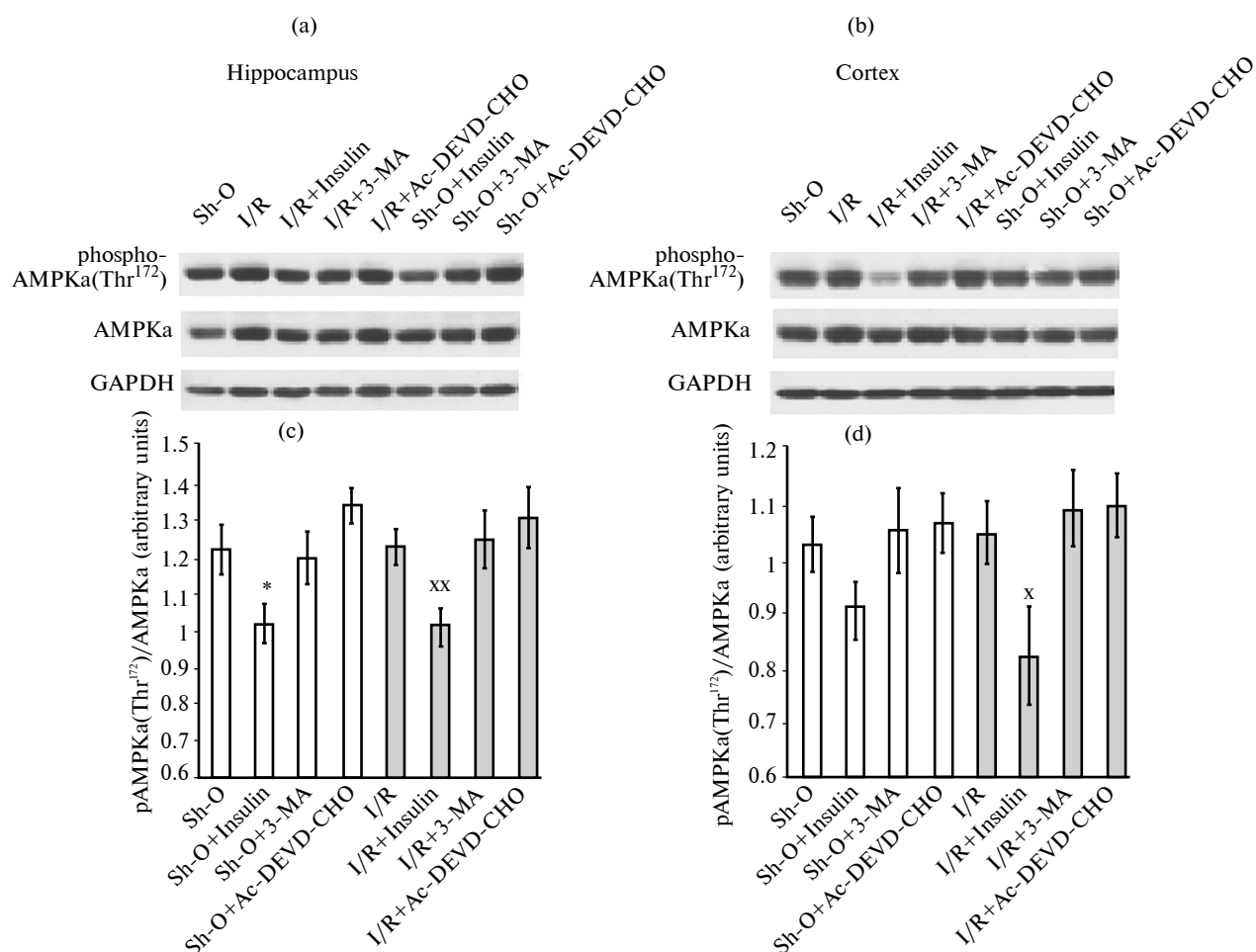


Рис. 5. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-МА и Ас-DEVD-СНО, соответственно) на активность АМРК в гиппокампе и коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 опытов. (а) и (с) – активность протеинкиназы АМРК в гиппокампе, (б) и (д) – активность протеинкиназы АМРК в лобной коре, (а) и (б) – иммуноблотты, (с) и (д) – результаты денситометрии представлены как рАМРК- α (Thr¹⁷²)/АМРК- α . Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента: * – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс, $p < 0.05$, x и xx – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга, x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

фузия, ни инсулин, ни ингибиторы аутофагии (3-МА) и апоптоза (Ас-DEVD-СНО) не оказывали достоверного эффекта на фосфорилирование IRS-2 по Ser⁷³¹ в гиппокампе. В лобной коре мозга также не были выявлены достоверные изменения фосфорилирования IRS-2 по Ser⁷³¹ под влиянием интраназально введенного инсулина или ингибиторов аутофагии и апоптоза у крыс, подвергшихся ишемии и реперфузии.

Таким образом, в настоящей работе показано, что инсулин, введенный интраназально крысам с глобальной ишемией и реперфузией переднего мозга, снижает активацию процессов аутофагии и апоптоза в гиппокампе и лобной коре мозга, о чем судили по изменению уровня маркеров этих процессов, а также модулирует активность протеинкиназ, способных регулировать интенсивность этих процессов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По современным представлениям для достижения серьезных успехов в разработке подходов к лечению ишемических поражений мозга необходимо понимание механизмов как аутофагической, так и апоптотической гибели нервных и других клеток мозга для последующей регуляции этих процессов [5, 16–17]. Во многих работах последних лет показана гибель нейронов от активации аутофагии. В тоже время для ряда нейропротекторов было найдено, что они способствуют увеличению жизнеспособности нейронов мозга при этой патологии благодаря предотвращению их аутофагической гибели [16, 19–24].

Хотя инсулин считается одним из наиболее перспективных нейропротекторов, чему, в частности, способствовали его удачные клинические испыта-

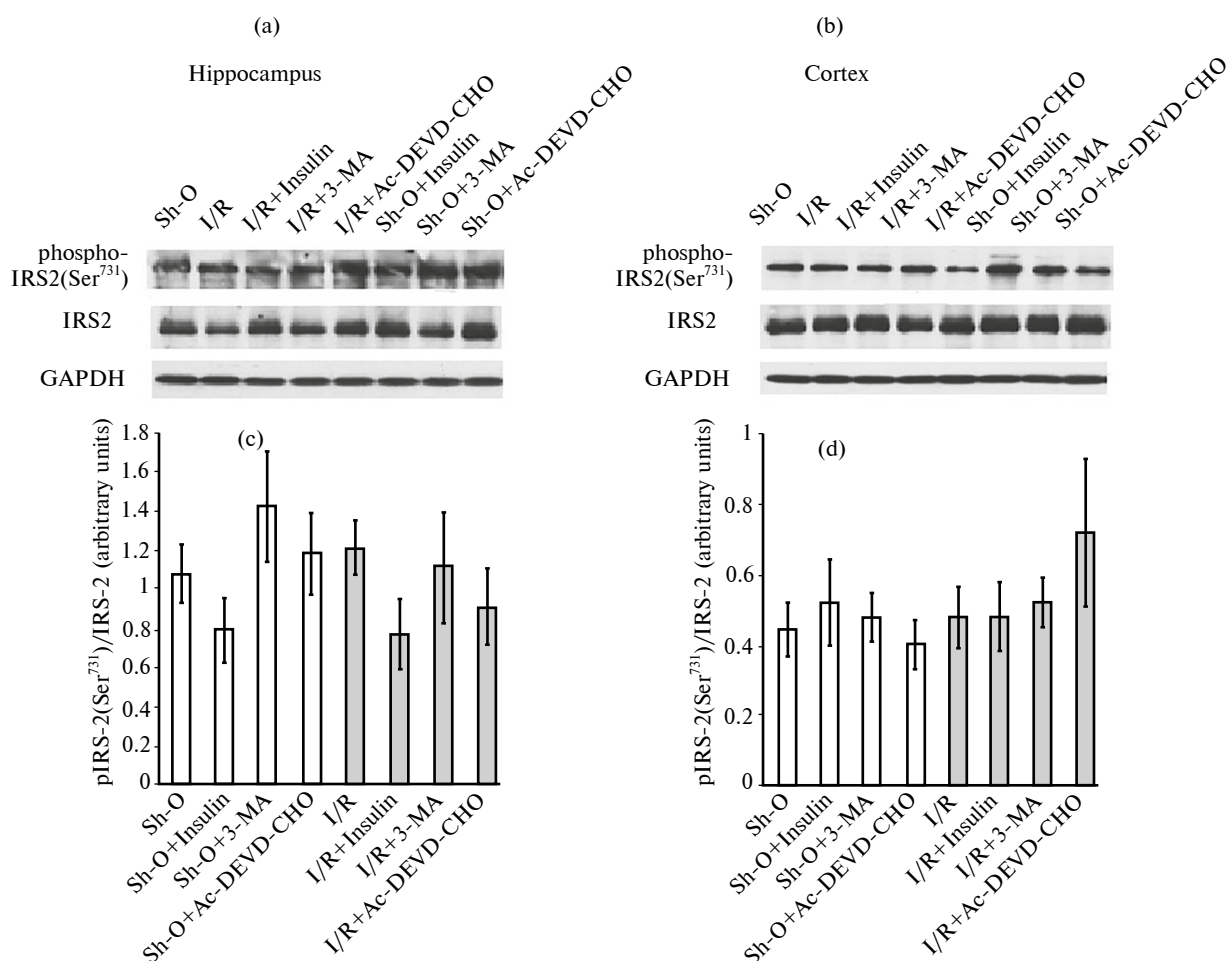


Рис. 6. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-МА и ас-DEVD-CHO, соответственно) на уровень pIRS-2 (Ser⁷³¹) в гиппокампе и коре мозга при ишемии переднего мозга крыс и реперфузии. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 опытов. (а) и (с) – уровень pIRS-2 (Ser⁷³¹) в гиппокампе, (b) и (d) – уровень pIRS-2 (Ser⁷³¹) в лобной коре мозга, (а) и (b) – иммуноблотты, (с) и (d) – результаты денситометрии представлены как отношение pIRS-2 (Ser⁷³¹)/pIRS-2. Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1.

ния при болезни Альцгеймера, один из пробелов в понимании механизма его действия заключался в отсутствии данных о том, способен ли он снижать интенсивность процессов аутофагии, которые активируются при ишемии и реперфузии мозга, а также предотвращать аутофагическую гибель нейронов при этих патологических воздействиях.

В настоящей работе было показано, что уровень одного из основных маркеров аутофагии LC3B-II и активность каспазы-3 достоверно увеличиваются под влиянием ишемии и реперфузии в гиппокампе и в лобной коре мозга (рис. 1 и 2). Увеличение образования LC3B-II происходит благодаря тому, что цитозольная форма LC3 (LC3-I) при активации аутофагии переходит в липидированную форму LC3-II, которая играет важную роль в образовании аутофagosомальной мембраны [35–37]. При этом найдено, что интраназальное введение крысам инсулина значительно и достоверно снижает уровень LC3B-II и активность каспазы-3 в гиппокампе и в лобной коре мозга крыс при гло-

бальной ишемии и последующем восстановлении кровоснабжения переднего мозга (рис. 1 и 2). Это свидетельствует о способности инсулина подавлять, наряду с апоптозом, процессы аутофагии, активированные при ишемии и реперфузии мозга. Совокупность данных, полученных ранее [28–29] и в настоящей работе, однозначно свидетельствуют о способности инсулина ингибировать процессы аутофагии в ткани мозга и предотвращать или уменьшать гибель нейронов мозга, вызванную активацией аутофагии при ишемии и реперфузии мозга. В этом отношении инсулин теперь дополняет список тех нейропротекторов, которые способны повышать жизнеспособность нейронов при ишемии и реперфузии мозга, подавляя аутофагическую гибель нейронов [16, 19–24].

Полученные данные о способности инсулина подавлять процессы аутофагии в структурах переднего мозга согласуются с результатами опытов, полученных ранее *in vitro* [29]. Была продемонстрирована способность инсулина изменять до

контрольных значений уровень маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62 в нейронах коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса, являющегося одной из важнейших причин гибели нейронов при ишемии и последующей реперфузии мозга. Было показано, что при действии перекиси водорода на нейроны коры мозга в культуре уровень такого маркера аутофагии, как LC3B-II значительно возрастает, а уровень маркера аутофагии, SQSTM1/p62, подвергающегося деградации при активации аутофагии, достоверно снижается [29]. В случае преинкубации клеток с инсулином уровень LC3B-II, напротив, достоверно и сильно снижается, а уровень SQSTM1/p62 увеличивается. Нормализация уровней этих двух маркеров аутофагии инсулином говорит о том, что он подавляет активацию аутофагии в условиях окислительного стресса [29].

Ранее способность инсулина ингибировать процессы аутофагии была показана в экстра-невральных клетках и органах – в хондроцитах [38] и в сердце мышей с экспериментальным диабетом [39]. Недавно к этим работам прибавилась статья, показавшая, что интраназальное введение инсулина способно оказывать нейропротекторный эффект и подавлять аутофагическую гибель нейронов при травме головного или спинного мозга [40].

Что касается апоптотической гибели нейронов, то наши данные о том, что она снижается при введении инсулина крысам с ишемией и реперфузией мозга (рис. 4) согласуются с результатами других авторов об эффектах инсулина и его миметиков [41–42].

В последнее время существенное внимание уделяется и тем изменениям, которые при ишемии и реперфузии мозга претерпевают не только нейроны, но и глиальные клетки мозга [43–44]. Мы пытались установить, способен ли инсулин и ингибиторы аутофагии и апоптоза воздействовать на процессы, в которые вовлечены при ишемии и реперфузии астроглиальные клетки. Нами обнаружено увеличение уровня GFAP в гиппокампе и в лобной коре мозга при двухсосудистой ишемии и последующей трехдневной реперфузией переднего мозга. Увеличение уровня GFAP является показателем активации астроглии при ишемии и реперфузии переднего мозга и одним из проявлений воспалительных процессов [43]. При большой силе повреждающего воздействия этот показатель может рассматриваться как показатель глиоза и образования глиальных шрамов (glial scar) в ткани мозга, которые препятствуют восстановлению функций этого органа (см., например, [43]). Следует отметить, что, наряду с этим, активация астроглии в ткани мозга, усиливающая ее фагоцитарные функции, может способствовать нормализации патологических процессов и повышать жизнеспособность нейронов.

При этом в отдельных случаях небольшое повышение уровня GFAP может иметь место не только под влиянием ишемии и реперфузии, но и под влиянием нейропротектора и при этом может сочетаться с улучшением неврологических показателей и функционального состояния организма, с большей сохранностью нейронов [44]. В этом случае повышение уровня GFAP может иметь место под влиянием нейропротектора, может сочетаться с улучшением неврологических показателей и функционального состояния организма, с большей сохранностью нейронов. [44]. Само собой разумеется, что такой эффект возможен только в том случае, если активация астроглии не приводит к необратимому глиозу.

Учитывая все эти сведения, представляло бы большой интерес выявить влияние инсулина на увеличение уровня GFAP и активацию астроглии при ишемии и реперфузии мозга в условиях наших опытов. В гиппокампе и лобной коре мозга нам не удалось показать достоверного изменения уровня GFAP в изученных структурах мозга ни под влиянием инсулина, ни под влиянием ингибиторов аутофагии и апоптоза у крыс, подвергнутых ишемии и реперфузии (рис. 3). Однако при введении инсулина уровень GFAP в гиппокампе этих крыс снижался настолько, что переставал отличаться от его уровня в этом районе мозга ложно-оперированных крыс. Возможно, что при измененных условиях ишемического или реперфузионного воздействия, например, при меньшем времени реперфузии, которое в проведенных нами опытах составляла 3 суток, удастся выявить эффект инсулина на содержание GFAP в этом районе мозга. Для лобной коры оказалось характерным значительное увеличение уровня GFAP по сравнению с его уровнем в лобной коре мозга ложно-оперированных крыс как при ишемии и реперфузии, так и при этом воздействии, сопровождающимся введением инсулина или ингибиторов аутофагии и апоптоза (рис. 3).

В регуляции действия инсулина важную роль играют субстраты инсулинового рецептора (IRS). В ткани мозга они представлены преимущественно двумя формами – IRS-1 и IRS-2. Всего же насчитывается 6 форм белков IRS. Они подвергаются фосфорилированию по тирозиновым остаткам, что приводит к изменению их функциональной активности, в частности, к усилению ими инсулинового сигналинга [45–46]. К числу важных функций этих соединений относится также их способность ингибировать эффекты инсулина, в ткани мозга IRS-1 и IRS-2 осуществляют это ингибирование главным образом при их фосфорилировании по сериновым остаткам [46–47]. Этому фосфорилированию IRS-1 и IRS-2, судя по имеющимся данным, принадлежит важная роль в развитии резистентности к инсулину [47], т. к. фосфорилирование этих

белков по сериновым остаткам может уменьшать их тирозинное фосфорилирование и, соответственно, инсулиновый сигналинг. Показано, что фосфорилирование IRS-2 по Ser⁷³¹ значительно увеличивается в нервной ткани, в том числе в ганглиях дорсальных корешков, при диабете [47], что вносит вклад в развитие резистентности к инсулину при этой болезни. Мы не выявили достоверных изменений в степени фосфорилирования IRS-2 по Ser⁷³¹ ни под влиянием инсулина, ни под влиянием ингибиторов аутофагии и апоптоза (рис. 6). Но, если бы мы обнаружили достоверное повышение этого фосфорилирования под влиянием инсулина при ишемии и реперфузии в нашей работе, то можно было бы предполагать, что этот метаболический эффект инсулина вносит вклад в развитие резистентности к нему в условиях наших опытов.

Одной из целей нашего исследования было изучение влияния инсулина в опытах *in vivo* на активность протеинкиназ, регулирующих интенсивность процессов аутофагии и апоптоза. Протеинкиназа AMPK, как следует из ее названия, активируется при накоплении аденозинмонофосфата (AMP) [48]. Эта протеинкиназа активируется также другими стрессорными факторами, такими как образующиеся свободные радикалы, увеличенная концентрация ионов кальция в цитозоле и другими. Протеинкиназа AMPK при ее активации фосфорилирует по Ser³¹⁷ и Ser⁷⁷⁷ протеинкиназу ULK-1 [49], входящую в состав комплекса, инициирующего и активирующего аутофагию. Это приводит к активации как ULK-1, так и самого комплекса и запускает аутофагические процессы в клетках.

Нами показано, что интраназальное введение инсулина крысам, подвергнутым ишемии и реперфузии мозга, ингибирует активность AMPK в гиппокампе и лобной коре мозга крыс (рис. 5). При высоком энергетическом уровне содержание AMP и, соответственно, активность AMPK относительно низки, а комплекс mTORC1 гиперактивирован [50–52]. Напротив, при неблагоприятных воздействиях на нервные клетки происходит активация AMPK и запуск аутофагических процессов [50–51]. Ингибирование активности AMPK инсулином при его введении крысам с глобальной ишемией и реперфузией мозга, показанное в настоящей работе, несомненно вносит большой вклад в его способность ингибировать процессы аутофагии и предотвращать или снижать аутофагическую гибель нейронов мозга.

Другой протеинкиназой, активно участвующей в регуляции процессов аутофагии у млекопитающих, является протеинкиназа B (Akt). Она активирует mTOR комплекс 1 (mTORC1), обладающий протеинкиназной активностью и ингибирующий процессы аутофагии. mTORC1 осуществляет ингибирующее фосфорилирование по Ser⁷⁵⁷ проте-

инкиназы ULK-1 [49, 51], которая, как указывалось, входит в состав комплекса, инициирующего и активирующего аутофагию. При этом ингибирующем фосфорилировании ULK-1 этот комплекс также подвергается ингибированию [49, 51].

Нами показано, что введенный крысам инсулин вызывает значительную активацию протеинкиназы B (Akt) (рис. 4). Активация инсулином протеинкиназы Akt при его введении крысам с ишемией и реперфузией переднего мозга вносит, очевидно, большой вклад в предотвращение инсулином не только апототической, но и аутофагической гибели нейронов при этой патологии.

Интересно отметить, что под влиянием AMPK активация аутофагии происходит также благодаря инактивирующему влиянию этой протеинкиназы на mTOR сигнальный путь. При этом AMPK может ингибировать mTORC1, непосредственно воздействуя на него, а также наряду с этим эффектом эта протеинкиназа может фосфорилировать и активировать TSC1/2, который способен непрямым путем инактивировать mTORC1 [50].

Что касается антиапоптотического эффекта инсулина при его введении крысам, подвергнутым ишемии и реперфузии, то он в наибольшей мере обусловлен активацией инсулином протеинкиназы B или Akt. Это объясняется способностью Akt при ее активации фосфорилировать по Ser⁹ и инактивировать GSK-3beta, а также увеличивать синтез антиапоптотического белка Bcl-2. Активация GSK-3beta играет важнейшую роль в нарушении функций митохондрий, приводит к увеличению отношения Bax/Bcl-2 (про- к антиапоптотическому белку) и падению мембранного потенциала митохондрий (см., например, [53]). А инактивация GSK-3beta инсулином способствует нормализации метаболизма и предотвращению апототической гибели нейронов.

Данные о способности инсулина активировать протеинкиназу Akt и ингибировать протеинкиназу AMPK при ишемии и реперфузии мозга согласуются с ранее полученными результатами о механизме нейропротекторного эффекта инсулина при действии на нейроны коры мозга в состоянии окислительного стресса (который является также одной из основных причин гибели нейронов при ишемии и реперфузии мозга) в опытах *in vitro* [29]. В этих исследованиях нами были получены свидетельства того, что антиапоптотический и антиаутофагический эффекты инсулина на нейроны коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса связаны со значительным снижением им активности протеинкиназы AMPK, активацией протеинкиназы Akt, инактивацией протеинкиназы GSK-3beta благодаря ее фосфорилированию по Ser⁹ и с уменьшением отношения про- к антиапоптотическому белку митохондрий (Bax/Bcl-2) [29].

Таким образом, в настоящей работе показано, что интраназально введенный инсулин способен достоверно уменьшать интенсивность аутофагических процессов, ингибировать протеинкиназу АМРК-альфа, инициирующую аутофагические процессы и активировать протеинкиназу Акт, ингибирующую аутофагию, в таких структурах как гиппокамп и лобная кора мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга. Подтверждена способность инсулина снижать интенсивность апоптотических процессов в ткани мозга при ишемическом воздействии на него и последующей реперфузии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.Ф.А., И.О.З.), сбор данных (И.О.З., Л.В.Б., Д.К.А.), обработка данных (Л.В.Б., И.О.З., Д.К.А.), написание и редактирование манускрипта (Н.Ф.А., И.О.З., Л.В.Б.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № I-6 от 26.01.2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22–25–00415.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- GBD2019 Stroke Collaborator (2021). Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 20 (10):795–820. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0)
- Kuriakose D, Xiao Z (2020) Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives. *Int J Mol Sci* 21 (20): 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
- Barthels D, Das H (2020) Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochim Biophys Acta. Mol Basis Dis* 1866 (4): 165260. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.012>
- Cannistraro RJ, Badi M, Eidelman BH, Dickson DW, Middlebrooks EH, Meschia JF (2019) CNS small vessel disease: A clinical review. *Neurology*: 92 (24) 1146–1156. <http://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007654>
- Han F, Zhang DD, Zhai FF, Xue J, Zhang JT, Yan S, Zhou LX, Ni J, Yao M, Yang M, Li ML, Jin ZY, Dai Q, Zhang SY, Cui LY, Zhu YC (2021) Association between large artery stenosis, cerebral small vessel disease and risk of ischemic stroke. *Sci China Life Sci*: 64 (9) 1473–1480. <http://doi.org/10.1007/s11427-020-849-x>
- Markus HS, de Leeuw FE (2023) Cerebral small vessel disease: Recent advances and future directions. *Int J Stroke*: 18 (1) 4–14. <http://doi.org/10.1177/17474930221144911>
- Fan LW, Carter K, Beatt A, Pang Y (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
- Tashima T (2020) Shortcut approaches to substance delivery into the brain based on intranasal administration using nanodelivery strategies for insulin. *Molecules* 25 (21): 5188. <https://doi.org/10.3390/molecules25215188>
- Craft S, Claxton A, Baker LD, Hanson AJ, Collerton B, Trittschuh EH, Dahl D, Caulder E, Neth B, Montine TJ, Jung Y, Maldjian J, Whitlow C, Friedman S (2017) Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: A pilot clinical trial. *J Alzheimers Dis* 57: 1325–1334. <https://doi.org/10.3233/JAD-1612566>
- Avgerinos KI, Kalaitzidis G, Malli A, Kalaitzoglou D, Myserlis PG, Lioutas VA (2018) Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment. A systematic review. *J Neurol* 265: 1497–1510. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8768-0>
- Novak P, Maldonado DAP, Novak V (2019) Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy A double-blinded placebo-controlled pilot study. *PLoS One* 14: e0214364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214364>
- Guo Z, Chen Y, Mao YF, Zheng T, Jiang Y, Yan Y, Yin X, Zhang B (2017) Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Sci Rep* 7: 45971. <https://doi.org/10.1038/srep45971>
- Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS (2016) Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology. *Mol Neurobiol* 53 (7): 4548–4562. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9384-y>
- Zorina II, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova NF (2018) Insulin administration prevents accumulation of conjugated dienes and trienes and inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat cerebral cortex during two-vessel forebrain ischemia and reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 54 (3): 246–249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214364>
- Zorina II, Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2019) Features of the changes in lipid peroxidation and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain of the aged rats in the conditions of two-vessel cerebral ischemia/reperfusion. *Adv Gerontol*. 32 (6): 941–947.

16. Nabavi SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima DK, Ahmed T, Shahid M (2019) Novel therapeutic strategies for stroke: the role of autophagy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 56(3): 182–199. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1575333>
17. Campbell BCV, Khatri P (2020) Stroke. *Lancet* 396 (10244): 149–142. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31179-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31179-X)
18. He C, Xu Y, Sun J, Li L, Zhang JH, Wang Y (2022) Autophagy and apoptosis in acute brain injuries: From mechanism to treatment. *Antioxid Redox Signal*. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0094>
19. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X (2014) N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci* 34: 2967–2978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1948-13.2014>
20. Wang M, Li Y-J, Ding Y, Zhang H-N, Sun T, Zhang K, Yang L, Guo Y-Y, Liu S-B, Zhao M-G, Qu Y-M (2016) Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 53: 932–943. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9062-5>
21. Li L, Tian J, Long MK-W, Chen Y, Lu J, Zhou C, Wang T (2016) Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy. *PLoS One* 11: e0144219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144219>
22. Li X, Wang M, Qin C, Fan W-H, Tian D-S, Liu J-L (2017) Fingolimod suppresses neuronal autophagy through the mTOR/p70S6K pathway and alleviates ischemic brain damage in mice. *PloS One* 12: e0188748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188748>
23. Hu Y, Zhou H, Zhang H, Sui Y, Zhang Z, Zou Y, Li K, Zhao Y, Xie J, Zhang L (2022) The neuroprotective effect of dexmedetomidine and its mechanism. *Front Pharmacol* 13: 965661. eCollection 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965661>
24. Zhang H, Wang X, Chen W, Yang Y, Wang Y, Wan H, Zhu Z (2023) Danhong injection alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy through miRNA-132-3p/ATG12 signal axis. *J Ethnopharmacol* 300: 115724. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115724>
25. Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, John R, Barrett JR, Kirks R, Grace H, Kondrikova G, Johnson MH, Hess DC, Schoenlein PV, Hoda MN, Hill WD (2014) Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Transl Stroke Med* 6: 8. eCollection. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-6-8>
26. Liu X, Tian F, Wang S, Wang F, Xiong L (2018) Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury. *Rejuvenation Res* 215: 405–415. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1999>
27. Carloni S, Balduini W (2020) Simvastatin preconditioning confers neuroprotection against hypoxia-ischemia induced brain damage in neonatal rats via autophagy and silent information regulator 1 (SIRT1) activation. *Exp Neurol* 324: 113117. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113117>
28. Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova DK, Ilyasov IO, Avrova NF (2023) Intranasal insulin decreases autophagic and apoptotic death of neurons in the rat hippocampal CA1 region and frontal cortex under forebrain ischemia-reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 59 (1): 45–56. <https://doi.org/10.1134/S0022093023010040>
29. Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova DK, Avrova NF (2023) Neuroprotective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress is mediated by autophagy and apoptosis inhibition in vitro. *J Evol Biochem Phys* 59 (5): 1536–1550. <https://doi.org/10.1134/S0022093023050071>
30. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. Acad. Press. San Diego Calif. USA 1–237.
31. Молчанова СМ, Москвин АН, Захарова ИО, Юрлова ЛА, Носова ИЮ, Аврова НФ (2005) Влияние двухсосудистой ишемии переднего мозга и введения индометацина и квинакрина на активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы в разных областях мозга крыс. *Ж эвол биохим физиол* 41(1): 33–38. [Molchanova SM, Moskvina AN, Zakharova IO, Iurlova LA, Nosova IU, Avrova NF (2005) Na, K-atpase activity in different brain regions in cerebral ischemia and influence of quinacrine and indomethacin administration. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 41(1):33–38. (In Russ)].
32. Sanderson TH, Wider JM (2013) 2-Vessel occlusion/hypotension: A rat model of global brain ischemia. *J Vis Exp* 76: e50173. <https://doi.org/10.3791/50173>
33. Zakharova IO, Sokolova TV, Vlasova YA, Bayunova LV, Rychkova MP, Avrova NF (2017) α-Tocopherol at nanomolar concentration protects cortical neurons against oxidative stress. *Int J Mol Sci* 18: 216. <https://doi.org/10.3390/ijms18010216>
34. Zick Y (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance *Sci STKE* 268: pe4. <https://doi.org/10.1126/stke.2682005pe4>
35. Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12):2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
36. Fritzen AM, Frøsig C, Jeppesen J, Jensen TE, Lunds-gaard AM, Serup AK, Schjerling P, Proud CG, Richter EA, Kiens B (2016) Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. *Cell Signal* 28(6):663–674. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.03.005>
37. Bansal M, Moharir SC, Swarup G (2018) Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun Integr Biol* 11 (2): 1–4. <https://doi.org/10.1080/19420889.2018.1467189>

38. *Ribeiro M, López de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Caramés B* (2016) Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 24:731–739.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.017>
39. *Pires KM, Torres NS, Buffolo M, Gunville R, Schaaf C, Davis K, Selzman CH, Gottlieb RA, Boudina S* (2019) Suppression of cardiac autophagy by hyperinsulinemia in insulin receptor-deficient hearts is mediated by insulin-like growth factor receptor signaling. *Antioxid Redox Signal* 31(6):444–457.
<https://doi.org/10.1089/ars.2018.7640>
40. *Ding X, Zhang L, Zhang X, Qin Y, Yu K, Yang X* (2023) Intranasal insulin alleviates traumatic brain injury by inhibiting autophagy and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Neuroscience* 29:23–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.08.009>
41. *Sanderson TH, Kumar R, Murariu-Dobrin AC, Page AB, Krause GS, Sullivan JM* (2009) Insulin activates the PI3K-Akt survival pathway in vulnerable neurons following global brain ischemia. *Neurol Res.* 31(9):947–958.
<https://doi.org/10.1179/174313209X382449>
42. *Russo V, Candeloro P, Malara N, Perozziello G, Iannone M, Scicchitano M, Mollace R, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C* (2019) Key role of cytochrome C for apoptosis detection using Raman microimaging in an animal model of brain ischemia with insulin treatment. *Appl Spectrosc* 73 (10): 1208–1217.
<https://doi.org/10.1177/0003702819858671>
43. *Zhu Y-M, Gao X, Ni Y, Li W, Ken TA, Qiao S-G, Wang C, Xiao-Xuan Xu X-X, Hui-Ling Zhang H-L* (2017) Sevoflurane postconditioning attenuates reactive astrogliosis and glial scar formation after ischemia-reperfusion brain injury. *Neuroscience* 356:125–141.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.004>
44. *Zhang R, Pei H, Ru L, Li H, Liu G* (2013) Bone morphogenetic protein 7 upregulates the expression of nestin and glial fibrillary acidic protein in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biomed Rep* 1(6): 895–900.
<https://doi.org/10.3892/br.2013.164>
45. *Yamada M, Ohnishi H, Sano SA, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H* (1997) Insulin receptor substrate IRS-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 272(48):30334–30339.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30334>
46. *Grote CW, Morris JK, Ryals JM, Geiger PC, Wright DE* (2011). Insulin receptor substrate 2 expression and involvement in neuronal insulin resistance in diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res* 2011: 212571.
<https://doi.org/10.1155/2011/212571>
47. *Boura-Halfon S, Zick T* (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(4): E581–591.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90437.2008>
48. *Li Y, Chen Y* (2019) AMPK and autophagy. *Adv Exp Med Biol* 1206: 85–108.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_4
49. *Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L* (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13 (2):132–141.
<https://doi.org/10.1038/ncb2152>
50. *Parzych KR, Klionsky DJ* (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signals* 20(3):460–473.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
51. *Yoon MS* (2017) The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling, nutrients. 9 (11): 1176.
<https://doi.org/10.3390/nu9111176>
52. *Sharma A, Anand SK, Singh N, Dwivedi UN, Kakkar P* (2023) AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis. *Exp Cell Res* 428(1):113614.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113614>
53. *Yang K, Chen Z, Gao J, Shi W, Li L, Jiang S, Hu H, Liu Z, Xu D, Wu L* (2017) The key roles of GSK-3 β in regulating mitochondrial activity. *Cell Physiol Biochem* 44:1445–1459.
<https://doi.org/10.1159/000485580>

INTRANASAL ADMINISTRATION OF INSULIN TO RATS WITH FOREBRAIN ISCHEMIA AND REPERFUSION DECREASES THE INTENSITY OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN HIPPOCAMPUS AND FRONTAL BRAIN CORTEX, POSSIBLE MECHANISM OF UNSULIN ACTION

I. O. Zakharova^a, L. V. Bayunova^a, D. K. Avrova^a, N. F. Avrova^{a,*}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia*

^{*}*E-mail: avrova@iephb.ru*

Rat forebrain ischemia and subsequent three-day reperfusion were found to result in an increase in the levels of autophagy marker LC3B-II and glial fibrillary acidic protein (GFAP) and activation of caspase-3 in the hippocampus and frontal cortex. At the same time, intranasal administration of 0.5 IU insulin to rats with forebrain ischemia and reperfusion (before ischemia and daily during reperfusion) markedly and significantly diminished the level of LC3B-II and caspase-3 activity in the hippocampus and frontal cortex. It demonstrates the ability of

insulin to inhibit the activation of autophagy and apoptosis in forebrain structures during ischemia and reperfusion. It was not possible to find out a significant decrease in the level of GFAP in these brain structures under the influence of insulin administration to animals. Intranasal administration of insulin has been found to activate the protein kinase Akt (which activates the mTORC1 complex, known to inhibit autophagy processes) and to inhibit the protein kinase AMPK (initiating autophagy processes) in the hippocampus and cerebral cortex of rats with forebrain ischemia and reperfusion. These effects of insulin apparently underly its ability to diminish the autophagic and apoptotic neuronal death. The data on the modulation by insulin, administered intranasally to rats with forebrain ischemia and reperfusion, of Akt and AMPK activities are in agreement with more detailed studies of the possible mechanism of the neuroprotective action of insulin, which we previously made *in vitro* on cortical neurons under oxidative stress conditions.

Key words: forebrain ischemia and reperfusion, autophagy, apoptosis, intranasal administration of insulin, protein kinases