

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМЕНИ АКАД. Л. А. ОРБЕЛИ

ИСОЯН АРМИНЕ САМБЕЛОВНА

ПОКАЗАТЕЛИ ЭФФЕКТИВНОСТИ *STEVIA REBAUDIANA*
И *GLIBENCLAMIDE* ПРИ ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности

03.00.09-«Физиология человека и животных»

Научный руководитель:
д. б. н. В. А. Чавушян-Папян

ЕРЕВАН-2017

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	
РОЛЬ ДИСРЕГУЛЯЦИИ ИНСУЛИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И НЕЙРОНАЛЬНОЙ НАДФ-ОКСИДАЗЫ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ДЕМЕНЦИЙ И МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПИИ ДИАБЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА	10
1.1. Инсулиновый сигнальный путь и молекулярные механизмы инсулинорезистентности	10
1.2. Дисрегуляция инсулиновой сигнализации и деменции Альцгеймерского типа....	15
1.3. Диетическая фруктоза, инсулиновая резистентность и память.....	21
1.4. Роль нейрональной НАДФ-оксидазы в прогрессировании и предотвращении нейродегенераций (в частности, деменций)	25
1.5. Фитотерапевтические эффекты Стевии (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni).....	32
1.6. Центральные и периферические терапевтические мишени и механизмы Глибенкламида	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
3.1. Оценка активности нейронов гиппокампа в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	46
3.2. Оценка активности нейронов амигдалы в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	51
3.3. Электрофизиологическое исследование воздействия Глибенкламида на активность нейронов гиппокампа крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	59
3.4. Электрофизиологическое исследование воздействия Глибенкламида на активность нейронов амигдалы крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	62

3.5. Электрофизиологическое исследование динамики воздействия однократной дозы Глибенкламида на активность нейронов гиппокампа и амигдалы крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	66
3.6. Натуральный подсластитель <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni – потенциальный модулятор активности нейронов гиппокампа и амигдалы.....	70
3.7. Исследование динамики системного (в/м) воздействия Стевиозида на показатели биоэлектрической активности нейронов гиппокампа и амигдалы.....	75
3.8. Воздействие Стевии на синаптическую пластичность гиппокампа в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой	78
3.9. Воздействие Стевии на синаптическую пластичность амигдалы в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	85
3.10. Оценка антиоксидантной активности Стевии в тканях печени, легких, селезенки и эритроцитарных мембранах/ экзосомах в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.....	93
3.11. Воздействие Стевии на активность НАДФ-оксидазы гиппокампа и амигдалы в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Согласно оценкам ВОЗ в настоящее время отмечается острый подъем частоты заболеваемости диабетом второго типа и ожирением вследствие пищевых привычек и снижения физической активности. Клинические данные подкрепляют озабоченность и настороженность относительно интенсивного потребления напитков на основе фруктозы (в связи с ее общедоступностью в пищевой индустрии) [Nolan C. et al., 2011]. Системный обзор и метаанализ экспериментальных данных также подтверждает, что интенсивное потребление напитков, богатых фруктозой индуцирует у крыс фенотип метаболического синдрома [Toop C., Gentili Sh., 2016; Lozano I. et al., 2016].

Существенной проблемой здравоохранения стали метаболические синдромы, ассоциированные с гипергликемией в результате снижения чувствительности к инсулину в периферических тканях и нарушенной эффективностью использования глюкозы [Nolan C. et al., 2011]. Фруктоза – ранее признанная как благотворный диетический компонент, не стимулирующий выделение инсулина – в настоящее время рассматривается в качестве неблагоприятного диетического компонента. Фруктоза является высоколипогенным сахаром, который в печени имеет значительные метаболические эффекты и оказывает ряд отрицательных последствий на здоровье людей и экспериментальных животных, включая ожирение, гипертриглицеридемию, гиперинсулинемию, нарушение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность, ускоренное старение и т.д. [Bray G., 2008; Stanhope K., et al., 2009; Reddy S., et al., 2008; Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh. 2016]. Потребление фруктозы ассоциировано с метаболическим синдромом и с повышением риска диабета второго типа [Elliott, et al., 2002; Le K., Tappy L., 2006], и экспериментальной моделью для имитации человеческих симптомов метаболического синдрома являются крысы на диете, обогащенной фруктозой (диетическая фруктоза 10%, 20%, 60% вес/объем) [Elliott, et al., 2002; Tran, et al., 2009; Islam et al., 2012; Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh. 2016].

Головной мозг наделен механизмами восприятия уровня глюкозы [Verberne A., et al., 2014]. Циркулирующая глюкоза может быть определяющей в модулировании когнитивных процессов [Mainardi M., et al., 2015], поскольку уровень внеклеточной

глюкозы в головном мозге претерпевает изменения при нейрональной активности [Manning C., et al., 2009], и диабет может содействовать прогрессированию нейродегенеративных и нейропсихиатрических нарушений [Ghasemi R., et al., 2013]. На животных моделях диабета первого и второго типа поведенческими и электрофизиологическими изучениями доказаны когнитивные нарушения, дефективная долговременная потенция и депрессия гиппокампа (формы синаптической пластичности, выступающие в качестве основ обучения и памяти), патологическая синаптическая функция и нарушенная экспрессия глутаматных рецепторов [Biessels, et al., 2002; Trudeau F., et al., 2004; Mainardi M., et al., 2015].

Модулируемая фруктозой НАДФ-оксидазная активность поджелудочной железы является хорошо изученной частью регуляторного механизма секреции инсулина (индукция инсулиновой резистентности, повышение маркеров оксидативного стресса) [Román C., et al., 2014]. Оксидативный стресс – первичный механизм, связывающий ожирение с метаболическими нарушениями, и коррективка антиоксидантного статуса лабораторных грызунов в значительной степени предопределяет развитие инсулиновой резистентности и диабета [Styskal J., et al., 2012]. Антиоксидантная терапия предотвращает развитие индуцированных фруктозой плюриметаболических изменений в адипоцитах [Fariña J., et al., 2013], в печени грызунов и человека [Castro M., et al., 2012; 2013; Lozano I. et al., 2016], а также в нервной системе [Dekker M., et al., 2010; Su, et al., 2010].

НАДФ-оксидаза – известный источник активных форм кислорода (ROS) в ЦНС, однако брошен вызов традиционным взглядам об исключительно разрушительной роли мозгового ROS и показано, что таковые функционируют как мессенджерные молекулы каскадов сигнальной трансдукции физиологических процессов в гиппокампе (ROS может быть необходимой для гиппокампальной долговременной потенции), и контролирование биохимии ROS необходимо для поддержания и сохранения специфических клеточных популяций головного мозга [Dickinson B., et al., 2011]. Доказано, что дисрегуляция редокс баланса ведет к повреждению ДНК, липидной пероксидации, абберрантной пост-трансляционной модификации протеинов, изменению локализации протеинов и везикул в телах, дендритах и аксонах нейронов [Wilson,

González-Billault, 2015]. Весьма немногочисленны изучения по осмыслению роли и механизмов влияния оксидативной модуляции на ионные каналы (K^+ и Ca^{2+} каналы), как мишеные протеины, задействованные в прогрессировании нейродегенеративных заболеваний ЦНС [Peers Ch., et al., 2014].

Установление связи между нейрональной активностью и НАДФ-оксидазной активностью клеточных мембран ЦНС (попытка которого предпринята в данной работе) поможет доказать возможность эффективного регулирования таковых путем многоцелевой терапии. В современных исследованиях дискутируется потенциал специфических изоформ НАДФ-оксидаз и недостатки наиболее известных ингибиторов таковых [Cifuentes-Pagano E., et al., 2014]. Отсутствие специфических ингибиторов ограничивает терапевтические стратегии ЦНС, поскольку часто приводит к ложным выводам [Nayernia Z., et al., 2014]. Среди современных доступных ингибиторов НАДФ-оксидазы натурального происхождения наибольшего внимания заслуживают полифенолы [Tullia M., et al., 2013].

Для лечения легких форм диабета наиболее часто применяется *Stevia rebaudiana* в качестве как антигликемического адаптогенного лекарственного растения, так и натурального подсластителя с нулевой калорийностью [Chatsudthipong V., Muanprasat C. 2009]. Стевиогликозиды из листьев *Stevia rebaudiana* не только уменьшают экспрессию генов глюконеогенеза в печени [Chen T.H., et al., 2005], повышают секрецию и утилизацию инсулина, чувствительность клеток организма к действию инсулина на экспериментальной мышинной модели инсулинорезистентности, вызванной фруктозой [Chang J.C., et al., 2005], но и понижают уровень оксидативного стресса печени [Shivanna N., et al., 2012]. Антиоксидантная мощность листьев *Stevia rebaudiana* обусловлена в основном полифенолами [Hajhashemi, Ehsanpour, 2014]. Ключевым преимуществом фенолсодержащих растительных антиоксидантов выступает повышенная антирадикальная способность по отношению к широкому спектру радикалов. Химически диверсифицированный диапазон компонентов, содержащих разнообразные кольцевые структуры (фенолы, флавоноиды и т.п.) с многообразными цепями и местами полимеризации способствует повышению антиоксидантной способности и другим

эффектам на энзиматические системы организма [Gawel-Beben, et al. 2015]. Противовоспалительные эффекты Стевии (необходимые для предотвращения инсулиновой резистентности) осуществляются путем индуцирования систем сигнальной трансдукции и энзимов [Wang Z., et al., 2012; Mohd-Radzmanetal., 2013]. Показаны эффекты восстановления памяти (тест водного лабиринта Мориса) при использовании экстракта Стевии и Стевиозида при скополамин-индуцированном дефиците памяти [Divya S., et al., 2010; Sharma D., et al., 2010].

В клинической практике лечения сахарного диабета второго типа наиболее подходящим считается Глибенкламид, стимулирующий высвобождение инсулина путем блокирования панкреатических K_{ATP} -чувствительных каналов. За последнее десятилетие, Глибенкламид оказался в центре внимания в связи с его плеiotропными защитными эффектами с участием рецептора сульфонилмочевины SUR1 в острых патологических состояниях ЦНС, открывая новые возможности его использования [Kurland D., et al., 2013].

Для выявления механизмов синаптической пластичности востребованы исследования, основанные на системном электрофизиологическом подходе с использованием тетанической высокочастотной стимуляции (ВЧС), используемой для оценки состояния синаптического аппарата [Sweatt, 1999]. При ВЧС стремительный подъем внутриклеточной концентрации кальция триггирует непостоянную (быстроисчезающую) активацию некоторых энзимов, осуществляющих индукцию кратковременной потенциации/депрессии и ранней фазы долговременной потенциации/депрессии, механизмы которых остаются не изученными в условиях дисметаболизма глюкозы и инсулина и терапии таковых.

Цель и задачи.

Целью данного изучения явилось электрофизиологическое и биохимическое исследование гиппокампа и амигдалы при индуцированных фруктозой метаболических нарушениях у крыс, а также протекторной эффективности Глибенкламида и Армянской гидропонической *Stevia rebaudiana* при данной патологии.

В задачи исследования входят:

- In vivo экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры, а также нейронов латеральной амигдалы при ВЧС гиппокампа у крыс с фруктозо-обогащенной диетой.
- Оценка воздействия Стевии на параметры синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы у интактных животных.
- Оценка протекторной эффективности Глибенкламида в in vivo экстраклеточных исследованиях ВЧС-вызванной спайковой активности нейронов гиппокампа и латеральной амигдалы у крыс с фруктозо-обогащенной диетой.
- Оценка параметров синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы в динамике системного (в/м) воздействия Глибенкламида.
- Оценка протекторной эффективности *Stevia rebaudiana* в in vivo экстраклеточных исследованиях ВЧС-вызванной спайковой активности нейронов гиппокампа и латеральной амигдалы у крыс с фруктозо-обогащенной диетой.
- Оценка параметров синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы в динамике системного (в/м) воздействия Стевиозида – фармакологически активного компонента *Stevia rebaudiana*.
- Оценка антиоксидантного воздействия *Stevia rebaudiana* на НАДФ-оксидазную активность гиппокампа, амигдалы и другие ненейрональные ткани в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.

Научная новизна. В данном исследовании предусматривалось выявление характерных особенностей метаболических воздействий диетической фруктозы на синаптическую пластичность нейронов гиппокампа и латеральной амигдалы и состояние НАДФ-оксидазной оксидантной системы указанных формаций головного мозга, а также перспектив разработки многомишенных и полифункциональных фитопрепаратов (с адаптогенной, антиоксидантной, антидиабетической, ноотропной активностью) из отечественного сырья *Stevia rebaudiana*. Свойство энзима НАДФ-оксидаза выступать

обоюдоострым мечом создает запутанность для терапевтического нацеливания [Cifuentes-Pagano E., et al., 2014], поэтому оценка в данном изучении тканевой локализации, степени про- и антиоксидантной активности НАДФ-оксидаз в условиях дисметаболизма глюкозы и инсулина сможет способствовать проникновению в суть механизмов действия и регуляции этих энзимов, что возможно, послужит основой для совершенствования целевых лекарственных пищевых продуктов. Получены новые данные в фундаментальных аспектах синаптической пластичности, указывающие на возможность модулирования синаптического аппарата сетей энторинальная кора-гиппокамп-амигдала путем Армянской Стевии как самостоятельно, так и при диабетическом стрессе. Впервые получены данные о состоянии НАДФ-оксидазы головного мозга и периферических тканей, указывающие на высокую антиоксидантную активность Армянской Стевии. Фундаментально аргументированная интерпретация связи модулированной нейрональной синаптической активности и НАДФ-оксидазной активности в структурах мозга, ответственных за обучение и память – новая теоретическая база эффективности Армянской Стевии для предотвращения вредоносных эффектов интенсивного потребления диетической фруктозы. Выявлены электрофизиологические показатели идентичной направленности действия Стевиозида и Глибенкламида в ЦНС.

Научно-практическое значение. Выявление коррелятов аномальной когнитивной функции при диабете второго типа, ассоциированного с вредоносными факторами пищевой индустрии (в частности общедоступные напитки на основе фруктозных сиропов) и фундаментальное обоснование превентивной и терапевтической эффективности отечественного лекарственного растения имеют не только научное медико-биологическое значение, но и в социально-экономическом аспекте обосновывают целесообразность внедрения Армянской Стевии в качестве диетического пищевого продукта с целью улучшения качества жизни населения.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

РОЛЬ ДИСРЕГУЛЯЦИИ ИНСУЛИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И НЕЙРОНАЛЬНОЙ НАДФ-ОКСИДАЗЫ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ДЕМЕНЦИЙ И МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПИИ ДИАБЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА

1.1. Инсулиновый сигнальный путь и молекулярные механизмы инсулиновой резистентности

Белок рецептора инсулина был описан как гетеротетрамер двух одинаковых внеклеточных α -субъединиц и двух трансмембранных β -субъединиц, которые охватывают клеточную мембрану [Lawrence M. C., et al., 2007]. α -цепь лежит во внеклеточной части клеточной мембраны, в то время как β -цепь охватывает клеточную мембрану в одном трансмембранном сегменте с его частями, лежащими во внутриклеточной мембране, и все они удерживаются вместе дисульфидными связями. Этот рецептор инсулина, представляющий собой тирозинкиназу, имеет две различные области связывания лиганда: сайт с высоким сродством и сайт с низким сродством [Belfiore A., et al., 2009]. Физиологически инсулин запускает рецептор инсулина, оказывая свои эффекты, ведущие к фосфорилированию белков субстрата инсулинового рецептора [Guo H., et al., 2008]. Эти специфические клеточные рецепторы встроены в клеточную мембрану жировой, нервной, мышечной ткани. Затем связывание ведет к активации вторичных мессенджеров, выступающих в качестве внутриклеточных медиаторов, инициирующих и стимулирующих каскад активации фосфорилирования и дефосфорилирования, которые отвечают за ряд путей и метаболических механизмов, включая транспорт глюкозы. Первый шаг в каскаде включает активацию тирозинкиназы путем аутофосфорилирования β -субъединицы, через самодобавление фосфатных групп во внутриклеточном домене рецептора. Это вызывает конформационные изменения в рецепторе, что также способствует другим связываниям АТФ и облегчению сбора субстратов для последующих актов фосфорилирования. Фосфорилирование субстрата 1 рецептора инсулина (IRS1) вместе с другими внутриклеточными субстратами следует позже, посредством действия активированной тирозинкиназы. Как правило, каждый из

этих фосфорилированных субстратов обеспечивает уникальные сайты стыковки для конкретных эффекторных белков с Src гомологичным доменом 2 (SH2), который распознает эти остатки с высокой специфичностью и в этом случае домен SH2 фосфоинозитид-3-киназы (PI3-K) специфически распознает остаток фосфотирозина IRS1 и впоследствии связывается с ним, передавая сигнал вниз следующей ступени в сигнальном пути. С точки зрения передачи сигнала из одного компартмента в другой киназы являются важными компонентами сигнальных путей и фосфорилирования. В этом механизме сигнал соответствует уровню глюкозы в крови и передается из внеклеточной среды во внутриклеточную. После процесса связывания активируется фермент, тем самым запуская пути PI3-K, позднее приводящие к фосфорилированию фосфатидилинозитол-(4,5)-бифосфата (PIP₂) в фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат (PIP₃). Выработка PIP₃ активирует множество специфических белков, ферментов, субстратов и молекул: сюда входят фосфоинозитид-зависимая киназа 1, которая инициирует ряд последующих белков, включая протеинкиназу B (PKB) или Akt. Akt играет важную и главную роль в инсулин-стимулированном усвоении глюкозы, как основной мишени в активности PI3-K, связывая прямую передачу инсулиновых сигналов с транслокацией переносчика глюкозы 4 (GLUT4) [Ismail W. I., et al., 2009]. IRS-1 фосфорилируется больше не на своих тирозиновых, как в нормальном состоянии, вызванном высоким уровнем глюкозы в крови, а на сериновых остатках, в результате чего становится нефункциональным белком. TNF- α также влияет на увеличение генных проявлений и уменьшает экспрессию PPAR γ и GLUT4, приводя к снижению уровня белков GLUT4, в отличие от нормального состояния, когда связывание инсулина и каскады фосфорилирования связей АТФ в конечном счете приводят к миграции GLUT4 из цитоплазмы в клеточную мембрану для поглощения внеклеточной глюкозы (Рис. 1). В условиях инсулинорезистентности захват глюкозы понижается, что приводит к гипергликемии и гиперинсулинемии. Формирование фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфата посредством PI3K приводит к фосфорилированию p47(phox) структурной субъединицы нейрональной Nox2. Цитозольные субъединицы перемещаются к клеточной мембране и сливаются с gp91(phox). Nox2 транспортирует электроны к кислороду, продуцируя супероксид анион

($O_2^{\cdot -}$) – прекурсор ROS (Рис. 1).

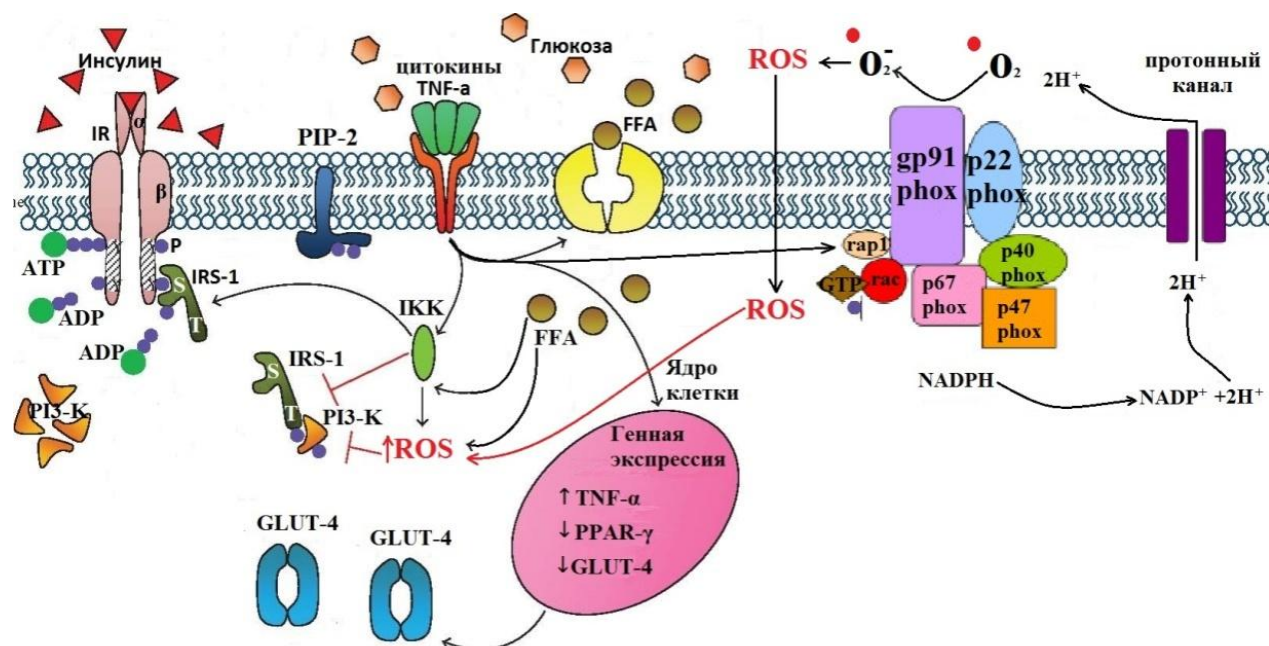


Рисунок 1. Структурированные механизмы нарушений в инсулиновом сигнальном пути в состоянии инсулинорезистентности, вызванном повышенным действием $TNF-\alpha$ и FFA. Обозначения: IR: рецептор инсулина; T: тирозин; S: серин; ATP: аденозинтрифосфат; ADP: аденозиндифосфат; IRS-1: субстрат инсулинового рецептора 1; PI3K: фосфоинозитидкиназа3; PIP2: фосфатидилинозитол4,5-бифосфат; $TNF-\alpha$: фактор некроза опухоли α ; FFA: свободная жирная кислота; IKK: тип серин-киназ; ROS: реактивные формы кислорода; PPAR γ : пероксисомный пролифератор-активатор рецептор γ ; GLUT4: переносчик глюкозы 4.

Инсулинорезистентность является ключевым фактором в таких метаболических нарушениях, как гипергликемия и гиперинсулинемия, которые активируются при ожирении и впоследствии могут привести к сахарному диабету второго типа. В обзоре Mohd-Radzman и соавторы [Mohd-Radzman N.H., et al., 2013] обсуждаются механизмы развития инсулинорезистентности, в которых ответственными участниками выступают свободные жирные кислоты, адипоцитокнины $TNF-\alpha$ и PPAR γ , а также сериновые киназы JNK и IKK β . Многие исследователи считают, что сахарный диабет второго типа преимущественно вызван нарушением сигнального пути инсулина. Инсулинорезистентность тесно связана с пониженной метаболической чувствительностью к нормальной циркуляции инсулина, включает аномальную биологическую реакцию систем организма с учетом физиологических уровней инсулина,

и данная патологическая особенность этого заболевания является основой метаболического синдрома. Несмотря на утверждения, что сахарный диабет второго типа индуцируется генетически, тем не менее, его основой является инсулинорезистентность, которая может обостряться изменениями образа жизни и нездоровой пищей [Goodrich K., et al., 2012]. Сахарный диабет второго типа также называют связанной с ожирением инсулинорезистентностью. Теоретически инсулинорезистентность определяется как состояние в клетке/ ткани/ системе или организме, при котором уровни инсулина, необходимые для получения количественно нормальной реакции выше обычных. Инсулин-опосредованная утилизация глюкозы существенно ухудшается при диабете, так как уровни глюкозы являются основным сигналом обратной связи для компенсаторной гиперинсулинемии [Perezand M., et al., 2011].

Начиная с прорыва в исследовании инсулинорезистентности (в частности, его молекулярного механизма) продолжаются работы, главным образом, в отношении жирных кислот, адипоцитокинов подобно фактору некроза опухоли ($\text{TNF-}\alpha$), рецепторов-активаторов пролиферации пероксисом γ ($\text{PPAR-}\gamma$) и серинкиназ, таких как c-JunNH₂ – концевые киназы (JNK) и ингибитора ядерного фактора $\kappa\text{B-kinase}\beta$ ($\text{IKK}\beta$).

Свободные жирные кислоты. Инсулинорезистентность в тканях остается сложной и трудно определяемой, но исследователи обнаружили, что она может быть спровоцирована посредством таких факторов, как свободные жирные кислоты. Накопление жира было тесно связано с повышенной выработкой глюкозы и инсулинорезистентностью и, следовательно, с повышенной предрасположенностью к диабету второго типа [Gastaldelli A. 2011]. Кроме того, было также выявлено, что свободные жирные кислоты индуцируют инсулинорезистентность посредством первоначального прерывания процесса фосфорилирования в инсулиновом сигнальном пути и, следовательно, уменьшают окисление глюкозы и синтез гликогена. Уменьшение окисления глюкозы и синтеза гликогена увеличивают окисление свободных жирных кислот, что приводит к увеличению и накоплению глюкозо-6-фосфата, ингибирующего действие гексокиназы на пути гликогенового синтеза [цит. по обзору Mohd-Radzman N., et al., 2013]. Такие ингибирующие эффекты вызывают повышение уровня глюкозы в

клетках, вызывая остановку поглощения глюкозы; таким образом, уровни глюкозы в кровотоке также будут подниматься. Это в конечном счете в результате длительного воздействия приведет к инсулинорезистентности и диабету. Аналогичные наблюдения были зафиксированы, когда увеличение окисления FFA приводило к увеличению уровней активных форм кислорода (ROS), что может привести к увеличению накопления жира [Styskal J., et al., 2012]. Это полностью поддерживает теорию о том, что проокислительная среда, приводящая к метаболическим расстройствам, таким как инсулинорезистентность, возможно, находится под сильным влиянием неспособности клеток для борьбы с окислительным стрессом. И JNK, и TNF α играют важную роль в прогрессировании инсулинорезистентности [Houstis N., et al., 2006].

Фактор некроза опухоли α (TNF- α). Функциональность роли адипоцита в качестве эндокринной клетки, секретирующей биологически активные ферменты и белки, такие как адипокины, возрастает в результате их увеличения при ожирении. Примером таких адипокинов является TNF- α , который играет важную роль в воспалительных реакциях в клетке. TNF- α является многофункциональным провоспалительным цитокином, который экспрессируется как 26-кДа-трансмембранный прогормон и формирует 17-кДа-растворимую форму молекулы TNF- α при протеолитическом распаде. Он также выполняет бесчисленное множество биологических функций в клетке. В последнее время TNF- α был в центре внимания конкретных областей исследований, цель которых заключалась в разгадке его физиологических и патофизиологических функций, которые включают регуляцию транскрипции, метаболизм жирных кислот, связь гормон-рецептор, метаболизм глюкозы, а также дифференциацию адипоцитов. Многие современные исследования пришли к выводу, что действия и вклад TNF- α в систему подразумевают метаболические нарушения, такие как ожирение и инсулинорезистентность. TNF- α часто встречается в жировой ткани, а уровни его мРНК тесно связаны с преобладанием гиперинсулинемии и ожирения. В качестве провоспалительного цитокина TNF- α отвечает за развитие метаболических синдромов и поддержание метаболического гомеостаза, оказывая свои действия через иммунные и воспалительные пути [Hotamisligil G.S., et al., 2008]. TNF- α производит свои эффекты

посредством некоторых действий, направленных на чувствительность к инсулину, связь инсулина с рецептором, транспорт глюкозы, улучшение липидного обмена и выработки лептина [цит по обзору Mohd-Radzman N., et al., 2013]. TNF- α в состоянии непосредственно вызвать даун-регуляцию GLUT4 (на основе значительно пониженных уровней мРНК GLUT4, зарегистрированных после лечения TNF- α). Соотношение между IRS1 и PI3-K в последующих событиях передачи сигналов инсулина также снижается из-за модификации этой IRS1. Еще одним доказательством является увеличение инсулин-сигнальной активности и продуктивности за счет эффективной генетической и фармакологической блокады действия TNF- α , наблюдаемое *in vivo* на крысах [цит. по обзору Mohd-Radzman N., et al., 2013].

Сериновые киназы. Guo и соавторы [Guo H., et al., 2008] объясняют, что ингибирующее воздействие как ROS, так и TNF- α на чувствительность к инсулину, может включать в себе несколько серин/треонин-киназных каскадов, предполагающих в качестве основных кандидатов вовлечение JNK и IKK β . Из-за результатов, связывающих инсулинорезистентность с диабетом, многие исследователи сфокусированы на различных молекулярных механизмах в прогрессировании обоих метаболических состояний, что подчеркивает важность понимания метаболического синдрома. Кроме того, адипоцитокнины подобные TNF- α , серинкиназы и свободные жирные кислоты являются одними из многих факторов и каналов, которые могут способствовать инсулинорезистентности, сахарному диабету второго типа, БА (схема 1).

1.2. Дисрегуляция инсулиновой сигнализации и деменции Альцгеймерского типа

В настоящее время имеются весоные доказательства физиологической роли инсулина в ЦНС. Головной мозг - мишень для неметаболической функции инсулина, и рецепторы инсулина широко распространены в периферической и центральной нервной системах [Belfiore A., et al., 2009]. В головном мозге крыс была обнаружена высокая концентрация инсулина, не зависящая от уровня периферического инсулина [Navrankova J., et al., 1979]. Показано, что вырабатываемый поджелудочной железой инсулин может проходить через ГЭБ и достигать до головного мозга и цереброспинальной жидкости путем системы насыщаемых транспортеров, функция которых обусловлена региональной

дифференцированностью проницаемости инсулина через ГЭБ [Banks W.A., et al., 1998] и может быть регулирована такими факторами, как глюкокортикоиды, голодание, ожирение, спячка. Некоторые другие изучения также аргументировали возможность локального продуцирования инсулина в ЦНС, основанные на обнаружении инсулина и проинсулина в нейронах и в mRNA некоторых регионов мозга [Devaskar S.U., et al., 1993]. Широкое распространение рецепторов инсулина показано [Havrankova J., et al., 1978] в мозге крыс, а в последствии была показана наивысшая их плотность в обонятельной луковице, коре, гиппокампе, амигдале, мозжечке [Schulinkamp R., et al., 2000; Duarte A.I., et al., 2012], и они имели схожие с периферическими инсулиновыми рецепторами фармакологические и кинетические свойства. Изобилие рецепторов инсулина в лимбической системе, включая гиппокамп и амигдалу, областях с реципрокными связями и коммуникациями, предполагает их роль в эмоциях и обучаемости и памяти [Wickelgren I., 1998]. Так, у грызунов, диетой-индуцированная инсулиновая резистентность вызывает ослабление пространственной памяти [Ross A.P., et al., 2009] и снижение гиппокампальной синаптической пластичности [Stranahan A.M., et al., 2008]. Инсулин имеет также нейромодуляторную функцию и аффегирует электрофизиологические свойства нейронов [Kovacs P., et al., 2009], [Palovcik R.A., et al., 1984], рецепторы нейротрансмиттеров [Wan Q., et al., 1997] и проводимость ионных каналов [Fadool D., et al., 2000]. Известны также нейротрофические эффекты инсулина [Farrar C., et al., 2005] и показана нейропротективность относительно апоптоза [Ryu B.R., et al., 1999], оксидативного стресса [Duarte A.I., et al., 2005], А β токсичности [Rensink A.A., 2004]. Инсулин выступает также сигнальной молекулой в ЦНС, принимая участие в формировании памяти и нейродегенеративных заболеваниях. Рецепторы инсулина апрегулируют и претерпевают транслокации после обучения. Инсулин модулирует активность возбудительных и ингибиторных рецепторов, включая глутамат и ГАМК рецепторы и активирует вовлеченные в процесс памяти две биохимические пути: МАП протеинкиназный путь и PI3K / PKC путь [Nelson T.J., et al., 2005].

Инсулиновая резистентность и воспаление как связывающие звенья диабета и болезни Альцгеймера. Обозревается роль инсулина в нейропатологических расстройствах,

включая болезнь Альцгеймера (БА) [Ghasemi R., et al., 2013], отмечая в качестве ключевого аспекта взаимосвязь дисфункции инсулина, нейровоспаления и нейродегенерации. Диабет может ускорять дисфункцию памяти путем цереброваскулярного воспаления и накопления A β [Takeda S., et al., 2010]. Показано, что инсулиновая сигнализация и процесс воспаления участвуют в одних и тех же сигнальных путях и поэтому воспалительный ответ тесно ассоциирован с инсулиновой резистентностью в периферических и центральных тканях [Olefsky J., et al., 2010]. Поэтому взаимодействие между инсулиновой сигнализацией, воспалением и инсулиновой резистентностью может быть ассоциировано с диабетом как фактором риска БА и васкулярных деменций у пациентов с диабетом [Biessels G., et al., 2006]. На схеме 1 приводятся также некоторые другие механизмы, выступающие связывающими звеньями между дисрегуляцией инсулина и деменцией, в частности БА.

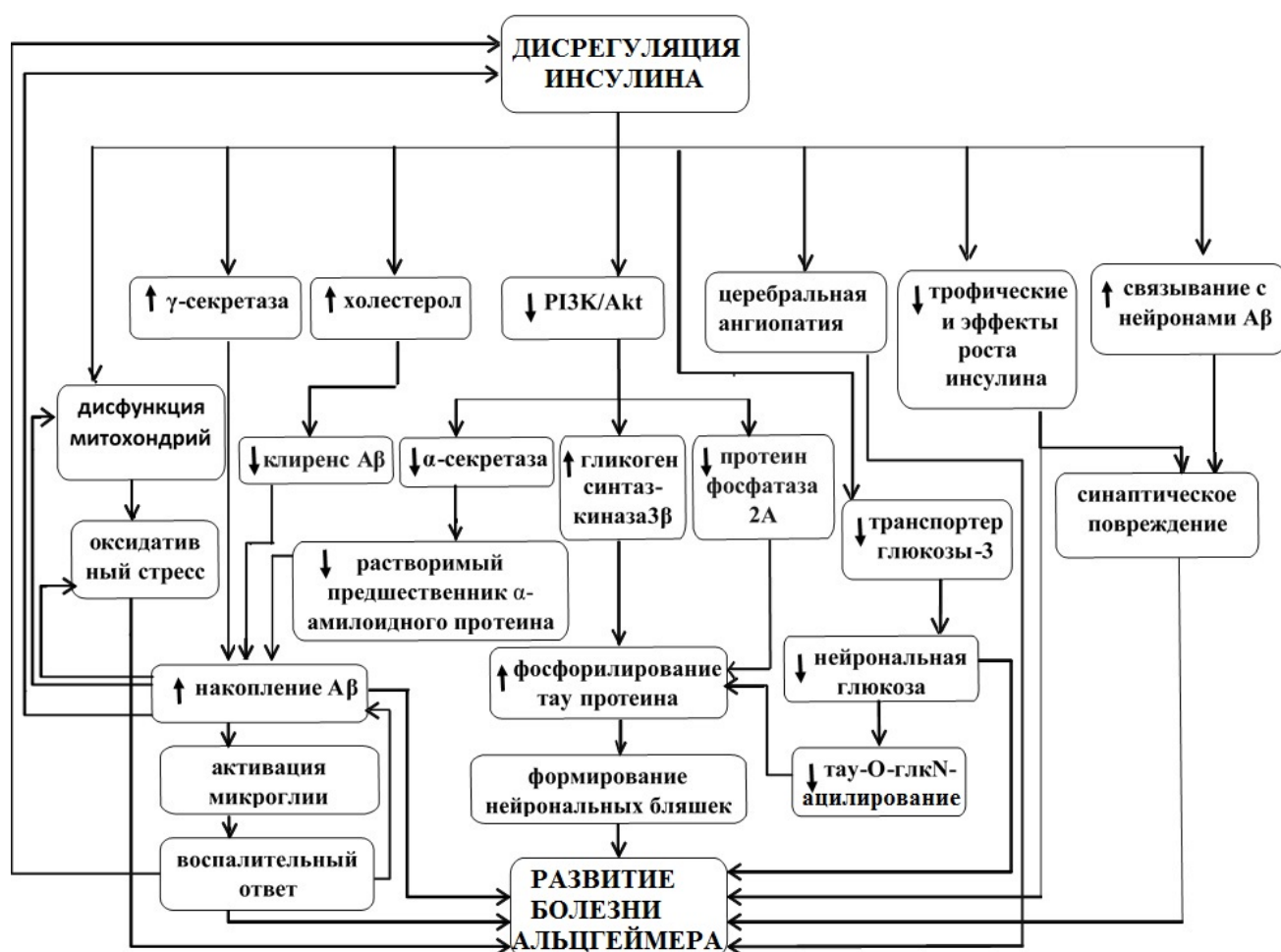


Схема 1. Пути развития болезни Альцгеймера при дисфункции сигнализации инсулина. A β -бета амилоидный пептид; PI3K-фосфатидилинозитол 3-киназа [по Ghasemi R., et al., 2013].

Одним из основных сигнальных путей инсулина выступает PI3K/Akt путь, который согласно множественным обоснованиям вовлечен в регуляцию воспалительной реакции [Ghasemi R., et al., 2013]. Так, показано, что активация указанного пути оказывает негативный эффект на продуцирование IL-12 нервными клетками. Гликогенсинтаз-киназа 3 (GSK-3), фосфорилирующая и инактивирующая гликоген-синтазу – низходящая мишень сигнального пути инсулина, и в то же время, ключевой игрок в патологии диабета, БА и воспалительной реакции [Ghasemi R., et al., 2013; Avila J., et al., 2010]. Инсулиновый сигнальный путь оказывает огромное регуляторное воздействие на GSK-3. Так, в норме PI3K/Akt сигнальный путь активирует фосфорилирование в рецепторах инсулина и ингибирует GSK-3 β . Другим путем, посредством которого GSK3 может участвовать в развитии инсулиновой резистентности, выступает изменчивый GSK-3 компонент пост-транскрипционной обработки инсулиновой сигнализации. Кроме того, GSK-3 вовлечен в нейровоспалительный ответ: активация астроцитов и микроглии зависит от активности GSK-3 β [Ghasemi R., et al., 2013]. Ингибция GSK-3 повышает выработку противовоспалительного цитокина IL-10 и снижает уровень таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 β , IL-6 в ответ на стимуляцию TLR (toll-like receptor) [HuX., et al., 2006]. Эти изучения очевидно доказывают ключевую роль PI3K/Akt/GSK-3 сигнального пути в модулировании воспаления и показывают, что ингибиторный эффект инсулиновой сигнализации на активность GSK-3 – путь модулирования инсулином воспалительных ответов. Воспалительный процесс является одним из основных триггеров ожирения, индуцированного инсулиновой резистентностью: показано, что фармакологическое или генетическое подавление воспалительных путей предотвращает диетой-индуцированную инсулиновую резистентность [Olefsky J.M., et al., 2010].

Интересно, что цитокин TNF- α редуцируя активность тирозинкиназ инсулиновых рецепторов, вызывает инсулиновую резистентность, а нейтрализация данного провоспалительного медиатора повышает инсулин-стимулированное аутофосфорилирование рецепторов инсулина. Воспалительные медиаторы индуцируют инсулиновую резистентность также через активацию супрессоров цитокиновых сигналов, которые в последующих этапах ингибируют IRS-1. Воспалительный процесс активирует

некоторые серин/треонинкиназы, такие как JNK (член семейства MAPK). Активация JNK воспалительными медиаторами вызывает стресс эндоплазматического ретикулула, фосфорилирование IRS-1 в серин-307 и нарушение инсулиновой сигнализации [цит. в обзоре Wellen K., et al., 2005]. Tu и соавторы [Tu Y. et al., 2011] показали, что новорожденные крысы с ожирением имели высокий уровень фосфорилированного JNK и были более восприимчивы к вызванной гипоксией-ишемией микроглиальной активации и нейровоспалению. Было показано, что индуцирование воспаления гипоталамуса путем интрацеребравентрикулярного введения TNF- α воспроизводит некоторые клинические проявления диабета второго типа, включая повышение уровня инсулина в плазме и аномальную инсулиновую сигнализацию в мышцах и в печени [Arruda A.P., et al., 2011]. Ряд исследований указывают на снижение чувствительности инсулиновых рецепторов при БА: редуцированная активность тирозинкиназы инсулиновых рецепторов и нарушенная трансдукция инсулиновой сигнализации при спорадической форме БА представляет инсулиновую резистентность и результирует в широкораспространенную апрегуляцию рецепторов инсулина головного мозга [Frolich L., et al., 1999].

С другой стороны, экспрессия инсулина и IGF-I, II на уровне протеинов и mRNA, а также их рецепторов и элементов нисходящей сигнализации понижена в мозге при БА. Поэтому, в дополнение к редуцированной экспрессии генов инсулина/ IGF и их рецепторов, центральная инсулиновая резистентность при БА описана как нейроэндокринное нарушение, которое было предложено Стин и соавторами [Steen E., et al., 2005] называть специфичным только для мозга «диабетом третьего типа». Невосприимчивость инсулиновых рецепторов и дефицит внутриклеточных сигнальных путей как при диабете второго типа, так и при БА мешает проявлению нейропротективного воздействия инсулина и повышает уязвимость мозга к нейродегенерации [Holscher C., et al., 2011].

Митохондриальная дисфункция и оксидативный стресс как связывающее звено между БА и диабетом. Нарушение равновесия между выработкой оксидативных молекул ROS и NOS и внутриклеточной антиоксидантной защитой вызывает оксидативный стресс – феномен, играющий важную роль в развитии БА и диабета и предоставляющий общие характерные

признаки между БА и диабетом [Reddy V., et al., 2009]. Митохондрии – основные генераторы оксидативных молекул, и также могут стать прямыми мишенями ROS и NOS. Показано, что мозговая митохондриальная дисфункция выступает связующим звеном между БА и диабетом [обозревается в Moreira P., et al., 2006]. Индуцированная диабетом дисфункция митохондриальной антиоксидантной защиты повышает уязвимость мозга к токсическому амилоиду Аβ, и инсулин превентивует спад митохондриального оксидативного фосфорилирования и повышение уровня оксидативного стресса и поэтому защищает митохондрии от токсического Аβ [Moreira P., et al., 2005]. Подразумевается, что митохондриальная дисфункция, имеющая место при отсутствии инсулиновой сигнализации, обостряет старение и токсичность Аβ.

Дефективный метаболизм энергии и глюкозы, а также холестерол, как связывающие звенья между БА и диабетом. Другим отклонением от нормы, общим для БА и диабета является дефективный метаболизм энергии и глюкозы. Снижение утилизации мозговой глюкозы и кислорода отмечено также в мозге недиабетических пациентов с БА, а нарушенная инсулиновая сигнализация стимулирует утилизацию глюкозы [Ghasemi R., et al., 2013]. Как и инсулин, холестерол играет важную метаболическую роль в периферических и центральных тканях. Диабет второго типа часто имеет место в контексте аномалии плазменных липопротеинов и холестерола. Было показано, что гомеостаз холестерола играет регуляторную роль в функционировании β-клеток поджелудочной железы [Brunham L.R., et al., 2008], и поэтому имеется замкнутая взаимосвязь между диабетом второго типа и гиперхолестеролемией. Холестерол модулирует синтез Аβ, ингибирует расщипку Аβ, контролирует взаимодействие Аβ с нейрональной мембраной, которое рассматривается как начальное событие в синаптической дисфункции и нейрональной токсичности [Eckert G., et al., 2003]. Метабоизм холестерола стареющего мозга предоставляет еще одно доказательство связи патогенеза диабета и БА: оксистерол (окисленный холестерол) повреждает инсулиновый сигнальный путь ингибированием фосфорилирования ERK/Akt пути [Eckert G., et al., 2003].

1.3. Диетическая фруктоза, инсулиновая резистентность и память

Фруктоза является легко-жирообразующим сахаром, который оказывает глубокие метаболические воздействия на печень и ассоциируется со многими из компонентов метаболического синдрома (в частности, с инсулинорезистентностью) [Bray G.A., et al., 2008; Lozano I. et al., 2016; Dekker M.J., et al., 2010]. Потребление фруктозы может быть ассоциировано с повышением риска диабета второго типа через различные биологические механизмы [Montonen J., et al., 2010]. Фруктоза является шестиуглеродным кетосахаром и ее метаболизм отличается от метаболизма глюкозы. Диетическая фруктоза всасывается в кишечнике насыщением, стимулированием транспортера глюкозы (GLUT5) [Rao S.S., et al., 2007]. В гепатоцитах фруктоза быстро фосфорилируется в фруктозо-1-фосфат (в реакции катализируемой фруктокиназой). Следующий шаг метаболизма фруктозы результирует глицеральдегид, дигидроксиацетон-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат. В этой точке метаболизм глюкозы и фруктозы сливаются. Однако метаболиты фруктозы, достигающие этой стадии без прохождения лимитирующей скоростью стадии фосфофруктокиназы, эффективно избегают регулирующее действие инсулина. Предположено, что именно это отсутствие регулирования вызывает различия фруктозного питания от глюкозного. [Havel P., et al., 2009]. Темпы поглощения печенью фруктозы из портальной циркуляции выше, чем скорость усвоения глюкозы, и потому фруктозный метаболизм обходит фосфофруктокиназу, и фруктозный метаболизм не находится под регулирующим контролем инсулина [Vos M., et al., 2009]. Первоначально считалось, что фруктоза может быть безопасной альтернативой диетической сахарозы для индивидуумов с диабетом второго типа, главным образом потому, что метаболизм фруктозы не зависит от инсулина [Cohen A., et al., 1977].

Реакция Майяра (реакция сахароаминной конденсации) представляет собой процесс, в котором восстанавливающиеся сахара спонтанно реагируют с аминокгруппами протеинов превращаясь в конечные продукты гликации (AGEs). Повышенный уровень глюкозы играет главную роль в реакции Майяра, однако на молекулярном уровне, глюкоза является одним из наименее химически активных углеводов биологических систем. Формирование конечных продуктов гликации в настоящее время также известно как

результат действия других, отличных от глюкозы метаболитов, которые в основном расположены внутриклеточно и участвуют в реакции неферментативного гликирования в гораздо большей степени, таких как фруктоза, триозы и дикарбонильные соединения. В обзоре Каспер и соавторы [Casper G. et al., 2004] рассматривается потенциальная роль фруктозы и ее метаболитов в реакциях гликирования (Схема 2). Существуют два источника фруктозы: экзогенное питание из рациона и эндогенное образование из глюкозы через альдозоредуктазный путь. Вопреки восьмикратно высокой реактивности вклад экстрацеллюлярной гликации с участием фруктозы значительно меньше по сравнению с таковым с участием глюкозы, поскольку концентрация фруктозы в плазме низкая (5 ммоль/л глюкозы и 35 мкмоль/л фруктозы). Внутриклеточно фруктоза повышается в некоторых тканях больных сахарным диабетом, у которых активен метаболизм пути полиола (polyol pathway). В клетках этих тканей концентрации фруктозы и глюкозы имеют одинаковую величину. Хотя прямых доказательств пока не существует, вполне вероятно, что высокая реакционная способность фруктозы и ее метаболитов может вносить существенный вклад в формирование AGEs и может способствовать изменениям клеточных белков, дисфункции клеток и, как следствие, вызывать нейродегенерацию и сосудистые осложнения.

В отличие от нормального приема относительно низкого количества фруктозы, длительное придерживание диеты с высоким содержанием фруктозы оказывают неблагоприятное воздействие на определенные аспекты здоровья [Nolan C. et al., 2011]. Диеты с высоким содержанием фруктозы, как и калорийность питания влияют на тканеспецифичное накопление AGEs [Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh. 2016]. Фруктозо-3-фосфат и сорбит-3-фосфат являются новыми метаболитами, которые были показаны как ассоциированные с метаболизмом полиола в экспериментах на животных. Фруктозо- 3-фосфат представляет особый интерес в связи с его мощной способностью гликации по сравнению с другими гликолитическими промежуточными соединениями, например, такими как фруктоза. Очень низкие внеклеточные концентрации фруктозы поднимают вопрос о реальной роли фруктозы в качестве промежуточного продукта при образовании AGEs в физиологических условиях. В связи с возросшим употреблением

фруктозы в качестве диетического подсластителя, необходимо контролировать эффект длительного потребления фруктозы на концентрацию тканевой фруктозы и образование AGEs. Из-за высокой активности фруктокиназы в печени, можно ожидать, что увеличение потребления фруктозы в незначительной степени приведет к повышению уровней фруктозы в плазме [Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh. 2016]. Не только сама фруктоза имеет важное значение в реакции Майяра, но и необходимо учитывать роль фруктозо-1-фосфата и D-глицеральдегида, как производных фруктокиназы. D-глицеральдегид является особенно мощным индуктором реакции Майяра (Схема 2).

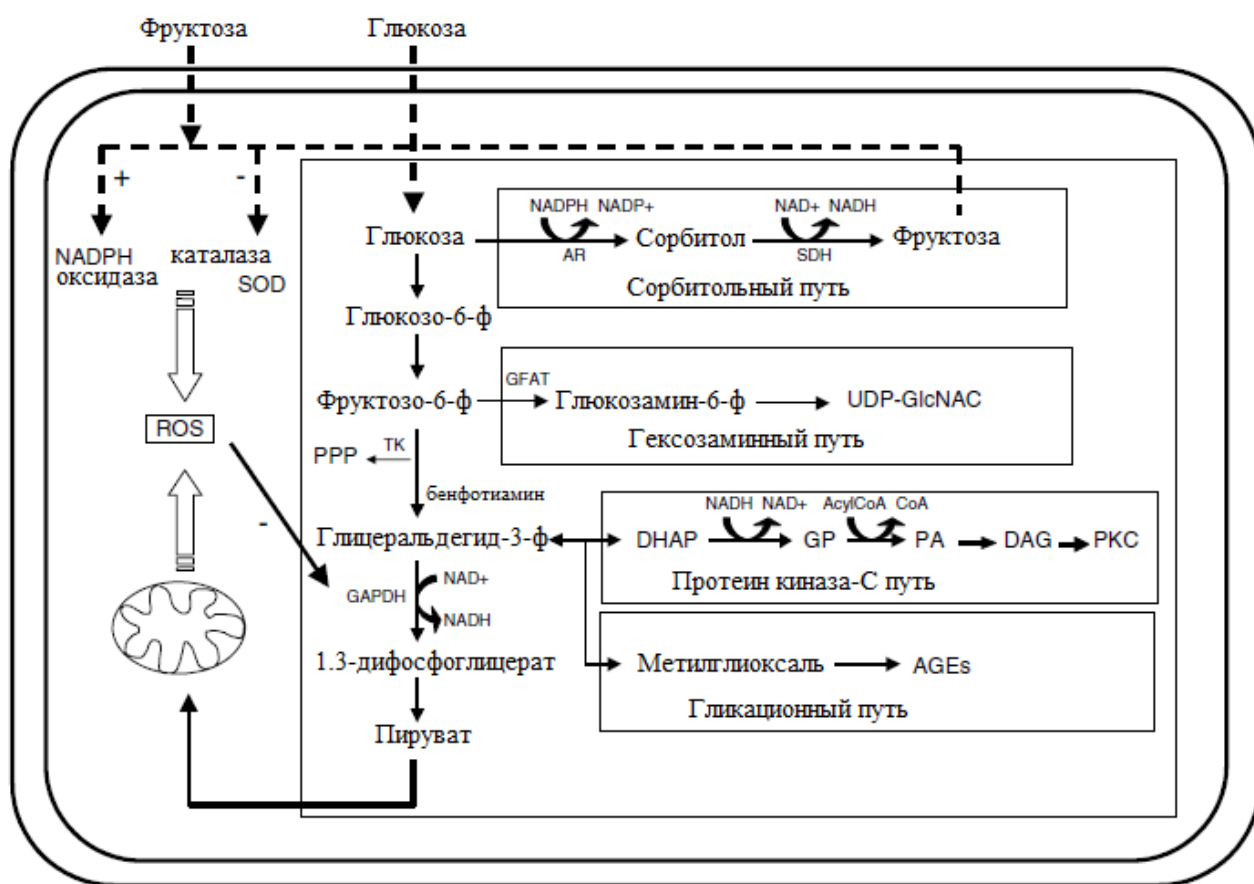


Схема 2. Гипергликемия и опосредованные ею биохимические пути

В связи с этим, обнаружение специфических D-глицеральдегид-индуцированных продуктов Майяра, триозидинов является полезным маркером для оценки вклада D-глицеральдегида в реакции Майяра. В заключение можно сказать, что потребление углеводов, таких как фруктоза, в целом может повлиять на накопление AGEs, но

накопление AGEs является тканеспецифичным. В последнее время у крыс были изучены *in vivo* эффекты долгосрочного потребления фруктозы на нормальный процесс старения. Эндотелиальные клетки аорты, полученные у крыс на диете с высоким содержанием фруктозы, производили вчетверо больше супероксидных радикалов по сравнению с контрольными крысами, что опосредовано активацией NADH/NADPH -оксидазы. Кроме того, фруктоза может привести к увеличению окислительного стресса путем фруктозо-индуцированной инактивации и снижения экспрессии антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (Схема 2) [Casper G. et al., 2004].

Индукцированная диетой инсулиновая резистентность в мозге может ослаблять память [Mielke J., et al., 2005]. Циркулирующий уровень глюкозы важен для когнитивной функции, поскольку глюкоза легко проходит гематоэнцефалический барьер и используется мозгом как топливо, а инсулиновая резистентность ведет к ослаблению толерантности к глюкозе [Dwyer D., et al., 2002]. Даже у индивидуумов без диабета второго типа умеренное ухудшение толерантности к глюкозе коррелировало с атрофией гиппокампа и снижением когнитивности [Convit A., et al., 2010]. Широкомасштабные эпидемиологические исследования обнаружили более плохое обучение и производительность памяти, что должно быть, также связано с сахарным диабетом второго типа, нарушением толерантности к глюкозе и/или гиперинсулинемией [Biessels G.J., et al., 2002]. На основании многочисленных электрофизиологических экспериментов доказано, что диабет-вызванные аномалии головного мозга и поведения связаны с дефективной экспрессией длительной потенциации в гиппокампальных срезах [Biessels G., et al., 2006]. Диета с высоким содержанием фруктозы может вызвать когнитивный дефицит. У грызунов потребление 60% фруктозы в течение 6 недель вызвало ослабление передачи сигналов инсулина в гиппокампе и коре [Mielke J., et al., 2005], на что указывало снижение уровней фосфорилированных протеинов (IR- β субъединицы и протеинкиназы В) сигнального каскада инсулина. Эффекты фруктозы в ЦНС не ограничиваются ее способностью вызывать инсулиновую резистентность. Новейшие исследования показали более прямые эффекты фруктозы на мозг и ее обобщающую функцию в нейронах. В мозге крыс на фруктозной диете транспортер фруктозы GLUT5 демонстрирует повышенную

экспрессию mRNA, сопровождающуюся повышением уровня GLUT5 в гиппокампе [Shu H., et al., 2006]. Эти данные подразумевают, что при фруктозной диете нейрональный захват фруктозы может быть повышен.

1.4. Роль нейрональной НАДФ-оксидазы в прогрессировании и предотвращении нейродегенераций (в частности, деменций)

Отмечается рост доказательств вовлеченности семейства НАДФ-оксидаз (NADPH-oxidase - Nox) в генерации ROS в ЦНС. Контролируемая ROS генерация необходима для оптимального функционирования ЦНС путем тонкой настройки регулирования сигнальных путей, чувствительных к окислительно-восстановительным реакциям, в то время как повышенная генерация ROS может привести к оксидативному стрессу и заболеваниям ЦНС. Хронический оксидативный стресс и оксидативное повреждение клеток головного мозга становится одной из убедительных теорий нейродегенеративной патологии. Наряду с тем, что некоторые ферменты и метаболические процессы могут генерировать внутриклеточный ROS в мозге, O₂-генерирующий фермент NADPH-оксидаза 2 (Nox2), в последнее время выявлен как основной источник оксидативного стресса и нейродегенеративных заболеваний [Cahill-Smith S. et al., 2014; Rojo et al., 2014; Qiu et al., 2016]. Общая антиоксидантная терапия в клинике не эффективна, поэтому попытки выявления механизмов активации и сигнальных путей Nox2 необходимы для обнаружения новых лекарственных мишеней для лечения или предотвращения нейродегенеративных заболеваний, в том числе умеренных когнитивных нарушений. Дискутируется возможность совершенствования терапевтических мишеней ферментов Nox для лечения таких патологий ЦНС, как шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона, инсульты [Sorce S. et al., 2012]. Nox является мультикомпонентным комплексом, состоящим из мембран-ассоциированных gp91(phox) и p22(phox) субъединиц, флавоцитохрома b 558 и цитозольных p47(phox) и p67(phox) субъединиц, а также p40(phox) и Rac. Когда Nox активируется путем фосфорилирования p47(phox), цитозольные субъединицы перемещаются к клеточной мембране и объединяются с gp91(phox) каталитической субъединицей. Активность Nox и экспрессия регуляторной субъединицы p47^{phox} и каталитической субъединицы gp91^{phox} были оценены в поврежденной и неповрежденной

областях мозга у пациентов в поздней стадии БА и с амнезией средней тяжести (MCI средне когнитивные ухудшения) и оценен профиль NOX в ранних стадиях деменций. Уровень gp91^{phox} в микроглии сильно повышен, в нейронах же он умеренно экспрессирован. Экспрессия и активность Nox апрегулированы особенно в уязвимых регионах мозга пациентов с MCI, что предполагает возможность участия в раннем патогенезе БА повышенно-активированных Nox-ассоциированных редокс путей в нейронах [Bruce-Keller A., et al., 2010].

Основная концепция редокс сигнализации в том, что если Nox- произведенные ROS необходимы для нормальной клеточной функции, чрезмерный оксидативный стресс может способствовать патологии. Так, в ЦНС нормальная функция Nox необходима для таких процессов, как нейрональная сигнализация, память, центральный кардиоваскулярный гомеостаз, а сверхпродукция ROS содействует нейротоксичности, нейродегенерации и кардиоваскулярным заболеваниям. Несмотря на вовлеченность Nox в нормальные и патологические процессы ЦНС, до сих пор относительно мало известно о механизмах вовлеченности. Обзор Инфангер и соавторов [Infanger D.W., et al., 2006] обобщает доказательства распространенности, регуляции и функции Nox в ЦНС с акцентированием разнообразия и диверсификации изоформ Nox как известной, таких новой роли в нейро-кардиоваскулярной функции.

Показана ключевая роль Nox в патофизиологии ЦНС [Song S.-X. 2013; Abramov A., et al., 2005; Choi S., et al., 2005]. Наиболее распространенными изоформами в головном мозге являются Nox1, Nox2, Nox3, и Nox4, и энзимы NOX в ЦНС вовлечены в нейрологические и психиатрические заболевания [Sorce S. et al., 2012]. Например, показана роль микроглиальной Nox в гибели гиппокампальных нейронов при оксидативном стрессе [Choi S., et al., 2005]. Доказано повышение экспрессии и локализации iNOS в микроглии: ап-регуляция мембранного gp91^{phox} и цитозольного p47^{phox} и p67^{phox} компонентов, транслокация цитозольных протеинов p47^{phox}, p67^{phox}, и Rac1 в мембрану, и экспрессия p67^{phox}Nox в микроглии гиппокампа *in vivo*, указывающие на активацию Nox. Интенсивно исследуются молекулярные механизмы и функциональная значимость контролирования окислительно-восстановительных процессов микроглии

[Rojo A., et al., 2014]. В частности, Nox2-произведенный реактивный кислород в гиппокампе может способствовать микроглиальной активации при постоперативной когнитивной дисфункции у мышей [Qiu L., et al., 2016]. Энзимы Nox не ограничиваются микроглией (напр. фагоциты мозга), они также экспрессированы в астроцитах и нейроваскулярной системе. Энзимы Nox вовлечены в развитие ЦНС, в биологию нейрональных стволовых клеток и в функции зрелых нейронов.

Хотя известно, что Nox – широко распространённый источник мозгового ROS, вовлеченный в нейродегенерацию, доказано, что животные и люди, лишенные протеинов функционального Nox имели когнитивный дефицит. Дикинсоном и соавторами [Dickinson B., et al., 2011] доказано, что гиппокампальные стволовые клетки генерируют H_2O_2 через Nox2 для регулирования внутриклеточного развития сигнальных путей, которые в свою очередь поддерживают нормальную пролиферацию *in vitro* и *in vivo*. Современные открытия доказывают, что ROS функционируют как стандартные компоненты каскадов сигнальной трансдукции физиологических процессов гиппокампа [Dickinson B., et al., 2011]. Согласно этой идее ROS может быть необходимой для гиппокампальной долговременной потенциации (long-term potentiation - LTP) – формы синаптической пластичности, изученной в качестве основы обучения и памяти. Дискутируются доказательства, поддерживающие представления о содействии ROS нормальной LTP, а также вовлеченности ROS в старческое ухудшение LTP [Knapp L.T., et al., 2002]. Показано, что супероксид является решающим для гиппокампальной долговременной потенциации (LTP) и гиппокамп-зависимой функции памяти [Tejada-Simon M.V., et al., 2005]. Возможным источником генерации супероксида в ходе этих процессов является НАДФН-оксидаза. Активная оксидаза состоит из двух мембранных белков, gp91phox и p22phox и четырех цитозольных белков, p40phox, p47phox, p67phox и Rac. При стимуляции цитозольные белки перемещаются к мембране для образовывания комплекса с мембранными компонентами, что приводит к продукции супероксида. Все белки НАДФН-оксидазы присутствовали в гиппокампальных гомогенатах и были экспрессированы в синапсосомах. В обзоре Камслер и др. [Kamsler A., et al., 2004] обсуждаются доказательства вовлеченности активных форм кислорода в регуляторные

события, лежащие в основе синаптической пластичности. В данном контексте H_2O_2 рассматривается в качестве специфической диффундирующей сигнальной молекулы. Предполагается, что действие H_2O_2 осуществляется через высвобождение ионов кальция из внутренних запасов, модуляцию активности специфических кальций-зависимых фосфатазных белков, которые, в итоге, влияют на нейрональную пластичность. Подчеркивается важность клеточной регуляции уровней H_2O_2 , которые изменяются в процессе старения, а также в способности экспрессировать пластичность.

Окислительно-восстановительный баланс неотъемлемый элемент нормальной клеточной физиологии. Дисрегуляция продукции оксидативных элементов ведет к повреждению ДНК, липидной пероксидации, aberrантной пост-трансляционной модификации протеинов, которые во многих случаях индуцируют повреждение, клеточную гибель и заболевания [Wilson C., et al., 2015]. Тем не менее, физиологические концентрации окислительных форм необходимы для поддержки важных клеточных функций, таких как хемотаксис, синтез гормонов, иммунный ответ, реконструкция цитоскелета, гомеостаз Ca^{2+} и др. Последние данные свидетельствуют о том, что окислительно-восстановительный баланс регулирует движения актина и микротрубочек и в физиологических, и патологических условиях. Микротрубочки и актиновые микрофиламенты содержат определенные аминокислотные остатки, которые чувствительны к окислению, что снижает способность микротрубочек полимеризоваться и вызывает разъединение актиновых микрофиламентов в нейрональных и других клетках. В противоположность этому, заторможенная продукция активных форм кислорода приводит к аномальной полимеризации актина, уменьшает рост аксонов и влияет на нормальное развитие и поляризацию нейронов [Wilson C. et al., 2015].

Интересным аспектом является оксидативная регуляция потенциал-зависимых каналов, и в новейших исследованиях дискутируются вопросы о том, как их окислительно-восстановительная чувствительность способствует измененной возбудимости при нейродегенеративных заболеваниях [Peers Ch., et al., 2014]. Доказано, что устойчивая активация нейрональных NMDA глутаматных рецепторов приводит к эксайтотоксичной гибели клеток при инсульте, травме, и нейродегенеративных

расстройствах. Хотя окончательно не доказано как NMDA-рецепторы связаны с активацией нейрональной Nox2, однако частично аргументирована роль супероксид-продуцирующей нейрональной НАДФ-оксидазы (Nox2) в эксайтотоксической нейрональной гибели [Brennan-Minnella A. M., et al., 2013]. Авторы идентифицировали сигнальный путь, связывающий активацию рецептора NMDA с активацией Nox2 в первичной нейрональной культуре. Приток кальция через NR2B-субъединицы рецепторов NMDA приводит к активации фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Формирование фосфатидилинозитол (3,4,5)- трифосфата посредством PI3K активирует атипичные протеинкиназы C (PKC-зета), которые, в свою очередь фосфорилируют структурную субъединицу нейрональной Nox2 p47(phox). Приток кальция через NR2B-содержащие рецепторы NMDA запускает митохондриальную деполяризацию, активацию Nox2, образование супероксида и гибель клеток. Расстройства на этом пути могут либо увеличивать, либо уменьшать выработку супероксида в ответ на активацию рецепторов NMDA, и поэтому могут влиять на неврологические нарушения, в которых эксайтотоксичность выступает запускающим фактором [Brennan-Minnella A. M., et al., 2013]. Данные о роли Nox2 в эксайтотоксическом повреждении – в механизме клеточной гибели, сильно ассоциированном с ишемическими и гипогликемическими инсультами как нейропатологическими состояниями, триггируемыми выделением глутамата, указывают, что активность Nox2 может быть запущена стимуляцией NMDA, non-NMDA рецепторов в нейронах и метаботропных/ионотропных рецепторов активированной микроглии, и подтверждает факт о том что Nox-генерированные активные формы кислорода вовлечены в активацию кальпаина, способствующую глутамат-индуцированной нейрональной гибели [Guemez-Gamboa A., et al., 2011].

Nox играет важную роль в нейрональной сигнализации [Kishida K., et al., 2005; Tejada-Simon M., et al., 2005]. Экспериментальные данные с пространственной ориентацией выявили, что тонкий баланс ROS, необходим для сигнализации: излишнее уменьшение или увеличение ROS приводит к ухудшению LTP в гиппокампе и повреждению формирования памяти [Knapp L., et al., 2002].

Перекись водорода признана диффундируемой сигнальной молекулой для синаптической пластичности [Kamsler A., et al., 2004], и сверхэкспрессия экстраклеточной супероксиддисмутазы отмечена при изменениях синаптической пластичности и памяти у стареющих мышей [Hu D., et al., 2006]. Таким образом, сверхвыраженность антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы повреждает LTP у молодых, но сберегает у старых мышей [Kamsler A., et al., 2004; Hu D., et al., 2006], в то время как лечение антиоксидант-миметиком низкомолекулярного веса может реверсировать дефицит гиппокамп-зависимого обучения у стареющих мышей [Liu R., et al., 2003]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что aberrantly повышенная или устойчиво активированная Nox в нейронах в состоянии непосредственно нарушать клеточную и синаптическую функцию, в частности в контексте старения. Эти данные повышают возможность того, что активация Nox, в частности в нейронах, может участвовать при когнитивном дефиците, ассоциированном со старением и диетой индуцированным ожирением у людей [Elias M.F., et al., 2005; Ward M.A., et al., 2005; Waldstein S.R., et al., 2006]. ROS является необходимым компонентом каскада сигнальной трансдукции при нормальных физиологических процессах. Двойственная роль ROS как клеточной мессенджерной молекулы для нормальной LTP и как повреждающей токсической молекулы при старческих (возраст-обусловленных) искажениях LTP обсуждается [Serrano F., et al., 2004]. Нерегулируемое образование активных форм кислорода является маркером старения клетки и организма, сопряженного с когнитивными нарушениями у людей и грызунов. Данные подтверждают гипотезу о том, что изменение Nox-специфической синаптической продукции активных форм кислорода может выступать предиктором дефицита кратковременной памяти у пожилых [Sameh S., et al., 2011].

При нейродегенеративных заболеваниях воспалительный процесс вносит отрицательный вклад в неврологический исход и при этом Nox – важнейший источник супероксида/пероксида. Чрезмерная продукция пероксида вызывает прогрессирующее повреждение мозга. Новые знания о роли Nox в заболеваниях ЦНС могут послужить импульсом для совершенствования специфических, сильных и безопасных Nox-ингибиторов [Cairns B., et al., 2012]. Два мембранных протеина – gp91phox и p22phox-, и

четыре цитозольных протеина - p40phox, p47phox, p67phox, Rac (составные активных оксидаз) локализованы и функционируют в гиппокампе мышей. Стр. 103 Эти Nox протеины были локализованы в клеточных телах и дендритах. Антитела к p67phox и пресинаптические маркеры синаптофизина подтвердили ассоциацию субъединиц Nox с синаптическими сайтами/позициями [Tejada-Simon M.V., et al., 2005].

Новые взгляды на метаболические последствия фруктозой богатых диет обусловлены данными относительно влияния фруктозы на нервную ткань (увеличение активные формы кислорода и воспалительных процессов) [Dekker M.J., et al., 2010; Su et al., 2010]. Интенсивное потребление диетической фруктозы вызывает ряд отрицательных эффектов [Gaby A.R., et al., 2005], поскольку фруктозой-обогащенные диеты индуцируют патофизиологические характеристики, ассоциированные с инсулиновой резистентностью и метаболическим синдромом [Le K.A., et al., 2006; Stanhope K.L., et al., 2008; Jung L. et al., 2010]. Фруктоза вовлечена в прогрессирование метаболического синдрома путем дисрегуляции множества сигнальных факторов, и оксидативный стресс – один из ключевых молекулярных механизмов индуцированных фруктозой метаболических дефектов организма людей и животных [Rutledge A.C., et al., 2007; Fariña et al., 2013].

Фруктоза индуцирует чрезмерное формирование ROS: неэнзиматическая фруктозиляция в 7 раз высокоактивна по сравнению с протеиновой гликацией, потому и фруктоза генерирует в 100 раз больше ROS по сравнению с глюкозой [Bunn H.F., et al., 1981]. Фруктоза может быть гепатотоксичной при снижении ROS-подавляющего свойства сопряженных пероксисом [Lee O., et al., 2009]. ROS аккумулируются, поскольку не могут быть блокированы смежными пероксисомами; эти ROS, достигая эндоплазматического ретикулума, ведут к компенсаторному процессу под названием «unfolded protein response», стимулирующему инсулиновую резистентность (секрецию дефективного инсулина) [Lee O., et al., 2009], и в итоге приводят к дефициту инсулина [Bremer A. A., et al., 2012]. При этом клеточный стресс может индуцировать NOX-зависимую генерацию ROS в качестве аварийной предупредительной системы, которая подводит клетки к относительно стресс-резистентному статусу путем интегрирования и расширения стресс сигналов как подготовительных против дальнейших клеточных проблем [Jiang F., et al., 2011].

1.5. Фитотерапевтические эффекты Стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*).

Распространенность инсулинорезистентности диктует поиски альтернативных методов лечения. По всему миру, особенно в сельских районах, население практикует народные лекарственные средства, используя местные ресурсы. Что касается диабета, то особенно были изучены травы и плоды с сахароснижающим эффектом, используемые в народной медицине тропических и азиатских регионов, некоторые из которых выступают источниками натуральных гипогликемических субстратов и потенциальной альтернативой антидиабетическим лекарствам. Среди множества трав, распространенных в старинных и традиционных обычаях народной медицины, ярким примером является Стевия (*Stevia rebaudiana Bertoni*), многолетний кустарник из Южной Америки [Cekic V., et al., 2011]. Сладость и уникальные свойства этого растения обеспечивают интересную платформу для выявления его потенциальных лечебных эффектов, в частности, в отношении инсулинорезистентности.

Стевия в качестве антидиабетического агента. На сегодняшний день из 150 известных видов Стевии, *Stevia rebaudiana Bertoni* является единственной в своем роде имеющей особые свойства: во-первых, она замечательна в силу своей сладости. Это растение употребляли индейцы гуарани Парагвая и Бразилии для лечения диабета ввиду его лечебных свойств. Хотя листья растения и обладают ярко выраженным сладким вкусом, они не содержат калорий [Wang Z., et al., 2012] и богаты метаболитами, такими как β -каротин, тиамин, астроинулин, рибофлавин, разнообразные терпены, и флавоноиды, которые придают растению его целебные преимущества [Konoshima T., et al., 2002]. Это свойство нулевой калорийности оказывает благотворное воздействие на пациентов, страдающих от ожирения и диабета. Важно отметить, что из растения *Stevia rebaudiana* могут быть извлечены многие стевииогликозиды, представляющие собой соединения с несколькими молекулами углеводов, связанные с неуглеводной агликоновой частью (Стевиол). Наиболее часто встречающимися в числе многих других доступных гликозидов являются Стевиозид, Ребаудиозид А, Ребаудиозид С и Дулькосид [Lemus-Mondaca R., et al., 2012; Yadav S., et al., 2012]. Некоторые авторы утверждают, что польза Стевии обусловлена его антиоксидантными свойствами; это подтверждается

анализом извлеченных из растения фенолов. Высокое содержание фенолов (до 91 мг/ г) в листьях является основной причиной сахароснижающей активности [Shivanna N., et al., 2012]. Кроме того, у предварительно вскормленных Стевией крыс наблюдалось значительное снижение (около 30%) перекисного окисления в печени.

Воздействие Стевии на уровень глюкозы в крови. Поддержание уровня глюкозы в крови является наиболее распространенной мерой, используемой исследователями для оценки эффективности противогипергликемического агента. Сузуки и др. [Susuki H., et al., 1977] наблюдали значительное снижение уровня глюкозы в крови у крыс, получавших Стевию (в сочетании с диетой с высоким содержанием углеводов и жиров) в течение четырех недель. У лабораторных мышей с глюкозо-индуцированной гипергликемией после недельного лечения Стевиозидом, основным компонентом экстракта листьев, наблюдалось значительное снижение гликемии. Сообщалось также о значительном сокращении (в среднем на 18%) постпрандиальных уровней глюкозы у пациентов с сахарным диабетом второго типа с диетой, дополненной Стевиозидом [Gregersen S., et al., 2004].

Противовоспалительная активность Стевии. Исследование, проведенное на инсулинорезистентной модели мышей показывает, что Стевиозид также может подавлять ядерный фактор NF- κ B пути, а также вызвать повышение чувствительности всего тела к инсулину, скорость инфузии глюкозы и уровень глюкозопонижающего эффекта инсулина [Wang Z., et al., 2012]. При этом интересно, что экспрессия TNF- α (рассмотренного ранее провоспалительного цитокина, способствующего снижению чувствительности к инсулину) была значительно подавлена, наряду с экспрессией интерлейкина-6 (IL6), интерлейкина-1 β (IL1 β), и интерлейкина10 (IL10), среди других хемотактильных и провоспалительных цитокинов. Таким образом, стевиозид был рассмотрен в качестве агента, способного потенцировать снижение инсулинорезистентности путем регуляции TNF- α и уменьшающего воспаление в жировой ткани.

Влияние Стевии на секрецию инсулина. Были выдвинуты различные гипотезы относительно того, как Стевиозид вызывает столь значительное снижение уровня глюкозы в крови: к ним относятся теории утилизации глюкозы [Yokozawa T., et al., 1984],

модуляции транспорта глюкозы [Yamasaki K., et al., 1993], и повышения секреции и чувствительности к инсулину [Dao K. N., et al., 1995]. Предполагают, что Стевиозид может проявлять свои глюкозоснижающие эффекты только в конкретных условиях высокого содержания глюкозы в крови (как в диабетическом состоянии), и не проявляет их в состоянии отсутствия гипергликемии [Gregersen S., et al., 2004]. Доказано, что при длительном введении крысам Ребаудиозида А (второй по содержанию основной компонент листьев *Stevia rebaudiana*) секреция инсулина не повышалась. В последующих исследованиях было показано, что Ребаудиозид А стимулирует секрецию инсулина из панкреатических β -клеток путем блокады АТР-зависимых калиевых каналов. Это торможение калиевых каналов требует присутствия глюкозы в высокой концентрации. Это очень обнадеживающий вывод, означающий, что листья *Stevia rebaudiana* не представляют угрозы здоровью пациентам с риском тяжелой гипогликемии.

Инсулинотропные, глюкагоностатические эффекты Стевии и эффекты распознавания питательных веществ.

Распознавание питательных веществ в буквальном смысле означает способность организма распознавать и намечать доступные питательные вещества для того, чтобы контролировать и регулировать связанные с ним метаболические пути и потоки. Эти пути имеют важное значение для регуляции клеточного гомеостаза, использования в полном объеме доступных питательных веществ, а также для выживания при голодании. Jeppesen и соавторы [Jeppesen P. B., et al., 2002] утверждают, что Стевиозид способствует инсулинотропным и глюкагоностатическим эффектам за счет увеличения высвобождения инсулина одновременно подавляя глюкагон у Гото-Какизаки крыс, как не страдающих ожирением животных моделей диабета второго типа. Инсулиновое истощение и повышение в уровнях глюкагона в состоянии диабета второго типа были тесно связаны с дисфункцией в α -клетках поджелудочной железы, способствуя (наряду с более часто замешанной инсулинорезистентностью) развитию заболевания. Это поддерживает теорию Jeppesen и др. [Jeppesen P.B., et al., 2003], показавших, что глюкагоностатические эффекты Стевиозида могут быть вызваны косвенным инсулин-индуцированным ингибирующим ответом на глюкагон, увеличением эффективности распознавания глюкозы или прямым

ингибированием синтеза глюкагона с помощью α -клеток поджелудочной железы. Кроме того, повышенные уровни наблюдались из-за генов, ответственных за гликолиз, что, возможно, вносит свой вклад в повышенную секрецию инсулина. Это также улучшает распознавание питательных веществ при деактивации белков, таких как фосфодиэстеразы, ответственных за уменьшение циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) при лечении стевиозидом. В тех случаях, когда фосфодиэстераза подавляется, цАМФ (необходима для усиления секреции инсулина физиологически индуцированной глюкозой) увеличивается, что свидетельствует о способности стевиозида к существенному увеличению экспрессии глюкозо-реагирующих генов и улучшению распознавания питательных веществ [Jeppesen P., et al., 2003].

1.6. Центральные и периферические терапевтические мишени и механизмы Глибенкламида.

Впервые внедренный в клиническую практику в 1969 году, Глибенкламид (в США принято наименование Глибурид) известен как наиболее подходящий для применения в лечении сахарного диабета второго типа, где он используется для стимуляции высвобождения инсулина путем блокирования панкреатических K_{ATP} -чувствительных каналов (рецептор сульфонилмочевины 1 (SUR1)-Kir6.2). За последнее десятилетие, Глибенкламид вновь оказался в центре внимания в связи с его плеiotропными защитными эффектами при остром повреждении ЦНС. Действуя путем ингибирования недавно охарактеризованного канала SUR1-Trpm4 (прежде всего SUR1-регулируемого $NCa-ATP$ канала) и, в некоторых случаях, посредством каналов K_{ATP} головного мозга Глибенкламид проявил благотворное влияние в некоторых клинически значимых моделях грызунов таких как ишемический и геморрагический инсульт, черепно-мозговая травма, повреждение спинного мозга, неонатальная энцефалопатия недоношенности [Kurland D. B., et al., 2013]. Глибенкламид путем ингибирования SUR1 воздействует на микрососуды, снижая образование отека и вторичное кровоизлияние, и тормозит некротическую гибель клеток, оказывает мощное противовоспалительное действие и способствует нейрогенезу. Последние данные относительно клинических исследований при ЧМТ и инсульте, которые протекают с участием SUR1 в острых патологических

состояниях ЦНС, открывают новые возможности для использования Глибенкламида, как хорошо известного, безопасного фармацевтического средства [Kurland D. B., et al., 2013].

Механизм действия. Препарат работает путем связывания и активации АТФ-чувствительных калиевых каналов K_{ATP} -ингибиторных регуляторных субъединиц рецептора 1 сульфонилмочевины (SUR1) в β -клетках поджелудочной железы [Serrano-Martín X., et al., 2006]. Такое торможение приводит к деполяризации клеточной мембраны, открытию потенциал-зависимых кальциевых каналов. В результате возрастает содержание внутриклеточного кальция в β -клетках и последующая стимуляция секреции инсулина. После церебрального ишемического инсульта повреждается гематоэнцефалический барьер и Глибенкламид может достигнуть ЦНС: было показано, что Глибенкламид более эффективно связывается в ишемическом полушарии [Ortega F.J., et al., 2012]. Более того, при ишемических состояниях в нейронах, астроцитах, олигодендроцитах, эндотелиальных клетках [Simard J.M., et al., 2012] и в реактивной микроглии [Ortega F.J., et al., 2012] экспрессируется SUR1 регуляторная субъединица K_{ATP} - и NC_{Ca-ATP} -каналов. Глибенкламид улучшает результаты в моделях инсульта животных путем усиления нейропротекции [Serrano-Martín X., et al., 2006]. В ретроспективном исследовании было показано, что у принимающих Глибурид больных сахарным диабетом второго типа при выписке баллы по шкале инсульта (тест для проверки способности пациента мыслить и рассуждать) улучшались по сравнению с диабетическими пациентами, не принимающими Глибурид [Kunte H., et al., 2007]. SUR1-регулируемый NC ($Ca-ATP$) канал представляет собой неселективный катионный канал, регуляция которого осуществляется внутриклеточным содержанием кальция и аденозинтрифосфата. Канал не экспрессирован постоянно (в контексте белковой и генной экспрессии), но транскрипционно заново активируется во всех нейрососудистых клеточных единицах при многих формах травм ЦНС. Клинические испытания внутривенного введения Глибенкламида при мозговых травмах и инсульте подчеркивают важность последних достижений в понимании роли SUR1-регулируемого NC ($Ca-ATP$) канала при остром ишемическом, травматическом, и воспалительном повреждении ЦНС [Simard J.M., et al., 2012]. SUR1-регулируемые каналы играют существенную роль в некротической гибели клеток при ишемическом инсульте, и

в нейровоспалении после геморрагических травм. Надежные доклинические исследования показали, что Глибенкламид снижает объемы инфаркта, отек и геморрагические изменения, а также улучшают результаты лечения у моделей грызунов с ишемическим инсультом. Ретроспективные исследования показывают, что у больных сахарным диабетом на сульфонилмочевинных препаратах картина инсульта улучшается, если они продолжают лечение. Дополнительные лабораторные исследования показали причастность SUR1 в патофизиологии геморрагических инсультов ЦНС. В клинически релевантных моделях субарахноидального кровоизлияния, Глибенкламид снижает неблагоприятный нейрогенный и поведенческий исход [Caffes N., et al., 2015]. Изучение молекулярной патофизиологии нейроглиоваскулярной единицы при ишемическом инсульте позволяет предположить, что нарушенный клеточный ионный гомеостаз из-за измененной функции и регуляции ионных насосов, каналов и вторичных активных транспортеров играет интегральную роль в развитии цитотоксического и вазогенного отека и геморрагических изменений [Khanna A., et al., 2014].

Заслуживает внимания случай с неонатальным сахарным диабетом. У девочки 12-недельного возраста инсулинотерапия смягчила симптомы диабета, но пациентка проявляла явную двигательную и психическую задержку в развитии. В возрасте 6 лет была выявлена мутация в гене KCNJ11 (ген KCNJ11 несет ответственность за АТФ-чувствительный калиевый канал). Генетическая оценка выявила миссенс мутацию в KCNJ11, которая кодирует Kir6.2 субъединицу канала K_{ATP} и придает пониженную АТФ-чувствительность. Функциональные исследования показали, что мутантные каналы были сильно ингибированы сульфонилмочевинной (Толбутамид) [Mlynarski W., et al., 2007]. Лечение сульфонилмочевинной (Глибенкламид) привело к улучшению не только гомеостаза глюкозы, но и умственной и моторной функции. Основным различием между инсулиновой терапией и лечением сульфонилмочевинной является то, что первая контролирует только гомеостаз глюкозы, в то время как сульфонилмочевина блокирует K_{ATP} каналы во всех тканях, к которым они имеют доступ, и, следовательно, облегчает внепанкреатические проблемы. Антидиабетические производные сульфонилмочевины широко используются в лечении диабета второго типа. Эти препараты стимулируют

секрецию инсулина из островков Лангерганса, которые при сахарном диабете проявляют пониженное содержание инсулина и ослабленную реакцию на глюкозу [Virsolvy-Vergine A., et al., 1992]. Используя связывание [3H]Глибенкламида в мембранах мозга крысы, были извлечены, очищены и частично охарактеризованы два пептида, которые являются эндогенными лигандами для рецепторов сульфонилмочевины в ЦНС [Virsolvy-Vergine A. et al., 1992]. Эндосульфин вовлечен в физиологию β -клеток и их нарушения (например, сахарный диабет второго типа), и при некоторых патологиях изменения ионных потоков. Сульфонилмочевины действуют на поверхности β -клеток посредством взаимодействия со специфическими сайтами связывания (или рецепторами), присутствующими на мембранах инсулинсекретирующих клеток или тканей. Рецепторы с подобными характеристиками также были обнаружены в ЦНС и в ткани миокарда. Рецептор сульфонилмочевины тесно связан с АТФ-зависимыми калиевыми каналами, и вовлечен в глюкозоиндуцированную секрецию инсулина. Существование такого рецептора позволяет предположить, что он представляет собой сайт распознавания эндогенного лиганда, который должен регулировать физиологические процессы через механизмы триггирования (в фармакологическом контексте) сульфонилмочевинной. Авторы показали, что такой лиганд существует у крыс и характеризуется двумя пептидами, представляющими скорее всего две формы одного и того же пептида, для которых было предложено название «эндосульфин». Эндосульфин присутствует в головном мозге крыс и овец при аналогичных концентрациях (приблизительно 0,1 пмоль эквивалента Глибенкламида на грамм ткани) и в поджелудочной железе у крыс. Высокоочищенный эндосульфин подобен тем концентрациям сульфонилмочевины, при которых он взаимодействует с рецепторами, и эндосульфин способен индуцировать высвобождение инсулина из β -клеток в культуре. Его локализация в ЦНС относительно обширна, хотя превалирует в конкретных сайтах связывания. Его распространение в других тканях меньше, чем в ЦНС или поджелудочной железе. Сродство эндосульфина к рецептору ЦНС идентично таковому для рецептора β -клеток, и поддерживает гипотезу о близости, если не идентичности, фармакологии рецепторов ЦНС и периферических рецепторов [Virsolvy-Vergine A., et al., 1992].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты и уход за животными проведены в соответствии с «Правилами и нормами гуманного обращения с экспериментальными животными». Модели диабета грызунов классифицируются на: 1) генетические и 2) негенетические, среди которых наиболее популярны стрептозотоциновая модель (вызывает диабет первого типа), модель животных на диете обогатщенной фруктозой (вызывает диабет второго типа). Вскормленные фруктозой крысы используются как животные модели инсулинорезистентности [Elliott et al., 2002; Tran et al., 2009; Islam M.S., et al., 2012; Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh. 2016], поскольку они рассматриваются как аналог наблюдаемого у людей мультиметаболического синдрома, переходящего в диабет второго типа.

Дизайн экспериментов. Электрофизиологические эксперименты проведены на крысах альбиносах (самцы, 220 ± 20 г) в следующих группах: 1) интактные крысы (Группа Контроль $n=10$) на стандартном корме и питье; 2) животные, употребляющие вместо питьевой воды только питьевую воду с добавлением диетической фруктозы (20% раствор) в течение 6 недель ежедневно (Группа Фруктоза $n=12$) (Гр.Ф); 3) животные на стандартном питье и получающие с пищей порошок листьев гидропонической *Stevia rebaudiana* в течение 3 недель (20 мг/кг ежедневно) (Группа Стевия, $n=5$); 4) животные, употребляющие питьевую воду с добавлением диетической фруктозы (20% раствор) в течение 6 недель ежедневно и одновременно с 3 по 6 недели порошок листьев Стевии (20 мг/кг ежедневно) (Группа Фруктоза+Стевия $n=12$) (Гр.Ф+С); 5) животные, употребляющих питьевую воду с добавлением диетической фруктозы (20% раствор) в течение 6 недель ежедневно и одновременно с 3 по 6 недели порошок препарата Глибенкламид (5 мг/кг перорально ежедневно) (Группа Фруктоза+Глибенкламид $n=5$) (Гр.Ф+Г). 6) острые эксперименты с введением однократных доз Глибенкламида и Стевиозида ($n=10$).

Биохимические исследования выполнены на 24 крысах-самцах альбиносах весом 240 ± 10 г. в 3 сериях экспериментов. 8 животных употребляли питьевую воду и служили в качестве контрольной группы (Гр.К); 8 животных употребляли питьевую воду на 20% фруктозе в течение 9 недель ежедневно и служили в качестве группы Фруктоза (Гр.Ф); 8

животных употребляли питьевую воду на 20% фруктозе в течение 9 недель ежедневно и порошок листьев Стевии (20 мг/кг ежедневно) получали с пищей с 6 по 9 недели и служили в качестве группы Фруктоза+Стевия (Гр.Ф+С).

Для биохимических экспериментов на 9-ой неделе животные были декапитированы в глубоком наркотическом сне (нембутал 45 мг/кг в/б) и кровь собрана из дорсальной аорты (стабилизирована в 0,2% растворе оксалата натрия). У тех же животных были изъяты печень, селезенка и легкие.

Растительное сырье *Stevia rebaudiana* Bertoni и биотехнологическое получение Стевиозида. Использовали листья *Stevia rebaudiana* Bertoni, выращенной в Институте проблем гидропоники НАН РА методом открытой гидропоники с целью получения экологически чистого растительного сырья обогащенного йодом, цинком и биологически активными веществами и с низким содержанием токсических элементов [Բաբախյան Լ.Ս. և օրհն., 2012]. В таблице 1 приводятся различия биохимического состава почвенного и гидропонического вариантов Стевии, выращенных, указывающие на высокое содержание биологически активных веществ и низкое содержание токсических элементов в листьях гидропонической Стевии (урожай август-октябрь 2015г., идентифицирован и вавчеризирован в экспериментальной станции Института проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА). За предоставление сырья выражаем благодарность М.А. Бабахяну и Л.Э. Оганесян.

Для получения Стевиозида и Ребаудиозида А путем биокаталитического ферментативного трансгликозилирования экстракта Армянской Стевии (без очистки отдельных его компонентов) были использованы высокоэффективные циклодекстрин глюканотрансферазы, продуцируемые *Bacillus stearothermophilus* B-5076 и *Bacillus macerans* BIO-4m [Կոչիկյան Յ.Դ., 2004]. При этом, меняя технологические параметры реакции можно варьировать степень активности циклодекстрин глюканотрансферазы к Стевиозиду, либо к Ребаудиозиду А [Կոչիկյան Յ.Դ., 2004]. Использованный в экспериментах порошок Стевиозида содержит 90% Стевиозида и 10% Ребаудиозида А. Циклодекстрин глюканотрансферазы из мезофильных, термофильных, алкалофильных и галофильных бацилл использованы в качестве донора для трансгликирования Стевиозида

с целью устранения горечи и послевкусия. За предоставление Стевиозида выражаем благодарность В.Т. Кочикяну (Научно-производственный центр «Армбиотехнология»).

Таблица 1

Сравнительный состав почвенной и гидропонической Stevia rebaudiana Bertoni

Биохимические показатели	Почвенная Стевия	Гидропоническая Стевия
экстрактивные вещества, %	41.7	42.8
азот, %	3.58	3.24
белки, %	22.38	20.25
каротин, мг / %	64.63	62.50
хлорофилл, мг / %	119.13	143.18
витамин С, мг / %	63.2	75.8
дубильные вещества, мг/%	13.9	10.2
суммарные флавоноиды, %	5.1	4.4
эфирные масла,%	-	0.15
токсические элементы	0.08	0.06
As мг/кг	0.24	0.20
Hg мг/кг	0.003	0.002
йод, мг/100г	0.80	8.76
цинк, мг/100г	0.95	1.30

Определение уровня глюкозы в плазме крови. В группах Ф, Ф+С и Ф+Г под нембуталовым наркозом (40 мг/кг в/б) портативным глюкометром (Bayer Health Care LLC – Contour; объем образца 0,6 мкл, время измерения 5 сек, шкала измерения 10-600 мг/дцл) индивидуально для каждого животного определяли уровень глюкозы в крови – исходный и спустя 3, 6, 9 недель от начала экспериментов. Данные представлены в виде $M \pm SEM$. Данные подвергались статистическому анализу с применением Graphpad prism software v.5 (<http://graphpad.com>). Значимость различий оценивалась по t-тесту Стьюдента. Значения Р менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

In vivo экстраклеточные электрофизиологические исследования. По истечении 6 недель под уретановым наркозом (1,1 мг/кг, в/б) животных фиксировали в стереотаксическом аппарате для экстраклеточной регистрации фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции

(ВЧС) прямоугольным током амплитудой 0,12 – 0,18 мА ипсилатеральной латеральной энторинальной коры, а также одиночных нейронов базолатеральной амигдалы при ВЧС CA1 гиппокампа. Стекланный микроэлектрод с диаметром кончика 1мкм, заполненный 2М раствором NaCl, многократно погружали в дорсальный гиппокамп и в латеральную амигдалу по соответствующим координатам (AP -3,3; L $\pm$ 1,5-3,5; DV 3,0-4,0 мм и AP -3,24; L $\pm$ 5,4-5,8; DV 9,5-10,2 мм), а биполярный цилиндрический электрод для ВЧС (100 Гц в течение 1сек) вживляли в латеральную энторинальную кору по координатам (AP -9; L 3,5; DV 4 мм) и в гиппокамп по координатам (AP -3,0; L 2,0; DV 3,5 мм) [Paxinos, Watson, 2005]. Импульсный поток нейронов, после селекции посредством амплитудного дискриминатора (Рис. 2 Б, В) подвергался программному анализу. Программа имеет возможность исключения артефактов ВЧС, что позволяет оценить спайковую активность на время тетанизации.

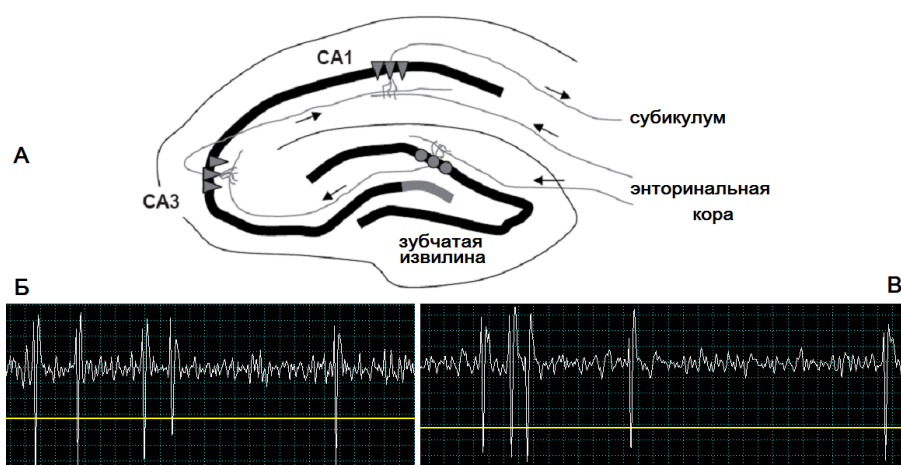


Рисунок 2 А - схема гиппокампальной формации; стрелки указывают на направление нейронального информационного потока. Внизу спайковая активность нейронов амигдалы (Б) и гиппокампа (В); желтая линия – амплитудный дискриминатор

На основе распределенного в реальном времени пре- и постстимульного спайкинга активности единичных нейронов выводились диаграммы средних частот дифференцированно для пре- и постстимульного времени, включая период ВЧС (Рис. 4 А-В). Целью анализа являлось определение статистической достоверности различий частоты спайковой активности на престимульном и постстимульном временном отрезке, а также на время ВЧС (время тетанизации). Традиционным методом проверки

однородности двух независимых выборок являлся t-критерий Стьюдента. Для повышения надежности статистических оценок применяли также непараметрический метод проверки с использованием двухвыборочного критерия Вилкоксона, учитывающего асимптотическую нормальность данного критерия и позволяющего сравнивать расчетные значения с табличными значениями стандартного нормального распределения (при уровнях значимости 0.05, 0.01 и 0.001) (разработчик В.С. Каменецкий). Для избираемых сравниваемых групп (а также для отдельных популяций нейронов, проявляющих определенный одинаковый тип ответов) программно выводились усредненные перистимульные кумулятивные и разностные гистограммы (рассчитывалось значение $F = \frac{N-p}{n}$, где N – количество престимульных спайков, n – количество постстимульных спайков) для всего массива зарегистрированных нейронов (Рис. 3 В, Г). В гиппокампальной формации информационный поток через трисинаптическую цепь входит от энторинальной коры к зубчатой извилине (проецируется через перфорантный путь). Мшистые волокна проецируются от зубчатой извилины к пирамидным клеткам региона СА3, которая в свою очередь через коллатерали Шаффера проецируется к пирамидальным нейронам СА1 (Рис.2 А), поэтому регистрируемая нами активность нейронов в СА1 фактически отражает активность и в СА3 [Rudy J.W., 2008].

Биохимические исследования. Для выделения комбинированной фракции изоформ Nox из ЦНС были изъяты головной мозг (отделяли гиппокамп и амигдалу) и спинной мозг. Для получения антител при выделении Nox используется детергент, который в некоторой степени денатурирует этот фермент [Симонян и др., 1995]. Для предотвращения денатурации был разработан способ выделения фракции комбинированных изоформ или одной изоформы Nox из клеточных и внутриклеточных мембран и мембранных экзосом млекопитающих [Симонян и др., 2014], исключающий применение детергента и основанный на явлении гемоглобин-индуцирующего избирательного отщепления (релизинга) Nox из преречисленных биомембран. Гомогенизацию тканей ЦНС (1г в 20 мл воды) осуществляли стеклянным гомогенизатором с тефлоновым пестиком (2 мин при 4°C и 1000 об/мин). Затем к гомогенизатам добавляли свежий ферригемоглобин из гемолизата эритроцитов человека и

инкубировали при 37°C и pH 7,4-8 в течение часа. Далее инкубационные смеси с pH 5,6 центрифугировали при 10000xg в течение 20 мин. Выделение и очистка мембран клеточных компонентов тканей крыс. Клеточные компоненты из печени, селезенки и легких выделяли дифференциальным центрифугированием гомогенатов тканей (по 5 г печени, 2 г селезенки и 4 г легких) в 0,25М сахарозе по 10 мл/г тканей. Ядра клеток выделяли при центрифугировании гомогената 2000 xg, в течение 10 мин. Из супернатантов митохондрии осаждали центрифугированием при 12000xg 15 мин. Из полученного супернатанта мембраны клеток осаждали центрифугированием при 5000xg при pH 5,6 в течение 10 мин. После осаждения клеточных мембран супернатант отделяли для выделения Nox из плазматических мембран цитоплазмы. Осажденные фракции ядер, митохондрий и мембран клеток гомогенизировали водой (1:50 об/об) для получения мембран этих формирований и удаления водорастворимых антиоксидантов и солей. Из крови крыс (по 4-5 мл) эритроциты подвергали самоосаждению при 4°C в течение 2 часов. После отделения клеточных компонентов плазмы, осадок эритроцитов промывали физраствором (1:400 об/об) и окончательно осаждали центрифугированием при 5000xg, в течение 10 мин. Очищенные эритроциты подвергали гемолизу в воде (1:20 об/об) с перемешиванием гемолизата в течение 10 мин. Эритроцитарные мембраны осаждали при pH 5,6 при центрифугировании в течении 10 мин при 5000xg. Далее эритроцитарные мембраны три раза промывали водой (1:500) для удаления следов солей и других водорастворимых белков. После центрифугирования раствора сыворотку крови отделяли для выделения экстрацеллюлярной Nox (eNox) из локализованных в сыворотке наночастиц – экзосом [Simonyan R.M., et al., 2014]. Выделение фракции изоформ Nox из очищенных мембран клеточных компонентов, из плазматических мембран цитоплазмы, из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки. Первичные фракции изоформ Nox из мембран приведенных биосистем выделяли лицензированным способом, используя явление комплексообразования между очищенным ферригемоглобином (5-10µM) и изоформами Nox мембран этих клеточных компонентов, при pH 7,4-8, после инкубации растворов при 37°C в течение 2ч. После 25-30-ти кратного разбавления этих фракций и центрифугирования при 10000xg в течение 20 мин, супернатанты клеточных компонентов

подвергали ионообменной хроматографии. Фракцию экстрацеллюлярной Noh (eNoh) из экзосом сыворотки крови после разбавления таким образом подвергали ионообменной хроматографии. Фракции обогащенных изоформ Noh из колонок с ДЕ-52 элюировали 0,01М калий фосфатным буфером, рН7,4. eNoh из колонки с ДЕАЕ А-50 элюировали 0,03 М КФБ и после разбавления водой (25 раз) концентрировали на колонке с ДЕ-52, из которой eNoh элюировали 0,03М калий фосфатным буфером [Симонян Р., и др., 2014].

Определение NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ Noh.

НАДФ-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Noh определяли методом нитротетразолиевого синего. За единицу O_2^- -продуцирующей активности изоформ Noh принимали количество этого фермента, который на 50% стимулирует образование формазана при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами [Фесчан С.М., и др., 2013]. Удельную НАДФ-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Noh определяли в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки или 1 г тканей. В ходе работ были использованы центрифуги К-24 («Yanetski», Германия) и спектрофотометр «Hitachi - 2000», Япония). Расчетное удельное содержание изоформ Noh определяли по плотности характерного максимального оптического поглощения (в оптических единицах – "о.е.") при 530 нм (β - полоса поглощения) для 1 мл Noh, выделенного из 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки или 1 г тканей. Статистическую обработку результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности «Р». Исследования проведены на базе лаборатории метаболизма активных форм кислорода Института биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА под руководством профессора М.А.Симоняна, за что выражаем благодарность.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

С целью электрофизиологического исследования вызванной активности нейронов гиппокампа при высокочастотной (ВЧС) стимуляции энторинальной коры крыс на экспериментальной модели диабета второго типа, выполнены эксперименты на 20 крысах-самцах альбиносах весом 230 ± 20 г., из которых 10 животных служили в качестве контрольной группы (употребляли обычную питьевую воду) и 10 животных – в качестве группы Фруктоза (употребляли только 20% фруктозную питьевую воду в течение 6 недель ежедневно).

У 10 крыс предварительный уровень глюкозы в плазме составлял $5,07 \pm 0,2$ мМ/л, а спустя 3 нед и 6 недель после выпивания 20% фруктозы – ($5,33 \pm 0,2$ $P=0,38$ и $5,97 \pm 0,3$ мМ/л $P<0,03$ соответственно) (Рис. 1 А). Наши данные о повышении уровня глюкозы после потребления Ф, согласуются с данными Ahangarpour [Ahangarpour A., et al., 2011], показавшими, что употребление 20% фруктозы вызывает повышение концентрации глюкозы в плазме. Это указывает на то, что животные в нашем эксперименте соответствовали модели диабета второго типа. Более того, у мышей, употребляющих 20% фруктозную воду в течение 4 недель гипергликемия, гиперинсулинемия сопровождалась нарушенной чувствительностью к инсулину [Zhao Y., et al., 2014; Toop C., Gentili Sh., 2016].

In vivo электрофизиологическое экстраклеточное исследование активности единичных нейронов гиппокампа, вызванной на стимуляцию энторинальной коры, и последующий анализ импульсного потока единичных нейронов выявил формирование различных комбинаций ответов в виде учащения импульсного потока - тетанической потенциации (ТП) и посттетанической потенциации (ПТП), а также урежения импульсного потока – тетанической депрессии (ТД) и посттетанической депрессии (ПТД) в группах Контроль и Фруктоза. Зарегистрированы также смешанные комбинации ответов – ТД ПТП и ареактивные нейроны. Ниже представлен анализ синаптической активности нейрональных единиц поля СА1 в группе Контроль ($n = 294$ нейрона) и Фруктоза ($n = 190$

нейронов), который по существу отражает также функциональную активность нейронов поля СА3 и дентатной извилины.

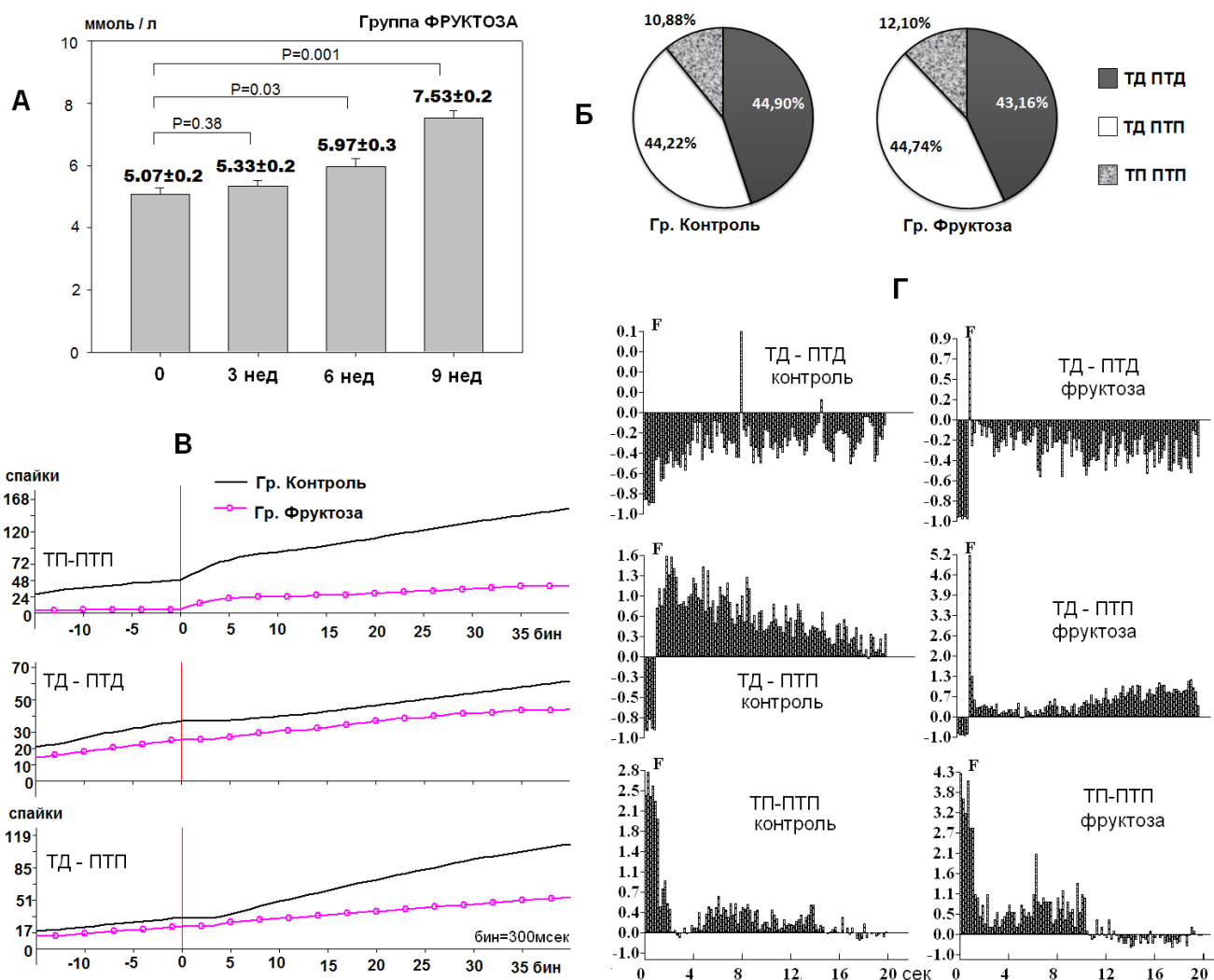


Рис. 3 А – уровень глюкозы в плазме крови. Б – процентное долевое соотношение типов ответов для указанных групп. В – кумулятивные усредненные кривые для популяций нейронов гиппокампа с ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами. Г – разностные, или остаточные перистимульные гистограммы для популяций нейронов гиппокампа с ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами; $F = \frac{N - n}{n}$, где N – количество престимульных спайков, n – количество постстимульных спайков и если $n = N$, то $F = 0$.

В Контроле баланс типов зарегистрированных ответов таков (Рис. 3 Б) – ТД-ПТД (в 132 из 294 нейронов – 44,90%), ТД-ПТП (в 130 из 294 нейронов – 44,22%), ТП+ПТП (в 32 из 294 нейронов – 10,88%). В группе Фруктоза (спустя 6 недель) долевое соотношение популяций нейронов с теми же типами ответов претерпевает следующее перераспределение: ТД-ПТД

(в 82 из 190 нейронов – 43,16 %), ТД-ПТП (в 85 из 190 нейронов – 44,74 %), ТП-ПТП (в 23 из 190 нейронов – 12,10 %) (Рис. 3 Б). Иными словами в гр. Фруктоза имеем увеличение процентного соотношения нейронов с ТП ПТП (12,10% вместо 10,88%) ответами и уменьшение нейронов с ТД ПТД ответами (43,16% вместо 44,90%). Рисунок 3Г, демонстрирующий выраженность ответов на время ВЧС и постстимульный отрезок на основе усредненных разностных гистограмм, для групп контроль и Фруктоза, свидетельствует о более высоком уровне тормозных ответов (ТД-ПТД) в группе Контроль, по сравнению с таковыми в группе Фруктоза. Возбудительные ответы (ТП-ПТП) в группе Фруктоза более выражены по сравнению с контролем. В популяции нейронов с ТД-ПТП ответами торможение на время ВЧС энторинальной коры выражено в одинаковой мере в сравниваемых экспериментальных группах, однако наблюдается более богатый спектр выраженности постстимульного возбуждения (смотри. ПТП компоненту в ТД-ПТП ответах Рис. 3Г). Рисунок 3В демонстрирует сравнительные усредненные кумулятивные кривые спайковой активности популяций нейронов, проявляющих ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответы, свидетельствуя о значительно низком по сравнению с контролем уровне престимульной и постстимульной активности всех зарегистрированных нейронов в гр. Ф.

В группе Фруктоза диаграмма средней частоты перистимульной спайковой активности нейронов с ответами в виде ТП-ПТП (Рис 4 А) свидетельствует о 9-кратно выраженном возбудительном ответе на время ВЧС (19,87:2,19 спайк/сек). Согласно средней частоте в нейронах с ответами в виде ТД-ПТД (Рис.4Б) ТД выражена 22 раза (4,68:0,21) (Таблица 2 для группы Фруктоза). В популяции нейронов с ответами в виде ТД-ПТП (Рис.4В) ТД выражена 13,3 раза (3,73 : 0,28), а ПТП 1,6 раза (6,04 : 3,73). В то время как таковые у интактных крыс в группе Контроль указывают на: 4-кратно выраженные возбудительные ответы на время ВЧС (32.45 : 8.11 спайк/сек) в нейронах с ТП-ПТП ответами; в нейронах с ответами в виде ТД-ПТД ТД выражена 8,6 раза (6,53 : 0,76), а ПТД 1,4 раза (6,53 : 4,66); в популяции нейронов с ответами в виде ТД-ПТП ТД выражена 7,9 раза (5,78 : 0,73), а ПТП 1,7 раза (9,88 : 5,78) (Таблица 2 для гр. Контроль). Сравнительные перистимульные усредненные кумулятивные гистограммы для указанных типов ответов в группе Фруктоза (Рис.4 Г) демонстрируют практически одинаковый уровень пре- и

частоты спайков для каждой группы с указанием цифровых значений средней частоты спайкинга (спайк/сек) в реальном времени 20 сек до ВЧС ($M_{\text{ПРЕ}}$), 20 сек после ВЧС ($M_{\text{ПОСТ}}$) и на время ВЧС в течение 1 сек ($M_{\text{ВЧС}}$); n – количество нейронов, частота спайковой активности которых усреднена на данной диаграмме. Г – сравнительные перистимульные усредненные кумулятивные гистограммы для указанных типов ответов.

Таблица 2.

Цифровые значения на перистимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов с указанными типами ответов для группы Контроль (гиппокамп) и для группы Фруктоза (гиппокамп).

↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Группа контроль (гиппокамп)	Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов $n=294$	M престимул спайк/сек	M высокочастотн. стимуляции спайк/сек	M постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП	10.88 % $n=32$	8,11	32,45 ↑4х	10,97 ↑1,4х
	ТД-ПТП	44.22 % $n=130$	5,78	0,73 ↓7,9х	9,88 ↑1,7х
	ТД-ПТД	44.90 % $n=132$	6,53	0,76 ↓8,6х	4,66 ↓1,4х
Группа Фруктоза (гиппокамп)	Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов $n=190$	M престимул спайк/сек	M высокочастотн. стимуляции спайк/сек	M постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП	12,10 % $n=23$	2.19	19.87 ↑9 х	3.0 ↑1,4 х
	ТД-ПТП	44,74 % $n=85$	3,73	0,28 ↓13,3х	6,04 ↑1,62х
	ТД-ПТД	43,16 % $n=82$	4,68	0,21 ↓22 х	3,45

постстимульной активности в популяциях нейронов с ТД ПТД / ТД ПТП ответами и значительно низкий уровень престимульной активности в нейронах, проявляющих ТП ПТП; в контроле характерен практически одинаковый уровень престимульной активности во всех популяциях нейронов (Рис. 4Г и Таблица 2). Эти данные свидетельствуют о патологическом состоянии фоновой (престимульной) спайковой активности нейронов, проявляющих ТП ПТП ответы в гр. Фруктоза, связанной с аномальными механизмами постсинаптических АМРА-рецепторов при диабете [Vaithianathan, et al., 2003].

Диабет ассоциируется с депрессией и некоторые изучения указывают на депрессогенные особенности диабета [Pan A. et al., 2010]. У крыс на фруктозной диете выявлена гиппокампальная инсулиновая резистентность, ассоциированная со снижением формирования LTD в нейронах гиппокампа и дефицитом гиппокампальной декларативной памяти [Mielke J.G., et al., 2005; Ross A.P., et al., 2009]. С этими данными согласуются низкие уровни перистимульной активности в нейронах гиппокампа (Рис. 3В). В то время как увеличение доли нейронов с ТП ПТП и повышенная выраженность возбуждательных и тормозных ответов (Таблица 2) подкрепляет данные о роли гипергликемии и инсулиновой резистентности в регулировании рецепторов NMDA [Trudeau F. et al., 2004].

3.2. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ АМИГДАЛЫ В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

In vivo электрофизиологическое экстраклеточное исследование активности единичных нейронов амигдалы, вызванной на стимуляцию гиппокампа, и последующий анализ импульсного потока единичных нейронов выявил формирование различных комбинаций ответов в виде учащения импульсного потока - тетанической потенциации (ТП) и посттетанической потенциации (ПТП), а также урежения импульсного потока – тетанической депрессии (ТД) и посттетанической депрессии (ПТД) в группах Контроль и Фруктоза. Зарегистрированы также смешанные комбинации ответов – ТД ПТП и ареактивные нейроны. Согласно детальному анализу на основе цифровых показателей

Таблица 3.

Цифровые значения на перистстимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов с указанными типами ответов для группы Контроль (амигдала) и для группы Фруктоза (амигдала).

↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Группа Контроль (амигдала)	Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов Сумм=168 кл	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП	25 % n=42	2.66	13.23 ↑5x	3.71 ↑1.4x
	ТД-ПТП	25 % n=42	1.83	0.32 ↓5.7x	2.86 ↑1.6x
	ТД-ПТД	35.7 % n=60	3.52	1.07 ↓3.3x	2.63 1.3x
	ареактив	14.3 % n=24	4.67		4.67
Группа Фруктоза (амигдала)	Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов Сумм=158 кл	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП	15.8 % n=25	2.67	5.64 ↑2.1x	3.79 ↑1.4x
	ТД-ПТП	27.2 % n=43	3.05	0.78 ↓3.9x	4.53 ↑1.5x
	ТД-ПТД	43 % n=68	3.95	1.31 ↓3x	2.94 ↓1.3x
	ареактив	13.9 % n=22	3.17	3.33	3.19

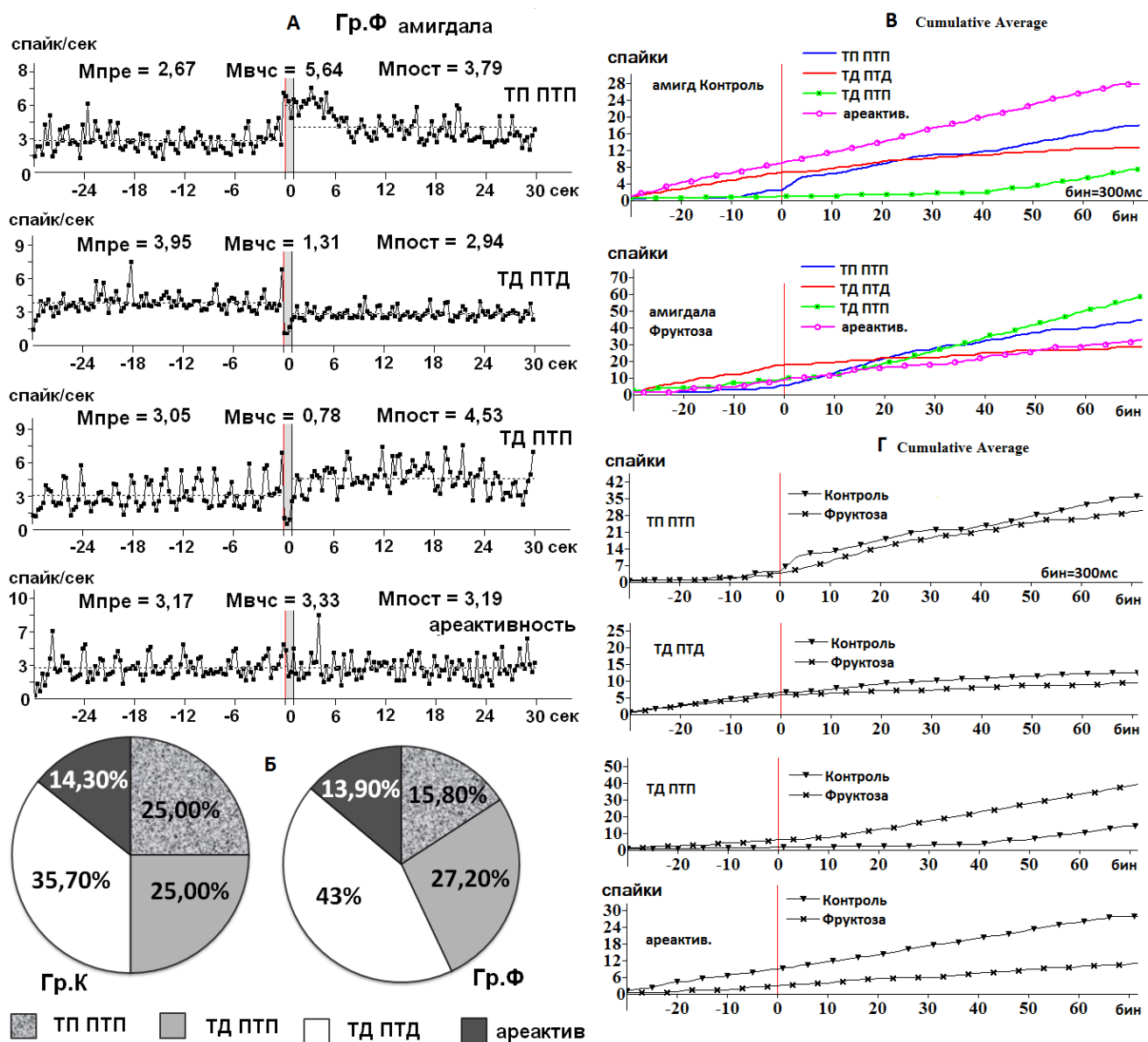


Рис. 5. А – перистимульные диаграммы средней частоты, построенные на основе пре- и постстимульных проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы при стимуляции гиппокампа в реальном времени 30 сек до стимуляции (Мпре), 30 сек после стимуляции (Мпост) и на время высокочастотной стимуляции (Мвчс), проявляющих указанный тип ответов (ТП ПТП, ТД ПТД, ТД ПТП) в группе Фруктоза; Б – процентное долевое соотношение указанных типов ответов из общего числа зарегистрированных нейронов в группах Контроль и Фруктоза; В – сравнительные куммулятивные кривые для популяций нейронов амигдалы с указанным типом ответов в группах Контроль и Фруктоза; Г – сравнительные куммулятивные кривые в группах Контроль и Фруктоза для указанных типов ответов.

усредненной частоты спайковой активности до (Мпрестимульный), после (Мпостстимульный) стимуляции и на время тетанизации (Мвчс) в нейронах амигдалы (таблица 3) в Гр.Ф тетаническая потенциация на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 2,1 раза ($5,64 : 2,67$ спайк/сек) (Рис. 4А) (таковые в Гр.К выражены в 5 раз). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 3 раза ($3,95 : 1,31$ спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 3,9 раза ($3,05 : 0,78$ спайк/сек) (Рис. 5А) (таковые в Гр.К выражены соответственно в 3,3 и 5,7 раза) (таблица 3). В группах Контроль и Фруктоза сравнительный анализ усредненных кумулятивных гистограмм для популяций нейронов, проявляющих данный тип ответов (Рис. 5В) выявил следующие особенности. В группе Фруктоза наиболее высокий уровень спайкинга зарегистрирован на престимульном временном отрезке нейронов с ТД ПТД, а также на постстимульном временном отрезке нейронов с ТД ПТП ответами (Рис. 5В).

Сравнительный анализ кумулятивных гистограмм в группах Контроль и Фруктоза (Рис. 5Г) выявил: 1) в нейронах амигдалы с ТП ПТП ответами практически одинаковый уровень престимульных спайков и более высокий уровень количества спайков на время ВЧС и постстимульное время в группе Контроль; 2) в нейронах с ТД ПТД ответами практически одинаковый уровень спайков на престимульный и ВЧС временной отрезок и более высокий уровень постстимульных спайков в группе Контроль; 3) в нейронах с ТД ПТП ответами наиболее низкий уровень пре- и постстимульных спайков в группе Контроль; 4) в ареактивных нейронах амигдалы более низкий уровень перистимульного спайкинга зарегистрирован в группе Фруктоза. В группе Фруктоза зарегистрированы 158 нейронов амигдалы, из которых 25 (15,8%) при ВЧС гиппокампа проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 43 нейрона (27,2%) – в виде ТД-ПТП, 68 нейронов (43%) – в виде ТД-ПТД, и в 22 нейронах (13,9%) не зарегистрированы какие-либо ответы (Рис. 5Б), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС ($43+27,2=70,2\%$) и равнозначный баланс посттетанической потенциации ($15,8+27,2=43\%$) и посттетанической депрессии (43%). В Гр.К зарегистрированы 168 нейронов, которые проявляли следующие типы ответов: ТП-ПТП (25%, 42 нейрона), ТД-ПТП (25%, 42 нейрона), ТД ПТД (35,7%, 60 нейронов) (Рис. 5Б и таблица 3). Иными словами,

процентное соотношение торможения на время ВЧС составляет 60,7% (35,7+25%), что значительно превалирует над тетанической потенциацией (25%), в то время как в посттетанических ответах доминирует посттетаническая потенциация (25+25=50%) (посттетаническая депрессия составляет 35,7%). Ареактивные единицы составляли 14,3% (24 нейрона) (Рис. 5Б и таблица 3).

Таким образом, выявлены электрофизиологические показатели аномальной синаптической активности нейронов сети энторинальная кора-гиппокамп-амигдала, характеризующейся нарушением баланса и интенсивности возбуждательных/тормозных вызванных ответов в условиях метаболических нарушений, вызванных длительным потреблением диетической фруктозы. Амигдала – неотъемлемый компонент нейрональных цепей, вовлеченных в формирование длительной памяти, и при этом оказывающий синергическое с гиппокампом действие [Richter-Levin G., et al., 2000]. Амигдала модулирует пластичность гиппокампа. Специфическая роль амигдалы в формировании памяти является предметом дебатов. Отмечена активация MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated-kinase) в амигдале при пространственном обучении [Akirav I., et al., 2001]. Активация MAPK/ERK вероятно активирует каскад молекулярных событий, ведущих к синтезу новых протеинов и консолидации долговременной памяти. Таким образом, специфическая активация киназ путем стресса и пространственного обучения поддерживает представление о том, что пластичность амигдалы содействует некоторым аспектам долговременного эмоционального насыщения памяти. Анатомические исследования выявили, что наиболее значительным источником афферентации базолатеральной амигдалы является гиппокампальная формация. Эти проекции происходят от CA1, вентрального субикулума и энторинальной коры [Swanson L. W. et al., 1986]. Изучения с внутриклеточной регистрацией подтверждают, что эти проекции являются моносинаптическими и глутаматэргическими [Mello L. E., et al., 1992]. Проекция гиппокамп-базолатеральная амигдала обладает специфической ролью в Павловском условном рефлексе — доставке информации о контекстуальном стимуле от гиппокампа к базолатеральной амигдале. Марен и соавторы [Maren S., et al., 1995] показали, что ВЧС вентрального ангулярного

пучка вызывает устойчивую LTP. Более того, электрическое повреждение регионов гиппокампа, проецируемых к базолатеральной амигдале, исключают Павловский рефлекс к контекстуально-обусловленному стимулу. Эти результаты указывают на изменения нейрональных ответов в базолатеральной амигдале вслед за различными гиппокамп-индуцированными манипуляциями.

Наши данные в целом согласуются с литературными обзорами относительно роли глутаматной системы в пластичности мозга при диабете. Так, долговременная потенция является одной из форм синаптической пластичности и одним из важных электрофизиологических параметров, содействующих процессам обучения и памяти [Massey, Bashir, 2007] и дефекты длительной потенции в гиппокампе у диабетических животных возникают как следствие аномальных глутаматных рецепторов [Trudeau F., et al., 2004]. С электрофизиологической точки зрения, снижение амплитуды и длительные задержки компонентов вызванных потенциалов были описаны в ЦНС взрослых лиц с сахарным диабетом как первого так и второго типа [Suzuki C., et al., 2000]. Используя экспериментальный подход облегчения парного импульса Biessels и др. (2002) обнаружили, что облегчение парных импульсов не модулировалось в стрептозотоциновой модели диабета первого типа, подтверждая, что хронический диабет у крыс не наносит ущерба пресинаптическим свойствам, но предпочитает постсинаптические механизмы (например, регуляцию AMPA рецепторов), способствующих поддержанию долгосрочной потенции [Biessels G. J., et al., 2002]. Электрофизиологические эксперименты указывают, что диабет стрептозотин индуцированных крыс связан с биофизическими аномалиями AMPA-рецепторов [Vaithianathan T., et al., 2003]. Длительная депрессия синаптической функции является другой формой активность-зависимой синаптической пластичности. Увеличивается число доказательств того, что выражение синаптической депрессии опосредовано модификациями постсинаптических токов, вызываемых AMPA подтипами глутаматных рецепторов [Malinow R., et al., 2002]. В течение высокочастотной стимуляции, гиперактивность рецепторов AMPA, видимо, ответственна за увеличение как доли нейронов с ТП ПТП ответами, так большей выраженности таковых. Следовательно, можно утверждать, что дефекты в синаптической пластичности на ранних стадиях

диабета в большей степени выявляются в виде так называемых эффектов окклюзии, чем повышенной чувствительности к эксайтотоксичности, поскольку в гр.Ф популяции всех нейронов проявляли значительно низкий уровень перистимульной активности по сравнению с гр.К (Рис. 3В). В этой связи, диабет должен привести к стимуляции «молчащих» синапсов в гиппокампе: на основе электрофизиологических исследований доказано, что экспрессия долгосрочной потенциации связана с раскрытием функциональных рецепторов AMPA, которых либо нет в постсинаптических мембранах, или они являются электрофизиологически «молчащими» [Isaac J.T., et al., 1995]. Такие изменения ответов могут быть вызваны увеличением числа рецепторов AMPA или их конформациями [Song I., et al., 2002]. Нами показано увеличение доли ТП ПТП ответов (12,10% вместо 10,88% в норме). Интересно, что у «Zucker diabetic fatty rats» спустя 5-9 недель после диабета было редуцировано [3Н]глутамат связывание с NMDA рецепторами поля CA1 гиппокампа. Эти данные указывают, что при данной модели гипергликемия может иметь биохимические последствия, которые благотворно снижают функционирование NMDA рецепторов, что, однако, не лимитирует наличие нейродегенеративных процессов и не превентивует когнитивные и электрофизиологические дефекты [обозревается в Trudeau F., et al., 2004]. Эта интригующая возможность снижения NMDA-индуцированного клеточного повреждения при диабете второго типа, очевидно, имело место в нашей модели. Именно этим можно объяснить снижение доли возбудительных ответов в нейронах амигдалы в группе Фруктоза по сравнению с гр. интактный Контроль (рис 5Б) при одновременном наличии значительно низкого уровня фоновой активности нейронов гиппокампа и амигдалы (согласно кумулятивным кривым на рис. 3В и рис. 5В, 4Г) и выраженности тетанической потенциации (согласно диаграммам перистимульной средней частоты на рис 5А; таблицы 3) во всех популяциях нейронов амигдалы группы Фруктоза.

Известно что при долговременной потенциации начальной фазой является индуцируемый ВЧС вход ионов Ca^{2+} . Ответ постсинаптического нейрона на ВЧС представлен в сети как ряд молекулярных событий в дендритном шипике, приводящий к выбросу нейромедиатора из пресинаптической терминали. Взаимодействие

нейромедиатора с ионотропными AMPA рецепторами приводит к входу ионов натрия, деполяризации синаптической мембраны, что в свою очередь приводит к активации NMDA рецепторов и входу ионов кальция в клетку. Входящий кальций в цитоплазме запускает каскады регуляторных событий, обеспечивающих перемещение AMPA рецепторов и сопутствующих белков в составе эндосом при помощи актин - зависимых белков из цитоплазматического пула шипика к мембране и встраивание дополнительных AMPA в активную зону синапса. Два типа ионотропных рецепторов – AMPA и NMDA в синапсах нейронов гиппокампа имеют разное физиологическое значение. AMPA являются в некотором смысле “рабочими” рецепторами синапса, ответственными за передачу сигнала. Открытие каналов этих рецепторов происходит при любых потенциалах постсинаптической мембраны, а открытие каналов NMDA происходит только при деполяризации постсинаптической мембраны. Число разных типов рецепторов в активной зоне синапса варьируемо для AMPA рецепторов (в диапазоне 5-200) и стабильно для NMDA рецепторов (1–5) [Racca C., et al., 2000]. Высокочастотная стимуляция инициирует быстрое (30–60 сек) встраивание в мембрану из депо глутаматных рецепторов при участии транспортных белков. На этом этапе важна стабильность существующего цитоскелета [Krucker T., et al., 2000]. Результатом перемещения эндосом к мембране является встраивание дополнительных рецепторов, приводящей к увеличению синаптической эффективности, площади активной зоны и объема шипика. Указанные процессы, вероятно, также имели воздействие в формировании наших данных относительно выраженности ТП и/или ТД и процентного соотношения ТП и/или ТД ответов, а также числа спайков (интенсивность спайкинга) на престаимпульсы и постстимульные временные отрезки в группе Фруктоза. Оксидативный стресс играет важную роль для фенотипов метаболического синдрома, вызванного фруктозной диетой (даже при 10% (вес/объем) с питьевой водой в течении 3 недель) [Fariña J.P., et al., 2013]. Поэтому важно отметить существующее мнение о том, что дальнейшие исследования должны детерминировать различия вовлеченности NMDA-индуцированной и / или окислительный стресс-индуцированной токсичности в гиппокампе в дефекты синаптической пластичности диабетических животных [Trudeau

F., et al., 2004]. Поэтому, для более углубленного разъяснения механизмов патологических изменений на использованной нами модели, предпринята попытка выявления связи маркеров окислительного стресса с проявлениями синаптической пластичности в нейронах ЦНС (смотри далее подглава 3.11.).

3.3. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГЛИБЕНКЛАМИДА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА КРЫС В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Эксперименты выполнены на 10 крысах-самцах альбиносах: 5 животных употребляли только питьевую воду на 20% фруктозе в течение 6 недель ежедневно (группа Фруктоза) и 5 животных употребляли питьевую воду на 20% фруктозе в течение 6 недель ежедневно плюс Глибенкламид (5 мг/кг перорально) с 3 по 6 недели (группа Фруктоза+Глибенкламид). В нашем эксперименте у 6 крыс в группе Ф предварительный уровень глюкозы в плазме составлял $91,30 \pm 9,11$ мг/дцл, а спустя 3 нед 6 недель после выпивания 20% фруктозы – $(95,67 \pm 8,64 \text{ } P=0,4$ и $107,17 \pm 11,29 \text{ } P=0,02$, соответственно). Эти данные согласуются с представлениями о наличии метаболического синдрома [Тоор С., Gentili Sh., 2016]. У 5 крыс в группе Ф+Г предварительный уровень глюкозы в плазме составлял $81,4 \pm 11,26$ мг/дцл, а спустя 3 нед после употребления 20% фруктозы – $94,60 \pm 11,55$ ($P=0,1$), а спустя 6 недель после Фруктозы (из коих 3 недели получали Глибенкламид) – $79,60 \pm 14,06$ мг/дцл ($P=0,82$).

В группе Фруктоза у 5 крыс зарегистрировано 190 нейрона гиппокампа, а в группе Фруктоза+Глибенкламид у 5 крыс – 169 нейронов. Выраженность ответов оценивается согласно значениям средней частоты на престимульное время ($M_{\text{престим.}}$), постстимульное время ($M_{\text{постстим.}}$) и время ВЧС ($M_{\text{вчс}}$). На рисунке 6 представлен анализ синаптической активности нейрональных единиц поля СА1 в группе Фруктоза ($n=190$ нейрона) и Фруктоза+Глибенкламид ($n=169$ нейронов). В группе Фруктоза ТД ПТД ответы зарегистрированы в 82 из 190 нейронов (43,16%), ТД ПТП – в 85 из 190 нейронов (44,74%) и ТП ПТП – в 23 из 190 нейронов (12,10%) (Рис. 6 А, В), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (87,9%) и возбуждения на постстимульное

время (56,8%). В группе Фруктоза+Глибенкламид ТД ПТД ответы зарегистрированы в 89 из 169 нейронов (52,70%), ТД ПТП – в 53 из 169 нейронов (31,40%) и ТП ПТП – в 7 нейронах (4,10%). 9,50 % зарегистрированных нейронов проявляли лишь ТД, а 2,40% –

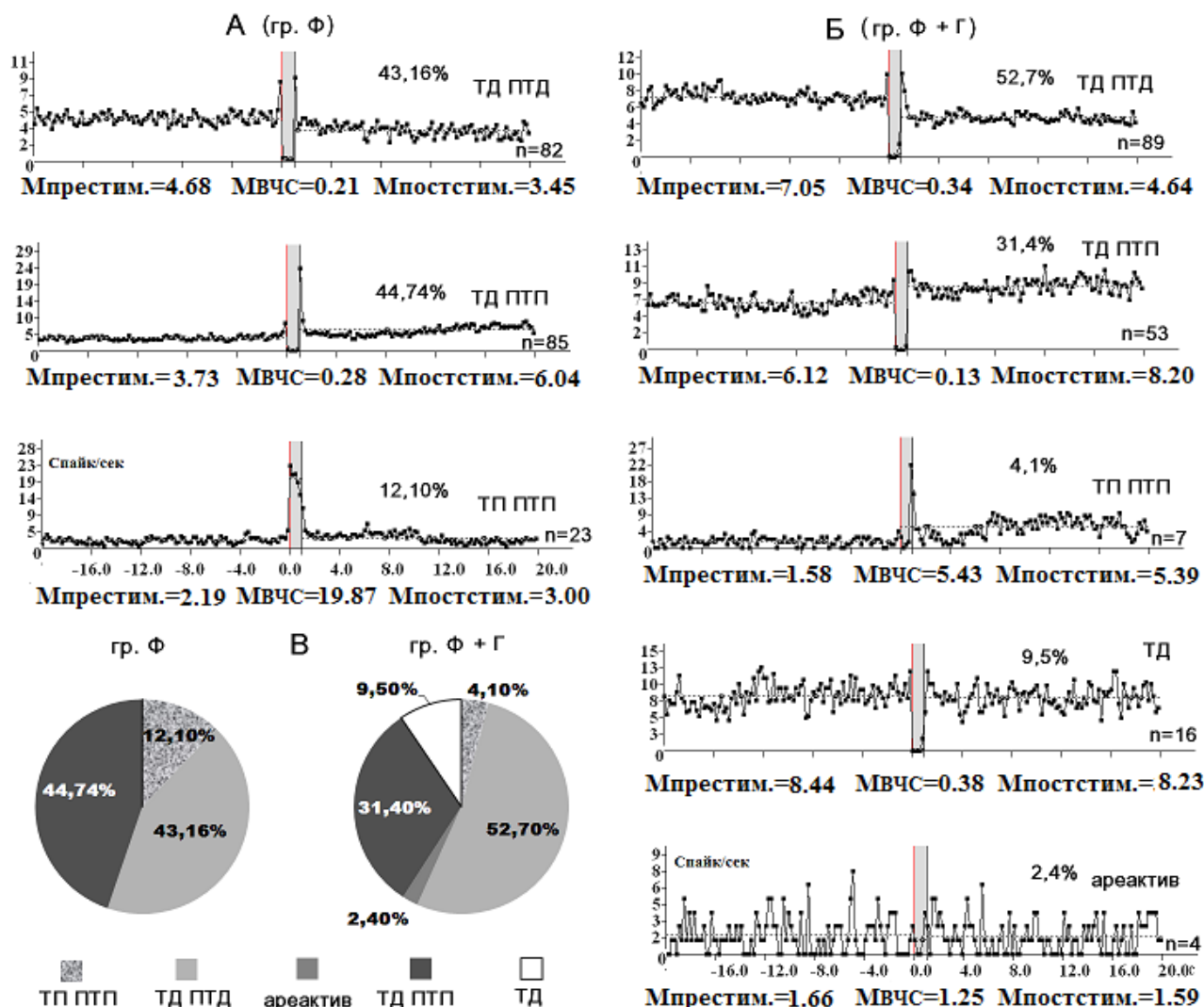


Рис. 6 А, Б - перистимульные диаграммы средней частоты импульсного потока единичных нейронов гиппокампа, проявляющих указанный тип ответов (тетаническая депрессия-посттетаническая депрессия - ТД ПТД, тетаническая депрессия-посттетаническая потенция - ТД-ПТП и тетаническая потенция-посттетаническая потенция - ТП-ПТП) при стимуляции энторинальной коры в группе Фруктоза (А) и в группе Фруктоза+ Глибенкламид (Б). Под каждой диаграммой приведены цифровые значения средней частоты импульсного потока в реальном времени 20 сек до (Мпрестимульный), 20 сек после (Мпостстимульный) стимуляции, включая время ВЧС (Мвчс). В - процентное долевое соотношение типов ответов для указанных групп.

ареактивность (Рис. 6 Б, В). Распределение типов ответов можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (31,4 + 52,7 + 9,5 = 93,60%) и на постстимульное время (52,70%). В главе 3.1 нами (гиппокамп Ф) показано, что спайковая престаимпульная/ постстимульная активности всех зарегистрированных нейронов (с ТП-ПТП, ТД-ПТП и ТД-ПТД ответами) в группе Фруктоза значительно ниже по сравнению с таковыми в норме. В группе Фруктоза+Глибенкламид престаимпульный уровень спайковой активности превышает таковые в группе Фруктоза, приближая их к норме. Так в популяции нейронов, проявляющих ТД ПТД ответы $M_{\text{престим}}=4,68$ спайк/сек в гр Ф и $M_{\text{престим}}=7,05$ спайк/сек в гр Ф+Г; в популяции нейронов, проявляющих ТД ПТП ответы $M_{\text{престим}}=3,73$ спайк/сек в гр Ф и $M_{\text{престим}}=6,12$ спайк/сек в гр Ф+Г (Рис. 6 А, Б).

Таблица 4

Цифровые значения на перистимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов с указанными типами ответов для группы Фруктоза +Глибенкламид (гиппокамп). ↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов n=169	М престаимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
ТП-ПТП	4,1 % n=7	1,58	5,43 ↑3.4x	5,39 ↑3.4x
ТД-ПТП	31.4 % n=53	6,12	0,13 ↓47 x	8,20 ↑1.3x
ТД-ПТД	52.7 % n=89	7,05	0,34 ↓21 x	4,64 ↓1.5 x
ТД	9,5 % n=16	8,44	0,38 ↓22 x	8,23
Ареактив	2,4 % n=4	1,66	1,25	1,59

Анализ выраженности ответов на время ВЧС и постстимульный отрезок на основе перистимульных диаграмм средней частоты (Таблица 4) позволяет заключить: 1) в

сравниваемых группах Φ и $\Phi+\Gamma$ урежение спайковой активности на время ВЧС (ТД ответы) имеет практически идентичный уровень (0,21 и 0,34 спайк/сек, соответственно, для нейронов, проявляющих ТД ПТД ; 0,28 и 0,13 спайк/сек, соответственно, для нейронов, проявляющих ТД ПТП) (Рис. 6 А, Б); 2) учащение спайковой активности на время ВЧС (ТП ответы) в гр Φ доходит до 19,87 спайк/сек (что девятикратно превышает престоимую частоту спайков), а в гр $\Phi+\Gamma$ – до 5,43 спайк/сек (что превышает престоимую частоту спайков в 3,4 раза) (Рис. 6 А, Б и Таблица 4). Согласно детальному анализу в Гр. Φ тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах гиппокампа с ТП-ПТП выражена 9 раз ($19.87 : 2.19$ спайк/сек) (таблица 2 и рисунок 6А) (таковые в Гр.К выражены в 4 раза). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 22 раза ($4.68 : 0.21$ спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 13.3 раза ($3.73 : 0.28$ спайк/сек) ((таблица в главе 3.1 и Рис. 6 А) (таковые в Гр.К выражены соответственно в 8.86 и 8.38 раза). В Гр. $\Phi+\Gamma$ ТП в нейронах гиппокампа с ТП-ПТП выражена 3,4 раз ($5.43 : 1.58$ спайк/сек) (рисунок 6Б и Таблица 4) (что близко к норме). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 21 раза ($7.05 : 0.34$ спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 47 раз ($6.12 : 0.13$ спайк/сек) (Рис. 6 Б и Таблица 4) (что намного превосходит норму). Фактически Глибенкламид снижает повышенный уровень ТП до уровня нормы, в то время как интенсивность ТД превосходит таковую и в норме и в гр. Φ . Учитывая, что в группе Фруктоза по сравнению с нормой в популяциях нейронов, проявляющих ТП ПТП и ТД ПТП возбуждение на время ВЧС и постстимульное время более выражено (см главу 3.1), можно утверждать о регулирующей роли Глибенкламида на возбудительные входы в сети энторинальная кора – гиппокамп.

3.4. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГЛИБЕНКЛАМИДА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ АМИГДАЛЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Программный анализ перистимульной активности для популяции нейронов амигдалы (Рис. 7 А, Б), проявляющих данный тип ответов на ВЧС гиппокампа, дает возможность оценки выраженности компонентов ответов на основе цифровых

показателей усредненной частоты спайковой активности до (Мпрестимульный), после стимуляции (Мпостстимульный) и на время тетанизации (Мвчс).

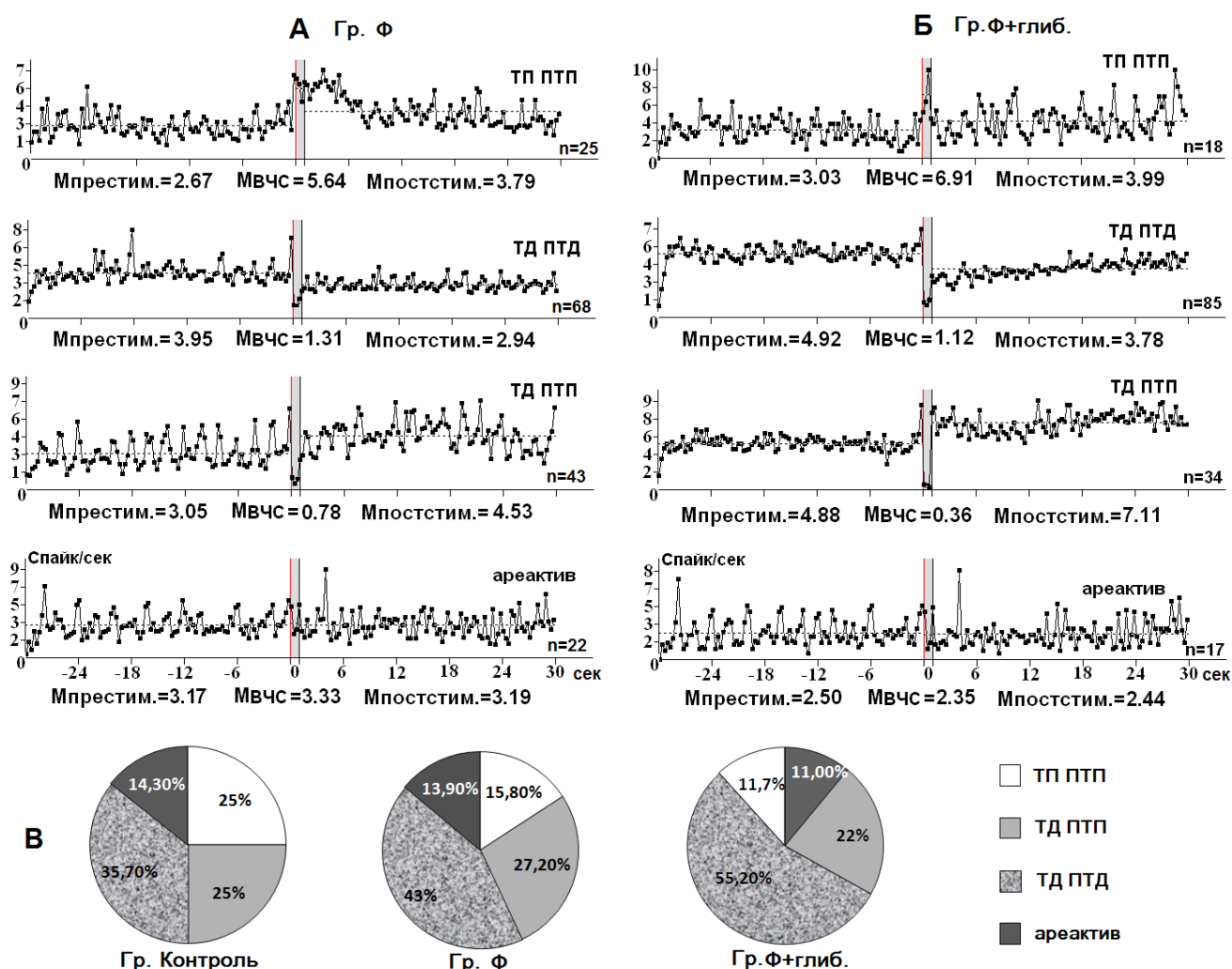


Рис. 7. А, Б – перистимульные диаграммы средней частоты, построенные на основе пре- и постстимульных проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы при стимуляции гиппокампа в реальном времени 30 сек до стимуляции (Мпре), 30 сек после стимуляции (Мпост) и на время высокочастотной стимуляции (Мвчс), проявляющих указанный тип ответов (ТП ПТП, ТД ПТД, ТД ПТП) в группах Фруктоза и Фруктоза+Глибенкламид; В – процентное долевое соотношение указанных типов ответов из общего числа зарегистрированных нейронов в группе Контроль, Фруктоза и Фруктоза+Глибенкламид

Так, согласно детальному анализу в Гр. Ф (Рис. 7 А) тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 2.1 раза (5.64 : 2.67 спайк/сек) (таковые в Гр. К выражены в 5 раз). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена

3 раза (3.95 : 1.31 спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 3.9 раза (3.05 : 0.78 спайк/сек) (таковые в Гр. К выражены соответственно в 3.3 и 5.7 раза). В Гр. Ф+Г (Рис. 7 Б и таблица 5) тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 2.28 раза (6.91 : 3.03 спайк/сек). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТПД выражена 4.39 раза (4.92 : 1.12 спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 13.5 раза (4.88 : 0.36 спайк/сек). Таким образом, в нейронах гиппокампа и амигдалы группы Ф+Г зарегистрировано повышение интенсивности депрессии на время ВЧС по сравнению с группами Фруктоза и Контроль.

Таблица 5.

Цифровые значения на перистимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов с указанными типами ответов для группы Фруктоза +Глибенкламид (амигдала).

↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов n=154 клеток	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
ТП-ПТП	11.7 % n=18	3.03	6.91 ↑2.28x	3.99 ↑1.3x
ТД-ПТП	22.1 % n=34	4.88	0.36 ↓13.5x	7.11 ↑1.47 x
ТД-ПТПД	55.2 % n=85	4.92	1.12 ↓4.39 X	3.78 ↓1.3x
аореактив	11 % n=17	2.50	2.35	2.44

В Гр. Ф зарегистрированы 158 нейронов амигдалы, из которых 25 (15.8%) при ВЧС гиппокампа проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 43 нейрона (27.2%) – в виде Д-ПТП, 68 нейронов (43%) – в виде ТД-ПТПД, и в 22 нейронах (13,9%) не зарегистрированы какие-либо ответы (Рис. 7 В), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (43+27,2=70.2%) и равнозначный баланс посттетанической потенции (15,8+27,2=43%) и посттетанической депрессии (43%).

В Гр. Ф+Г зарегистрированы 154 нейрона амигдалы, из которых 18 нейронов (11.7%) проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 34 нейрона (22.1%) – в виде ТД-ПТП, 85 нейронов (55.2%) – в виде ТД-ПТД, и 17 нейронов (11%) проявляли ареактивность (Рис.7 В и таблица 5), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (55,2+22,1=77.3%) и в посттетанических ответах (посттетаническая депрессия составляла 55.2%, а посттетаническая потенция - 33,8% (11,7+22,1%). В главе 3.2 уже отмечалось, что в Гр.К процентное соотношение торможения на время ВЧС составляет 60.7% (35,7+25%), что незначительно превалировало над тетанической потенциацией, в то время как в посттетанических ответах доминировали ПТП (25+25=50%), а ПТД составляла 35.7%. Ареактивные единицы составляли 14,3% (Рис.7 В).

Сравнение выраженности перистимульной спайковой активности в нейронах амигдалы групп Ф, Ф+Г с нормой на основе программно усредненных кумулятивных гистограмм (рис. 8) позволяет заключить: 1) в гр. Ф+Г уровень перистимульного спайкинга нейронов с ТД-ПТД ответами превышает таковые в норме и в группе Ф; 2) в популяции нейронов с ТД ПТП наиболее высокий уровень перистимульной активности зарегистрирован в группе Ф+Г; 3) постстимульная спайковая активность нейронов с ТП ПТП ответами в группах Ф и Ф+Глиб зарегистрирована ниже нормы; 4) перистимульная активность ареактивных нейронов амигдалы в группе Ф+Г значительно ниже таковых в норме

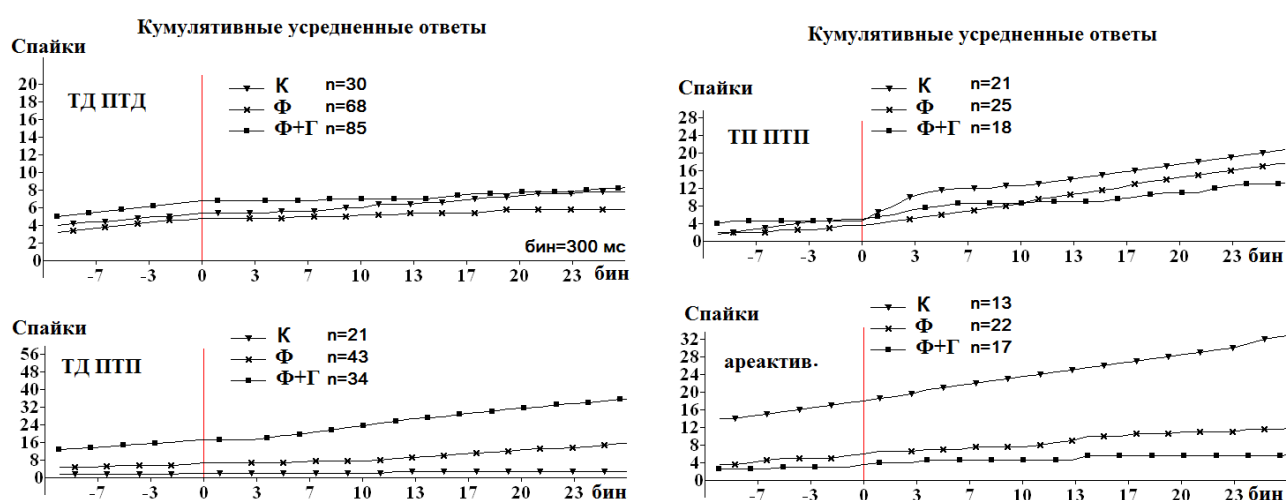


Рис. 8 Усредненные кумулятивные гистограммы для популяций нейронов амигдалы с указанными типами ответов в сравниваемых группах Ф, Ф+Глибенкламид и Контроль

3.5. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОДНОКРАТНОЙ ДОЗЫ ГЛИБЕНКЛАМИДА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА И АМИГДАЛЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Глибенкламид – препарат сульфонилмочевины, который используется для лечения диабета второго типа [Henquin J.C., 1992]. Он действует путем ингибирования АТФ-чувствительных калиевых каналов (K_{ATP} channels) в β -клетках поджелудочной железы, что стимулирует секрецию инсулина и снижает концентрацию глюкозы в крови [Gribble F.M., et al., 2003]. K_{ATP} каналы также выражены во множестве других тканей, включая нервную систему, сердце, сосудистые и скелетные мышцы [Seino S., et al., 2003]. [3H]Глибенкламид, сильный АТФ-чувствительный блокатор K^+ каналов, является также специфическим лигандом рецепторов сульфонилмочевины в гиппокампе крыс. Для детерминирования пре- или постсинаптической локализации рецепторов в гиппокампе крыс, изучали влияние селективных каинат-или колхицин-вызванных повреждений на региональное распределение связывания [3H]Глибенкламида. Сайты связывания Глибенкламида в основном были локализованы на мшистых волокнах в СА3, на зернистых клетках зубчатой фассии и пирамидальных нейронах в СА1 [Tremblay E., et al., 1991].

В отдельной серии экспериментов исследована вызванной спайковой активности нейронов амигдалы при ВЧС гиппокампа, а также нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры в условиях однократного системного применения Глибенкламида на экспериментальной модели диабета второго типа, индуцированного длительным потреблением диетической фруктозы. В отдельных нейронах амигдалы ($n=4$) и гиппокампа ($n=3$) регистрацию фоновой и вызванной спайковой активности осуществляли в динамике (от 0 до 90-120 минут) после внутримышечного введения Глибенкламида. Анализ выявил эффекты повышения пре- и постстимульной спайковой активности нейронов гиппокампа начиная с 15 по 60 минуты (Рис 9 А), а также с 20-50 и повторно 85-95 минуты воздействия Глибенкламида (Рис 9 Б). Зарегистрирована тенденция повышения пре- и постстимульной спайковой активности нейронов амигдалы в динамике

воздействия Глибенкламида (Рис 10А). Начало эффектов варьирует от 3 (Рис 10Б) до 55 минут (Рис 10В).

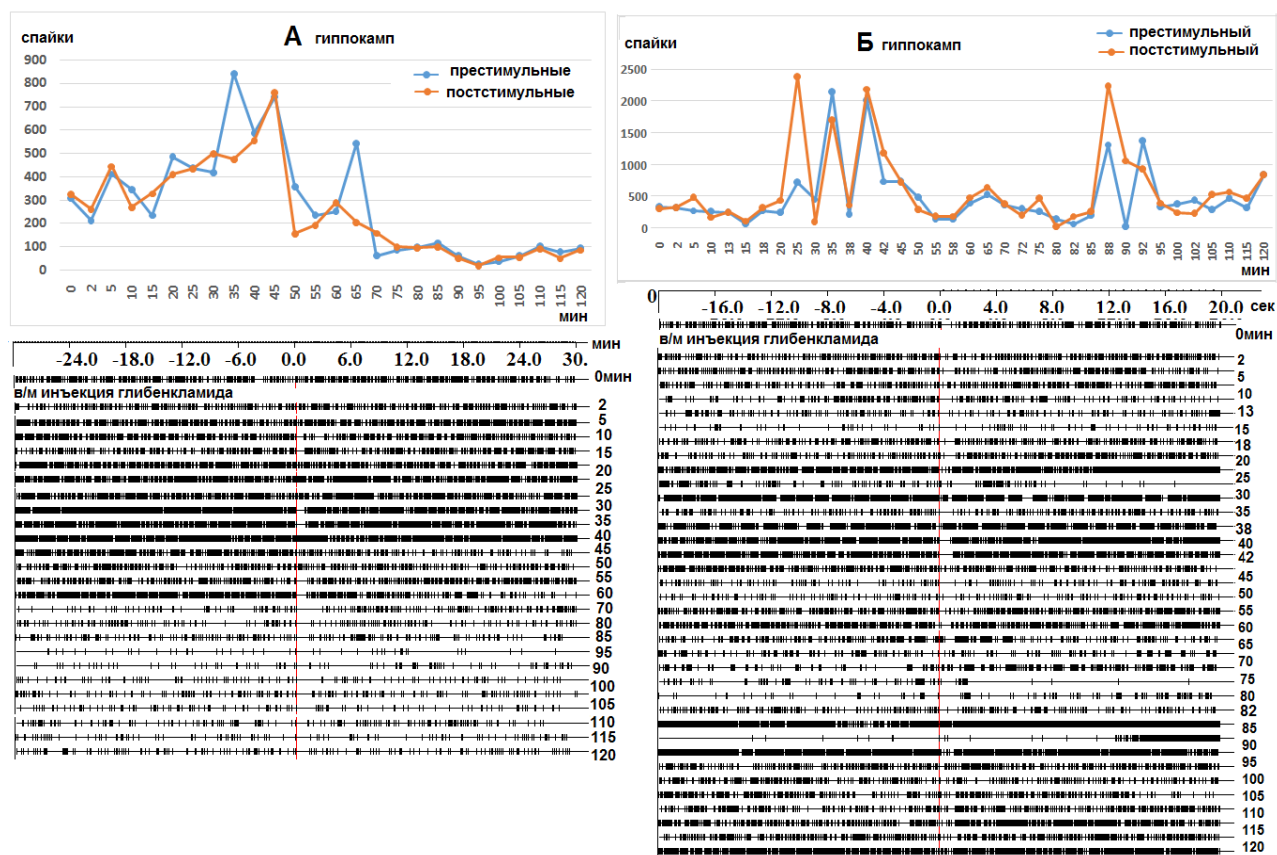


Рисунок 9. Кривые изменения престимульной и постстимульной спайковой активности двух единичных нейронов гиппокампа в динамике от 0 (исходный уровень) до 120 мин после в/м введения глибенкламида (4 мг/кг). Абсцисса – время воздействия Глибенкламида (минуты), ордината – количество пре- и постстимульных спайков (спайки).

Активационные эффекты имели в основном два пика (Рис 10А, Б, Г). Таким образом, показано повышение активности систем выработки возбуждательных нейромедиаторов в синаптическом аппарате изученных нейрональных сетей, что представляет определенный интерес для выявления роли Глибенкламида в фундаментальных аспектах синаптической пластичности головного мозга.

Степень улучшения Глибенкламидом неврологической функции пациентов оспаривается: у некоторых пациентов ограниченное восстановление моторной и когнитивной функции наблюдалось после начала терапии [Battaglia D., et al., 2012], однако, у многих пациентов Глибенкламид и другие сульфониуреазы оказались

неэффективными для восстановления нейрологической функции, если даже они благополучно контролировали диабет [ItohS., et al., 2013]. Возможным объяснением неуспешности Глибенкламида в восстановлении нейрологической функции является то, что в достаточно высокой концентрации Глибенкламид не обнаруживается в цереброспинальной жидкости и головном мозге для блокирования сверхактивных K_{ATP} каналов. Возможно, этим обусловлены осцилляции в частоте ответов в наших экспериментах, представленные на графических рисунках 9 и 10. Тем не менее, Глибенкламид является широко распространенным антидиабетическим препаратом с потенциальным благотворным эффектом при заболеваниях ЦНС [Tournier N., et al., 2013].



Рисунок 10. Кривые изменения престоимпульной и постстимульной спайковой активности 4 единичных нейронов амигдалы в динамике от 0 (исходный уровень) до 90 мин после в/м введения Глибенкламида (4 мг/кг). Абсцисса – время воздействия Глибенкламида (минуты), ордината – количество пре- и постстимульных спайков (спайки)

In vitro исследованиями показано, что Глибенкламид является субстратом для семейства транспортеров (organic anion transporting polypeptide - OATP) и АТФ-связывающих сайтов, которые могут оказывать влияние на распространение и фармакокинетику Глибенкламида in vivo. В ГЭБ показана роль ABC транспортеров в лимитировании захвата Глибенкламида в головном мозге [Tournier N., et al., 2013]. Глибенкламид-зависимые изменения синаптической трансмиссии являются дифференцированными изменениями в ответ на применение агонистов возбуждательных ингибиторных аминокислот, и предполагают комплексную модуляцию функций трансмиссивных рецепторов [Ostroumov K. et al., 2007], благодаря чему, очевидно, электрофизиологические параметры зарегистрированных нами нейронов, отражали налаженную пластичность целостной сети. при потреблении Глибенкламида в течение 3 недель. Наши данные о превышении уровня перистимульного спайкинга большинства нейронов (ТД-ПТД 55,2% и ТД ПТП 22,1 % = 77,3%) гр Ф+Г таковых в группах К и Ф, возможно, являются последствием вышеуказанных событий. Зарегистрированные нами в нейронах гиппокампа быстрые эффекты Глибенкламида (начиная с 15-ой минуты после в/м инъекции), вероятно, также обусловлены выше перечисленными аргументами.

Эндогенные пептиды “эндосульфины” – натуральные лиганды сульфонилируемых рецепторов - натуральные регуляторы секреции инсулина через механизмы, которые являются осевыми в физиологии островков Лангерганса [Virsolvy-Vergine, A., et al., 1992], что, по-видимому, согласуется с нашими данными о регулировании уровня глюкозы в плазме крови. Эндосульфины широко распространены в мозге крыс [Virsolvy-Vergine, et al 1988], однако с некоторым предпочтением отдельных регионов. Расположение этих рецепторов в ЦНС подсказывает, что они могут функционировать как регуляторы K^+ потоков между нейроном и астроцитом. Известно, что эти потоки играют ключевую роль в драматических последствиях церебральной ишемии, и не исключено, что также при фруктозой-индуцированном метаболическом стрессе в наших экспериментах. И хотя неизвестно, в какой мере сульфонилмочевины проходят через гематоэнцефалический барьер у людей, у грызунов была зарегистрирована ограниченная проницаемость [Takanaga H., et al., 1998], в случае девочки 12-недельного возраста с неонатальным

сахарным диабетом [Mlynarski W., et al., 2007] наблюдаемые у пациента улучшение умственной и двигательной функции и мозгового кровотока после лечения Глибенкламидом позволяют предположить, что препарат способен достичь мозга в концентрациях, достаточных для воздействия на активность K_{ATP} канала. Зарегистрированные нами перистимульная спайковая активность нейронов гиппокампа и амигдалы в динамике воздействия однократной в/м инъекции Глибенкламида свидетельствует о наличии, по-видимому косвенных эффектов, судя по вариабельности фармакокинетики: зарегистрированы индивидуальные временные проявления при наличии тенденции возбуждательных проявлений (рис.9 и 10). Основным различием между инсулиновой терапией и лечением сульфонилмочевинной является то, что первая контролирует только гомеостаз глюкозы, в то время как сульфонилмочевина блокирует K_{ATP} каналы во всех тканях, к которым они имеют доступ, и, следовательно, облегчить также внепанкреатические проблемы.

3.6. НАТУРАЛЬНЫЙ ПОДСЛАСТИТЕЛЬ STEVIA REBAUDIANA BERTONI – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МОДУЛЯТОР АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА И АМИГДАЛЫ

Чрезмерное потребление рафинированного сахара способствует ожирению [Malik V.S., et al., 2006] и этиологии диабета второго типа [Welsh J., et al., 2005]. Казалось, некалорийные подсластители давали надежду избежать перечисленные недуги, но к сожалению, они оказались лишенными ожидаемых привелегий для здоровья [Ogden C.L., et al., 2006]. В противоположность этому, начали появляться весомые научные доказательства эффективности и безопасности для здоровья человека экстрактов листьев "сладкой травы" Стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – потенциального натурального некалорийного подсластителя [Geuns J.M., 2003; Thomas J. E., et al., 2010]. Доказано, что листья Стевии могут быть целебным компонентом оздоровительных диет. Включение листьев Стевии в диету было ассоциировано с антигипергликемическим, инсулиноотропным, глюкагоностатическим, гипотензивным, противовоспалительным и иммуностимулирующим воздействиями [Thomas J. E., et al., 2010].

В данной главе представлены данные относительно оценки электрофизиологических показателей вызванной синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы у крыс, вскормленных листьями гидропонического варианта *Stevia Rebaudiana* Bertoni. Эксперименты проведены на крысах альбиносах (самцы, 220±20 г), получающих с пищей порошок листьев гидропонической Стевии в течении 3 недель (20 мг/кг ежедневно) (Гр.Стевия, n=5). В разделе Материалы и Методы приведены преимущества биохимического состава гидропонической стевии, выращенной в Институте проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна. В Гр.Стевия под нембуталовым наркозом (40 мг/кг в/б) у 5 крыс определяли индивидуальный уровень глюкозы в крови – исходный и спустя 3 недели после приема Стевии (портативным глюкометром Bayer Health Care LLC – Contour; объем образца 0,6 мкл, время измерения 5 сек, шкала измерения 10-600 мг/дцл). Для исследования влияния Стевии на биохимические показатели крови, характеризующие функциональную активность клеток печени, определяли активность ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови животных. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ [<http://graphpad.com>]. Экстраклеточной регистрацией фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов гиппокампа при ВЧС (100 Гц, в течение 1 сек) ипсилатеральной энторинальной коры, в Гр.Стевия исследовано 338 нейрона, а также 128 нейронов амигдалы при ВЧС ипсилатерального гиппокампа.

В наших экспериментах на ВЧС энторинальной коры имели место изменения спайковой активности единичных нейронов гиппокампа в реальном времени на период ВЧС (тетанизации) и постстимульный временной отрезок. Детальный анализ ответов нейронов гиппокампа на период ВЧС и постстимульный временной отрезок, по сравнению с престимульным уровнем, в Гр.Стевия приводится на Рис. 11 Б. В популяции нейронов с ТД-ПТД ответами (n=220) ТД и ПТД выражены 20,3 раза ($M_{пре}=5,69 / M_{вчс}=0,28$) и 1,9 раза ($M_{пре}=5,69 / M_{пост}=3,03$), соответственно. В популяции нейронов с ТД-ПТП ответами (n=118) ТД и ПТП выражены 17,5 раза ($M_{пре}=4,19 / M_{вчс}=0,24$) и 1,5 раза ($M_{пост}=7,01 / M_{пре}=4,19$), соответственно. Иными словами, на ВЧС энторинальной коры в нейронах гиппокампа крыс Гр.Стевия тормозные ответы по сравнению с

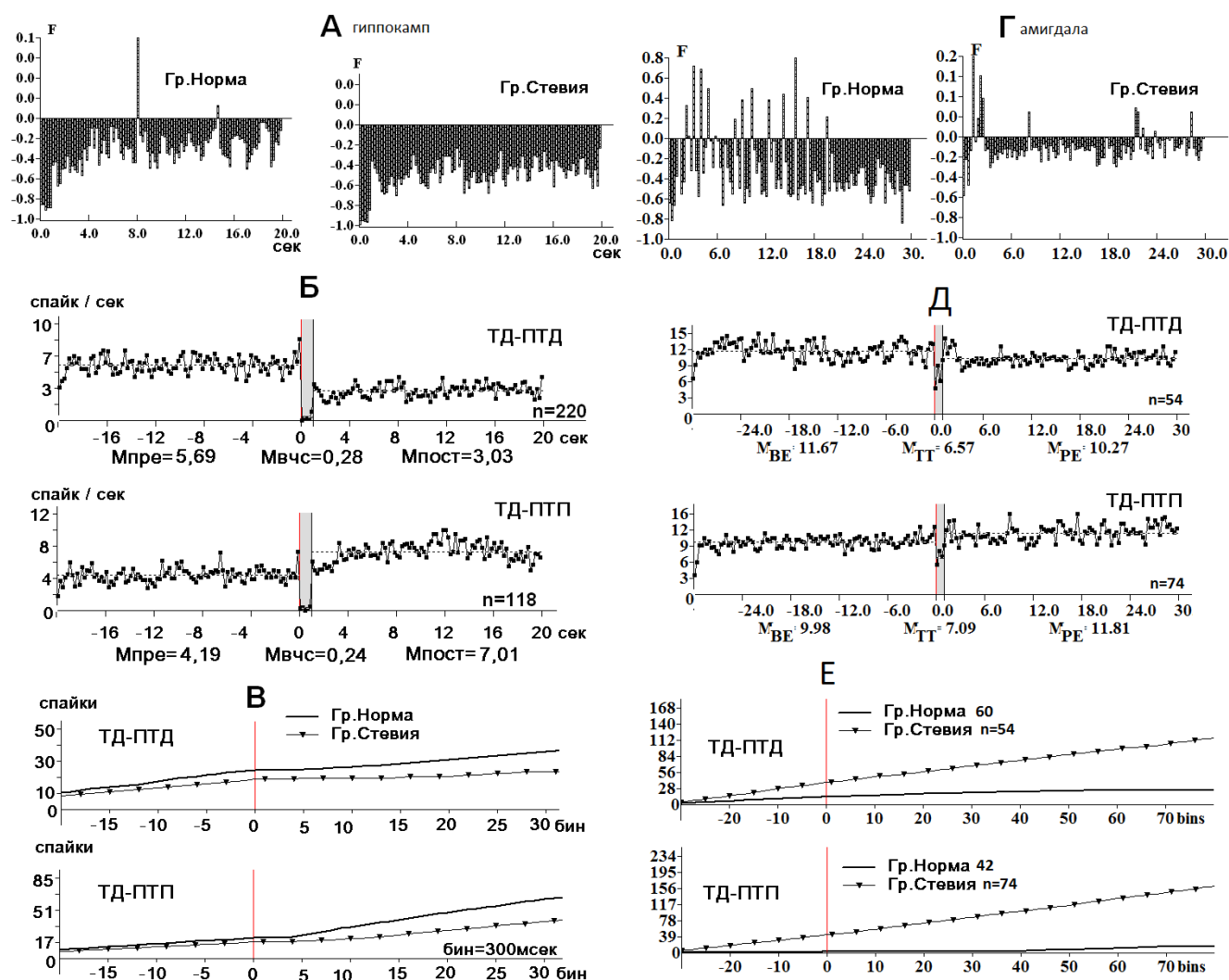


Рисунок 11. Разностные, или остаточные перистимульные гистограммы для популяций нейронов гиппокампа (А) и амигдалы (Г) с ТД-ПТД ответами в Гр.Норма и Гр.Стевия ($F = N - n / n$, где N – количество престимульных спайков, n – количество постстимульных спайков и если $n=N$, то $F=0$). Б перистимульные диаграммы средней частоты, построенные на основе пре- и постстимульных проявлений спайковой активности n -ного количества единичных нейронов гиппокампа (Б) и амигдалы (Д) в реальном времени 20 и 30 сек до ($M_{пре}$), 20 и 30 сек после ($M_{пост}$) и на время ВЧС ($M_{вчс}$) для нейронов, проявляющих ТД- ПТД и ТД-ПТП ответы в Гр.Стевия. Г – кумулятивные усредненные кривые для популяций нейронов гиппокампа (В) и амигдалы (Е) с ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами, сравниваемыми в Гр.Норма и Гр.Стевия.

возбудительными выражены в большей степени. О более длительной и интенсивной выраженности постстимульных тормозных процессов в Гр.Стевия по сравнению с Гр.Норма свидетельствуют разностные, или остаточные перистимульные гистограммы для популяций

нейронов гиппокампа с ТД-ПТД ответами (Рис. 11А). Сравнительный анализ усредненных показателей на основе кумулятивных кривых также выявил низкий уровень постстимульного спайкового разряда в Гр.Стевия, свидетельствуя об общем урежении импульсного потока (Рис. 11В).

Существующий в Гр. Контроль баланс типов зарегистрированных ответов – ТД+ПТД (44,90 %), ТД+ПТП (44,22 %), ТП+ПТП (10,88 %) – претерпевал следующее перераспределение их соотношения в Гр.Стевия: ТД+ПТД (62,72 %), ТД+ПТП (37,28 %). Иными словами, на ВЧС в нейронах гиппокампа Гр.Стевия доминируют тормозные ответы, как на время ВЧС, так и в постстимульных изменениях импульсного потока.

Детальный анализ ответов нейронов амигдалы в Гр. Стевия приводится на Рис. 11 Г-Е. В популяции нейронов с ТД-ПТД ответами ($n=54$) ТД и ПТД выражены 1,8 раза ($M_{пре}=11,67 / M_{вчс}=6,57$) (таковые в Гр.К выражены в 3,3 раза) и 1,13 раза ($M_{пре}=11,67 / M_{пост}=10,27$), соответственно. В популяции нейронов с ТД-ПТП ответами ($n=74$) ТД и ПТП выражены 1,4 раза ($M_{пре}=9,98 / M_{вчс}=7,09$) (таковые в Гр.К выражены в 5,7 раз) и 1,2 раза ($M_{пост}=11,81 / M_{пре}=9,98$), соответственно. Т.о., на ВЧС гиппокампа в нейронах амигдалы крыс Гр.Стевия тормозные и возбуждающие ответы выражены слабо. О более низкой интенсивности выраженности постстимульных тормозных процессов в Гр.Стевия по сравнению с Гр.Норма свидетельствуют разностные, или остаточные перистимульные гистограммы для популяций нейронов амигдалы с ТД-ПТД ответами (Рис. 11Г). Однако, сравнительный анализ усредненных показателей на основе кумулятивных кривых выявил высокий уровень перистимульных спайковых разрядов как для популяции нейронов с ТД-ПТД, так и ТД-ПТП ответами в Гр.Стевия, свидетельствуя об общем учащении импульсного потока (Рис. 11Е), несмотря на слабую выраженность ответов на ВЧС гиппокампа.

Существующий в Гр.Норма баланс типов ответов нейронов амигдалы – ТД-ПТД (35,7%), ТД-ПТП (25 %), ТП-ПТП (25 %) и ареактив (14,3 %) (см. Таблицу 3 в главе 3.2) – претерпевал следующее перераспределение их соотношения в Гр.Стевия: ТД-ПТД (54 из 128; 42,2 %), ТД-ПТП (74 из 128 57,8 %). Иными словами, в Гр.Стевия наряду с более высоким уровнем фоновой активности нейронов амигдалы доминируют тормозные ответы

на время ВЧС (54+74 из 128; 100%), и возбудительные в постстимульных изменениях импульсного потока (74 из 128; 57,8 %).

Доказана критическая роль долговременной депрессии (LTD) в обучении и памяти и при ситуациях, когда когнитивность нуждается в гибком ответе. Кроме того, LTD может лежать в основе когнитивных эффектов стресса [Collingridge G.L., et al., 2010]. Показан эффект улучшения памяти, оценивающийся с использованием теста водного лабиринта Мориса для изучения пространственного обучения, под влиянием этанолового экстракта Стевии (при 200 мг / кг пероральной дозе) [Divya S. J., et al., 2010]. Доказана значительная реверсия скополамин-индуцированного дефицита памяти при превенции Стевиозидом (перорально в дозе 250 мг/кг) наряду с ослаблением скополамин-индуцированного повышения активности мозговой ацетилхолинэстеразы и уровня оксидативного стресса [Sharma D., et al., 2010]. В этом контексте документирована важная роль подсластителей, в частности глюкозы, в обучении и памяти, и имеются данные об улучшении формирования новой памяти при незначительном повышении уровня циркулирующей глюкозы у грызунов, которое достигалось повышением синтеза и выделения гиппокампального ацетилхолина [Ragozzino M.E., et al., 1995].

Результаты настоящего исследования после перорального приема порошка из листьев Стевии указывают на доминирование депрессорных процессов в нейронах гиппокампа, что в свою очередь обуславливает низкий уровень вызванных ответов нейронов амигдалы (при ВЧС гиппокампа) и, по-видимому, компенсаторную повышенную фоновую активность нейронов амигдалы, и предусматривают определенный вклад в понимание механизмов контролирования когнитивных функций и пластичности мозга биологически активными компонентами *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Характерно, что эффекты Стевии на уровень глюкозы крови и артериальное давление наблюдаются тогда, когда эти параметры выше нормы [Chatsudthipong V., et al., 2009]. Нами получены данные о недостоверном ($P=0,8$) понижении уровня глюкозы в крови: исходный – $100 \pm 2,8$ мг/ддл и $99 \pm 3,7$ мг/ддл спустя три недели после приема Стевии. Исходный уровень активности АЛТ в норме у 5 крыс составлял $10,42 \pm 0,8$ U/L, а после приема Стевии – $17,23 \pm 1,93$ U/L ($P=0.009$). Исходный уровень активности АСТ в

норме у 5 крыс составлял $10,02 \pm 0,7$ U/L, а после приема Стевии – $17,19 \pm 2,76$ U/L ($P=0.03$). Коэффициент Риттиса (АСТ/АЛТ) составлял 0,99 против исходного 0,96, что указывает на отсутствие токсических воздействий на ферментативную систему печени при употреблении данной дозы гидропонической Стевии.

3.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ СИСТЕМНОГО (В/М) ВОЗДЕЙСТВИЯ СТЕВИОЗИДА НА ПОКАЗАТЕЛИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА И АМИГДАЛЫ

Целью данного изучения явилась оценка электрофизиологических параметров синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы крыс после внутримышечной (в/м) инъекции Стевиозида – основного фармакологически активного компонента листьев Стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – на экспериментальной модели диабета второго типа, индуцированного длительным потреблением фруктозы. Изучены электрофизиологические параметры эффектов однократного внутримышечного введения Стевиозида на нейронах гиппокампа ($n= 3$) и амигдалы ($n= 3$). В отдельных нейронах гиппокампа и амигдалы регистрацию фоновой и вызванной спайковой активности осуществляли в динамике (от 3 до 104 минут и от 2 до 120 минут соответственно) после однократной инъекции Стевиозида (в/м 2 мг/кг). На Рисунке 12А демонстрируется кривая динамики (от 0 до 104 мин) изменения количества спайков на время престаимпульной и постстимульной регистрации в единичном нейроне гиппокампа после однократного в/м введения Стевиозида. В исходном состоянии (0 мин или непосредственно до введения стевиозида) зарегистрировано 34 спайка до ВЧС энторинальной коры и 48 спайков после ВЧС; с 6-ой по 13-ые минуты регистрируется резкое учащение спайковой активности (325 и 107 спайков на 6-ой минуте, 210 и 203 спайков на 13-ой минуте), а с 15-минуты (4/40 спайков соответственно на пре- и постстимульное время) регистрируется спад активности до 70-ой минуты (11/24 спайков соответственно на пре- и постстимульное время) с максимальным понижением престаимпульной активности до 0 спайков на 45-55 минутах после в/м инъекции Стевиозида. Повторная активация пре- и постстимульной активности регистрируется с 77-ой минуты (87/109 спайков соответственно на пре- и постстимульное

время) по 104 минуты после введения Стевиозида (81/54 спайков соответственно на пре- и постстимульное время), с пиком активности на 95-ой минуте (279/233 спайков соответственно на пре- и постстимульное время). На Рис. 12 (Б) эти же эффекты представлены в виде «растера» спайковой активности, развернутой в реальном времени 20

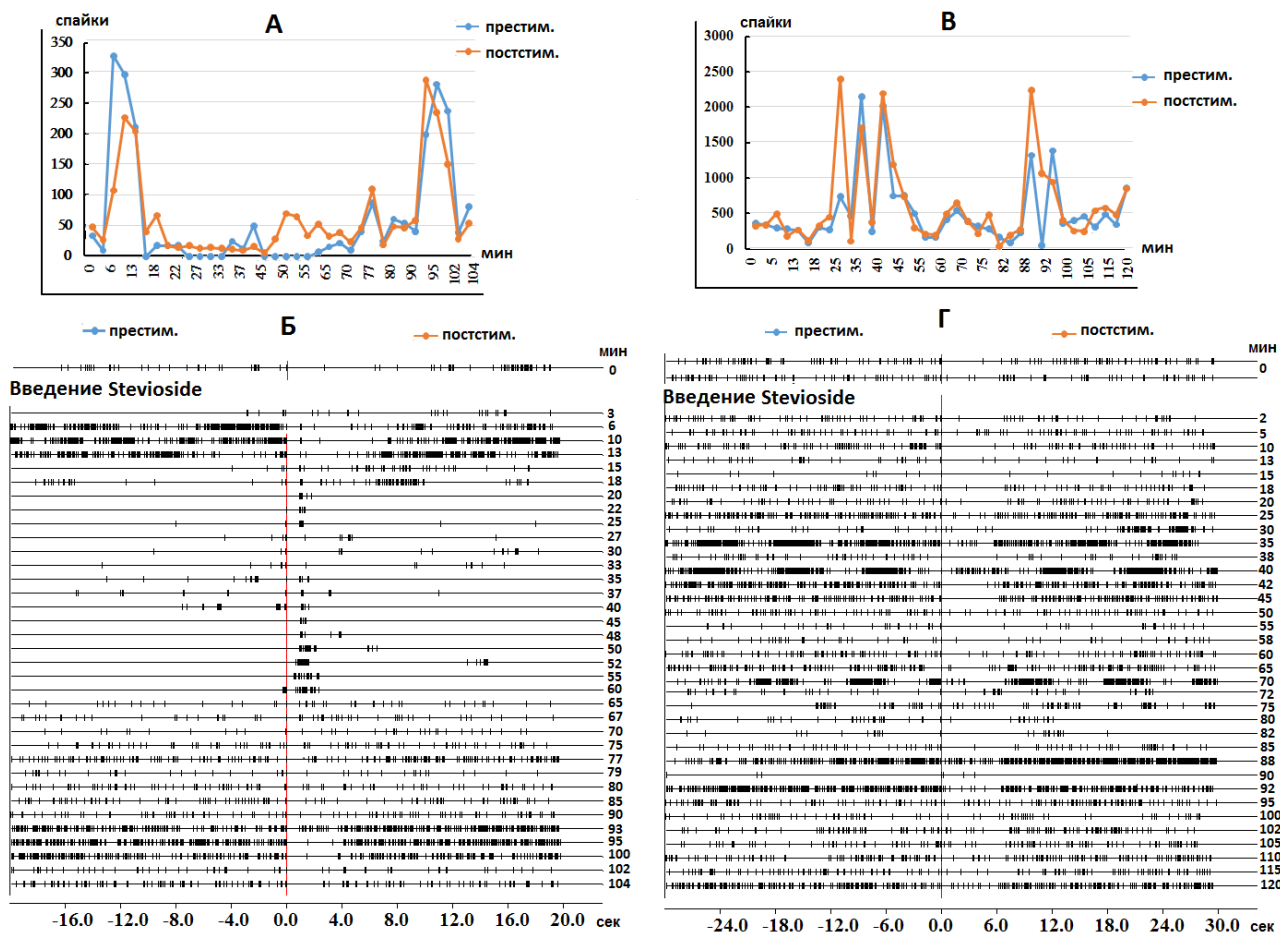


Рис. 12. Гистограммы изменения престаимпульной и постстимульной спайковой активности единичных нейронов гиппокампа (А) и амигдалы (В) в динамике от 0 (исходный уровень) до 104 и 120 минут после в/м введения стевиозида (2 мг/кг). Абсцисса – время воздействия Стевиозида (минуты), ордината – количество престаимпульных и постстимульных спайков (спайки). Б, Г – в растере представлена развернутая в реальном времени (40 и 60 сек) картина спайковой активности нейрона (того же, что на А и В) в исходном состоянии (0 мин) и после введения Стевиозида. Справа указано на какой минуте после введения Стевиозида регистрировалась активность.

сек до ВЧС энторинальной коры (от -20 до 0 сек) и после ВЧС (от 0 до 20 сек): очевидны учащения спайков с 6-ой до 13-ой и 77-ой до 104-ой минуты введения Стевиозида по сравнению с исходной частотой (отмечено 0 мин). Согласно цифровым значениям (выведенным на основе программного анализа) динамики (от 0 до 120 мин) изменения количества спайков в единичном нейроне амигдалы после в/м введения Стевиозида (Рис. 12 В), имеем следующую динамику: в исходном состоянии (0 мин) зарегистрировано 341 спайков до ВЧС гиппокампа и 310 спайков после ВЧС; на 15 минуте введения Стевиозида зарегистрирован спад престаимпульной и постстимульной активности (соответственно 70 и 105 спайков); к 25 минуте регистрируется резкое проявление возбудительной активности (721 и 2393 спайков), тенденция которого сохраняется до 45 минуты (737 и 725 спайков); и далее повторная активация регистрируется с 88 мин (1308 и 2238 спайков) до 95 минуты (342 и 390 спайков), после чего активность практически сохраняется на уровне исходного до 115 минуты (325 и 469 спайков). На Рис. 12 (Г) эти же эффекты представлены в виде «растера» спайковой активности, развернутого в реальном времени 30 сек до стимуляции (от -30 до 0 сек) и после ВЧС (от 0 до 30 сек): очевидно урежение спайкинга нейрона с 13-15-ой минуты введения Стевиозида, а также учащение спайков с 25 до 45-ой и 88 до 95-ой минуты введения Стевиозида по сравнению с исходной частотой (отмечено 0 мин). Таким образом, в нейронах гиппокампа и амигдалы выявлены преимущественно возбудительные эффекты при однократной инъекции терапевтической дозы Стевиозида. Интересно отметить, что в тех случаях, когда белок фосфодиэстераза, ответственный за деградацию цАМФ и сопутствующий лечению Стевиозидом, подавляется, увеличивается цАМФ (важный компонент в усилении секреции инсулина, физиологически индуцированного глюкозой), что предполагает способность Стевиозида усиливать экспрессию глюкозочувствительных генов [Jeppesen P. B., et al., 2003], что можно экстраполировать на возможность активации вторичных мессенджеров, таких как цАМФ для выделения нейротрансмиттеров. Более того, эти данные мы склонны обосновать представлениями об активации АМРА рецепторов при диабете, а также их ролью в быстрой синаптической передаче [Biessels et al., 2002]. Можно предположить, что в условиях нарушенного метаболизма глюкозы Стевия адаптирует нейронную сеть мозга путем установления

депрессии / или усиления депрессии, опосредованного активацией возбуждающих нейротрансмиттеров. Эта интригующая возможность требует дальнейшего изучения.

У крыс на фруктозной диете гиппокампальная инсулиновая резистентность ассоциировалась со снижением формирования LTD в нейронах гиппокампа [Mielke J.G., et al., 2005; Ross A.P., et al., 2009]. Показано, что экстракт Стевии реверсирует (восстанавливает исходное состояние) эффект снижения захвата глюкозы, вызванный метилглиоксалем (methylglyoxal) – ингибитором инсулин-рецепторного / PI3K / Akt пути, что подтверждает гипотезу о том, что экстракт Стевии имитирует эффект инсулина модулированием PI3K/Akt пути [Rizzo B., et al., 2013]. Отсутствуют данные о воздействии Стевиозида на системы нейротрансмиттеров. Результаты данного изучения указывают на воздействие Стевиозида на нейроны гиппокампа и амигдалы: выявлена преимущественная активация возбудительной нейротрансмиссии и, по-видимому, сопряженных кратковременных молекулярных механизмов, при однократной инъекции терапевтической дозы стевиозида. Более выраженные тормозные эффекты Стевиозида в гиппокампальном нейроне в определенной степени обусловлены тем, что ацетилхолиновые рецепторы гиппокампа плотнее локализованы на ГАМК-эргических интернейронах по сравнению с глутаматэргическими пирамидными нейронами [Ji D., et al., 2001], что, возможно, и обеспечивает конечный возбuditельно-тормозный эффект холинэргического входа на нейрональную активность изученных нами цепей (стимуляция энторинальной коры при регистрации нейронов гиппокампа и стимуляция гиппокампа при регистрации нейронов амигдалы).

3.8. ВОЗДЕЙСТВИЕ СТЕВИИ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Исследования проведены на 6 животных, употребляющих питьевую воду на 20% фруктозе в течение 6 недель ежедневно и порошок листьев Стевии (20 мг/кг ежедневно) с пищей с 3 по 6 недели, которые служили в качестве группы Фруктоза+Стевия (Гр.Ф+С). Программный анализ перистимульной активности для популяции нейронов гиппокампа (Рис. 13 А, Б и Таблица 6) и амигдалы (Рис 15 А, Б и Таблица 7), проявляющих данный

тип ответов на ВЧС энторинальной коры и гиппокампа, соответственно, дает возможность оценки цифровых показателей усредненной частоты спайковой активности до (Мпрестимульный), после (Мпостстимульный) стимуляции и на время тетанизации (Мвчс). Выраженность компонентов ответов оценивается согласно указанным значениям цифровых показателей усредненной частоты (Мпрестимульный, Мпостстимульный и Мвчс).

Так, согласно детальному анализу в Гр.Ф тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах гиппокампа с ТП-ПТП выражена 9 раз ($19,87 : 2,19$ спайк/сек) (Рис. 13А) (таковые в Гр. К выражены в 4 раза). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 22 раза ($4,68 : 0,21$ спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 13,3 раза ($3,73 : 0,28$ спайк/сек) (Рис 13 А) (таковые в Гр. К выражены соответственно в 8,6 и 7,9 раза).

В Гр.Ф+С тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 1,4 раза ($3,33:2,38$ спайк/сек). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 17,6 раза ($6,50 : 0,37$ спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 12,6 раза ($5,42 : 0,43$ спайк/сек) (Рис 13 Б и Таблица 6). В нейронах гиппокампа, проявляющих лишь только ТД, выраженность такового составляла 18,6 ($3,34 : 0,18$ спайк/сек) (Рис. 13Б). Анализ кумулятивных гистограмм в группах К, Ф, Ф+С (Рис. 13 В) выявил: 1) в нейронах с ТП ПТП ответами наиболее высокий (количественный) уровень пре- и постстимульных спайков в Гр. К, наиболее низкий уровень престимульных спайков в Гр. Ф, наиболее низкий уровень постстимульных спайков в Гр. Ф+С; 2) в нейронах с ТД ПТД ответами практически одинаковый уровень пре- и постстимульных спайков в Гр. К и Гр. Ф+С и сравнительно низкий уровень таковых в Гр. Ф; 3) в нейронах с ТД ПТП ответами практически одинаковый уровень престимульных спайков (или фоновой активности) в группах К, Ф, Ф+С и наиболее высокий (количественный) уровень постстимульных спайков в Гр. К, а наиболее низкий для таковых в Гр. Ф.

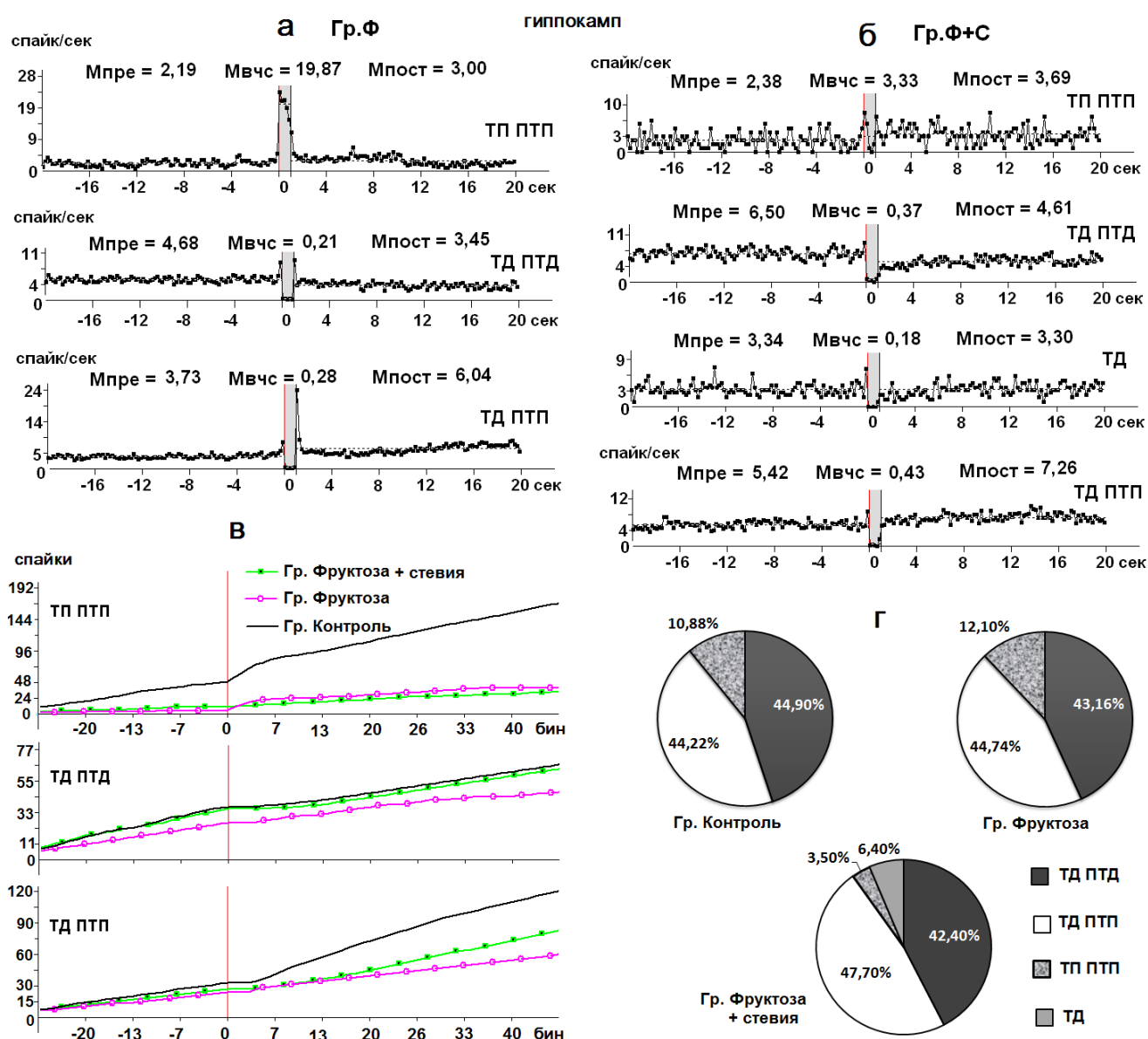


Рис. 13. а, б – перистимульные диаграммы средней частоты, построенные на основе пре- и постстимульных проявлений спайковой активности единичных нейронов гиппокампа при стимуляции энторинальной коры в реальном времени 20 сек до стимуляции (Мпре), 20 сек после стимуляции (Мпост) и на время высокочастотной стимуляции (Мвчс), проявляющих указанный тип ответов (ТП ПТП, ТД ПТД, ТД ПТП) в группах Фруктоза (Гр.Ф) и Фруктоза+Стевия (Гр.Ф+С); в – сравнительные кумулятивные кривые для усредненные популяций нейронов гиппокампа с указанным типом ответов в группе Контроль (Гр.К), Гр.Ф и Гр.Ф+С; г – процентное доленое соотношение указанных типов ответов из общего числа зарегистрированных нейронов в Гр.К, Гр.Ф и Гр.Ф+С. Здесь и на следующем рисунке: Мпре (средняя частота спайков на временной отрезок до стимуляции), Мпост (средняя частота спайков на временной отрезок после стимуляции), Мвчс (средняя частота спайков на время высокочастотной стимуляции)

Таблица 6

Цифровые значения на перистстимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов гиппокампа с указанными типами ответов для группы Фруктоза+Стевия.

↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов n=172	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
ТП-ПТП	3.5 % n=6	2.38	3.33 ↑1.4	3.69
ТД-ПТП	47.7 % n=82	5.42	0.43 ↓12.6	7.26 1.3
ТД-ПТД	42.4 % n=73	6.50	0.37 ↓17.6	4.61
ТД	6.4 % n=11	3.34	0.18 ↓18.6	3.30

В Гр.К зарегистрированные в нейронах гиппокампа ответы имели следующий баланс типов (Рис. 13 К и и Таблица 6): ТД-ПТД в 132 из 294 нейронов (44,90%), ТД-ПТП в 130 из 294 нейронов (44,22 %) и ТП-ПТП в 32 из 294 нейронов (10,88 %). Иными словами, зарегистрировано доминирование депрессорных ответов на время ВЧС (тетаническая депрессия в 89,12% (44,90+44,22%) нейронов) и незначительное процентное превосходство возбуждательных ответов на постстимульное время (посттетаническая потенциация в 54,00% (44,22+10,88%) нейронов). В Гр.Ф зарегистрированы 190 нейронов гиппокампа, из коих 23 (12.10%) проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 85 нейронов (44.74%) – в виде ТД-ПТП, 82 нейрона (43.16%) – в виде ТД-ПТД (Рис. 13 Г), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (44,74+43,16=87.9%) и незначительное превосходство возбуждения на постстимульное время (44,74+12,10=56.8%), что соответствует таковым в Гр. К. В Гр. Ф+С зарегистрированы 172 нейрона гиппокампа, из которых 6 нейронов (3.5%) проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 82 нейрона (47.7%) – в виде ТД-ПТП, 73 нейрона (42.4%) – в виде ТД-ПТД, и 11 нейронов (6.4%) проявляли лишь ТД (Рис 13Г и Таблица 6), что можно рассматривать как значительное доминирование торможения на время ВЧС (47,7+42,4+6,4=96.5%) и

незначительное превосходство возбуждения на постстимульное время ($47,7+3,5=51.2\%$). Иными словами, выявлено значительное доминирование депрессии на время ВЧС и практически равнозначный баланс возбуждение/депрессия на постстимульное время.

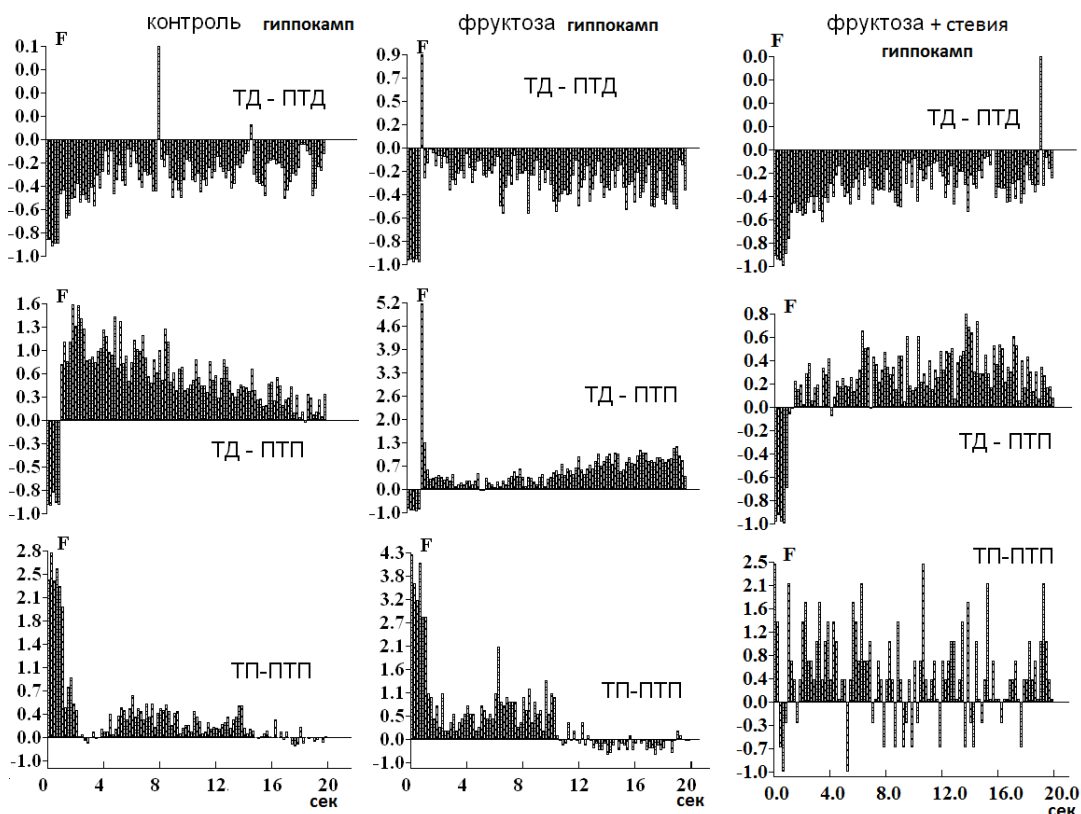


Рис. 14. Разностные, или остаточные перистимульные гистограммы для популяций нейронов гиппокампа с ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами в группах Контроль, Фруктоза, Фруктоза+Стевия; $F = N - n / n$, где N – количество престимульных спайков, n – количество постстимульных спайков и если $n=N$, то $F=0$.

Рисунок 14, демонстрирующий выраженность постстимульных эффектов после вычета престимульного спайкинга ($F=N-n/n$) в группах К, Ф, Ф+С для тех же типов ответов свидетельствует: 1) о практически одинаковом спектре постстимульных депрессорных ответов в популяции нейронов с ТД ПТД ответами в группах Контроль и Ф+Стевия; 2) об отсутствии восстановления до контрольного пониженного в гр Ф уровня выраженности ПТП в нейронах с ТД ПТП ответами в гр Ф+Стевия; 3) о более низком уровне возбудительных ответов (и ТП и ПТП) в популяции нейронов с ТП ПТП ответами в группе Ф+С по сравнению с таковыми в группах Контроль и Фруктоза.

Известно, что высокоэнергетические диеты могут ослаблять память через центральную инсулиновую резистентность. Инсулиновая резистентность в гиппокампе значительно редуцировала способность инсулина стимулировать LTD [Mielke, Taghibiglouetal, 2005], а экспериментальные диабетические крысы демонстрировали дефицит пространственной памяти и ухудшение LTP [Biessels, Kamaletal. 1998; Artola, Kamaletal. 2005]. LTD и LTP являются клеточными механизмами пластичности, лежащий в основе обучения и памяти [Malenka, Bear, 2004; Massey, Bashir, 2007].

Пластичность синапсов оценивается как их способность по прошествии длительного времени усиливать или ослаблять ответы на повышенную или пониженную активацию. Пластические изменения являются также следствием изменения числа нейротрансмиттерных рецепторов, локализованных на синапсах. Различные механизмы, взаимодействующие для достижения пластичности синапсов включают изменения количества нейротрансмиттеров, выделяемых в синапс и изменения способов эффективного реагирования к таковым [Zucker R. et al., 2002]. Синаптическая пластичность в возбуждательных и ингибиторных синапсах обусловливается релизингом постсинаптического кальция. Тетаническая стимуляция, увеличивающая кальциевый поток, вызывает изменения везикулярного экзоцитоза, результирующего в потенциал действия и далее в кратковременное (на время ВЧС) синаптическое увеличение, зависящее от готовых к релизингу пулов нейротрансмиттеров на каждый потенциал действия [Stevens C., Wesseling J., 1999]. Синаптический прирост осуществляется через облегчение, аугментацию или посттетаническую потенцию. Синаптическая трансмиссия в нейронах – динамический процесс, и постсинаптический ответ увеличивается или ослабевает в зависимости от развития пресинаптической активности. Данная известная характеристика химической синаптической трансмиссии – ключевой фактор, определяющий свойства (в том числе степень выраженности) ответа. Депрессия обычно приписывается истощению некоторых пулов, готовых к релизингу везикулов, и может также возникать от возвратной активации пресинаптических рецепторов и от постсинаптического процесса десенситизации [Zucker R., et al., 2002]. Нейротрансмиссия гиппокампальных нейронов главным образом зависит от возбуждательного

нейротрансмиттера глутамата, и в некоторой степени от моноаминэргических проекций (серотонин-, допамин-, норадреналинэргических). Моноамины сильно подавляют перфорантный путь к CA1 с минимальными эффектами на входы по коллатералям Шаффера. Для тормозных интернейронов ГАМК является всеобщим нейротрансмиттером. Возбудительные и ингибиторные входы способны модулировать обработку информации в гиппокампальной сети и строго детерминировать возбудимость, а также аффертировать пластичность и жизнеспособность нейронов [Otmakhova N., et al., 2005]. Важно отметить, что несмотря на изученность процессов LTP, отмечают, что она имеет место с участием разнообразных механизмов в нервной системе, и всеобщими признаны три последовательные фазы: краткосрочная потенция, ранняя и поздняя LTP [Sweatt J., 1999]. События каждой фазы диктуются протеиновыми рецепторами, ответственными за события снаружи клетки; ферментами, участвующими в химических реакциях внутри клетки; сигнальными молекулами, обеспечивающими прогрессирование указанных фаз. Помимо того, что каждая фаза LTP управляется перечисленными малыми молекулами (медиаторами), модуляторные молекулы взаимодействуют с медиаторами для тонкого изменения окончательно генерируемого LTP. Медиаторы – молекулы типа NMDA рецептор или кальций, присутствие и активность которых необходимы для генерации LTP почти при всех состояниях. Модуляторы – молекулы, которые могут изменять LTP, но не являются необходимыми элементами для генерации и экспрессии LTP [Malenka R., Bear M., 2004]. Ранние и поздние фазы LTP характеризуются сериями трех событий: 1) индукция – процесс, который посредством короткого сигнала триггирует начало последующих фаз потенциации; 2) сохранение устойчивых биохимических изменений, индуцированных в данной фазе; 3) экспрессия долговременных клеточных изменений, обусловленных активацией обслуживающих сигнальных молекул [Sweatt J., 1999].

В контексте обсуждаемых выше факторов и механизмов наши результаты могут пролить свет на понимание эффектов Стевии на синаптическую пластичность гиппокампа при нарушении метаболизма глюкозы и предопределить направление молекулярных исследований.

3.9. ВОЗДЕЙСТВИЕ СТЕВИИ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ АМИГДАЛЫ В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Согласно детальному анализу на основе цифровых показателей усредненной частоты спайковой активности до (Мпрестимульный), после (Мпостстимульный) стимуляции и на время тетанизации (Мвчс) в нейронах амигдалы в Гр.Ф (Рис 15 А) тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 2,1 раза (5,64 : 2,67 спайк/сек) (Рис 15 А) (таковые в Гр. К выражены в 5 раз). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 3 раза (3,95 : 1,31 спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 3,9 раза (3,05 : 0,78 спайк/сек) (Рис 15 А) (таковые в Гр. К выражены соответственно в 3,3 и 5,7 раза). В Гр. Ф+С тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 1,9 раза (5,52 : 2,93 спайк/сек). Тетаническая депрессия на время ВЧС в нейронах с ТД-ПТД выражена 3,6 раза (4 : 1,10 спайк/сек), в нейронах с ТД-ПТП ответами – в 4,3 раза (3,58 : 0,83 спайк/сек) (Рис. 15Б и Таблица 7).

Таблица 7

Цифровые значения на перистимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов амигдалы с указанными типами ответов для группы Фруктоза+Стевия.

↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Типы ответов	Процентное распределение по типам ответов Сумм=174 кл	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
ТП-ПТП	17.2 %	2.93	5.52 ↑1.9х	4.24 ↑1.4х
ТД-ПТП	27.6 %	3.58	0.83 ↓4.3х	4.60 ↑1.3х
ТД-ПТД	50.6 %	4	1.10 ↓3.6х	2.87 ↓1.4х
Ареактив.	4.6 %	1.42		1.42

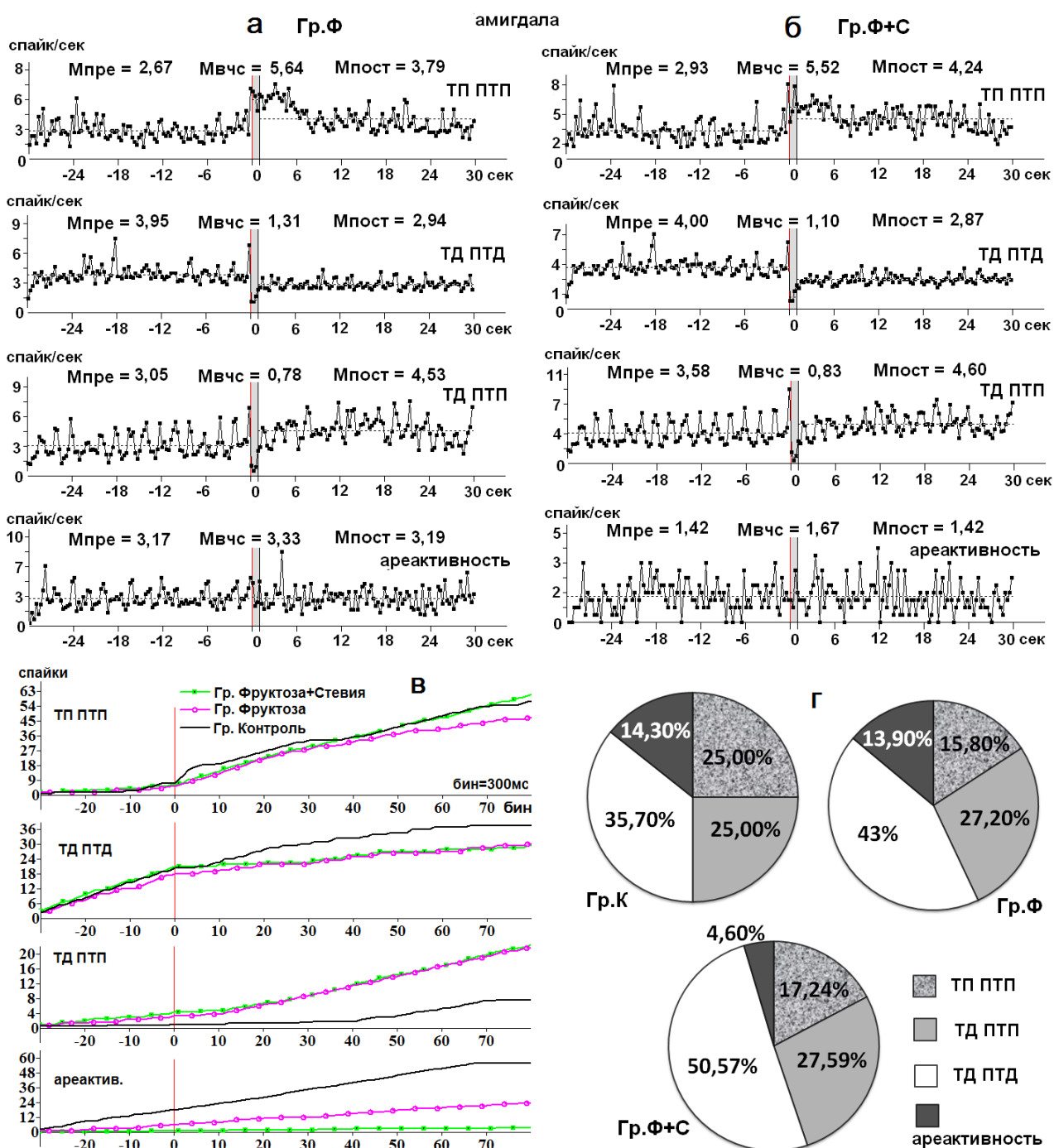


Рис. 15. а, б – перистимульные диаграммы средней частоты, построенные на основе пре- и постстимульных проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы при стимуляции гиппокампа в реальном времени 30 сек до стимуляции (Мпре), 30 сек после стимуляции (Мпост) и на время высокочастотной стимуляции (Мвчс), проявляющих указанный тип ответов (ТП ПТП, ТД ПТД, ТД ПТП) в группах Фруктоза (Гр.Ф) и Фруктоза+Стевия (Гр.Ф+С); в – сравнительные кумулятивные кривые для усредненные популяций нейронов гиппокампа с указанным типом ответов в группе Контроль (Гр.К), Гр.Ф и Гр.Ф+С; г – процентное доленое соотношение указанных типов ответов из общего числа зарегистрированных нейронов в Гр.К, Гр.Ф и Гр.Ф+С

Анализ кумулятивных гистограмм в группах К, Ф, Ф+С (Рис. 15В) выявил: 1) в нейронах амигдалы с ТП ПТП ответами практически одинаковый уровень пре- и постстимульных спайков в группах К, Ф, Ф+С (за исключением временного отрезка 35 бин для Гр. К и 45-70 бин для Гр. Ф); 2) в нейронах с ТД ПТД ответами практически одинаковый уровень пре- и постстимульных спайков в Гр.Ф и Гр.Ф+С и наиболее высокий уровень постстимульных

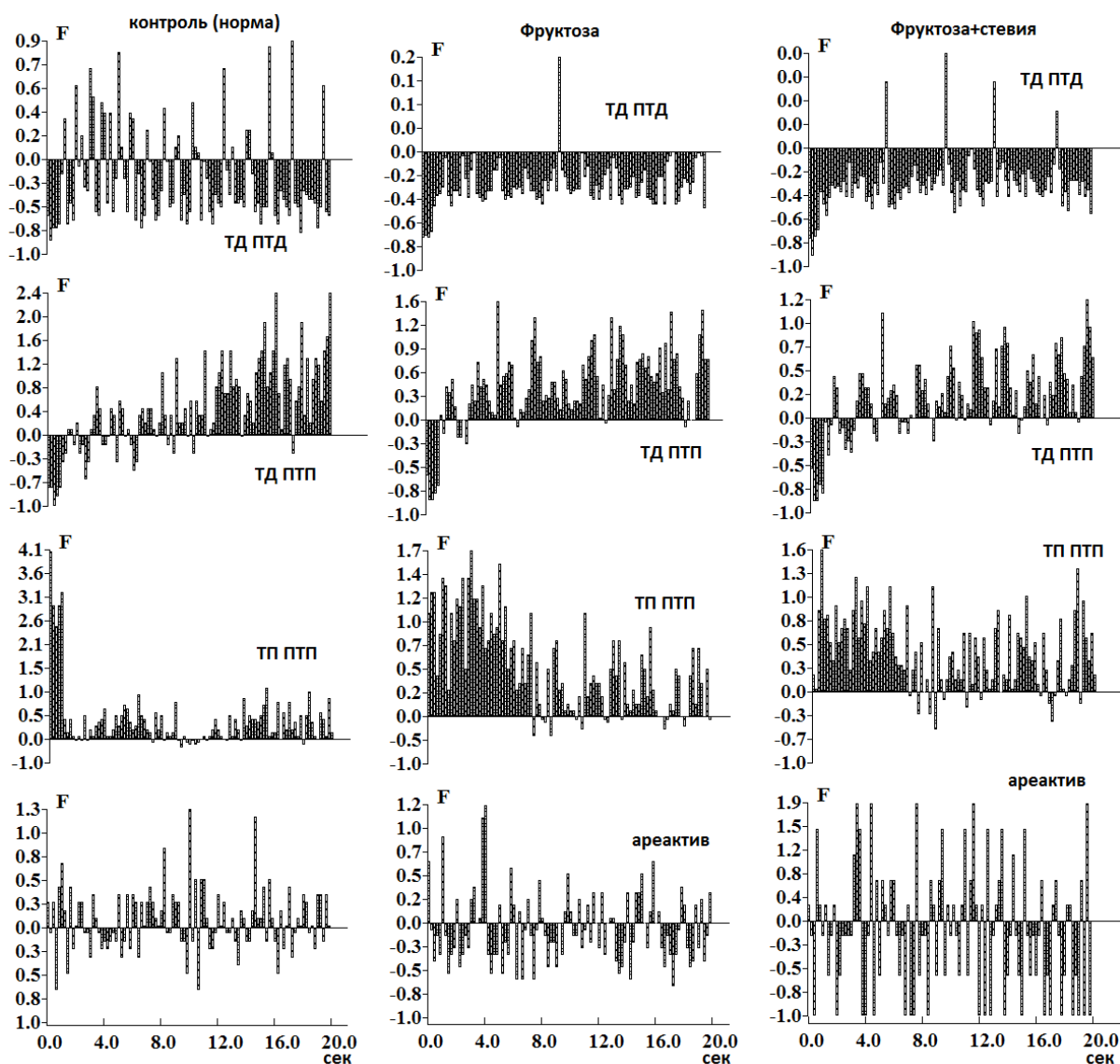


Рис.16 Разностные, или остаточные перистимульные гистограммы для популяций нейронов амигдалы с ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами в группах контроль, Фруктоза, Фруктоза+Стевия; $F = N - n / n$, где N – количество престимульных спайков, n – количество постстимульных спайков и если $n=N$, то $F=0$.

спайков в Гр.К; 3) в нейронах с ТД ПТП ответами наиболее низкий (количественный) уровень пре- и постстимульных спайков в Гр.К, и практически одинаковый уровень пре-

и постстимульных спайков в Гр.Ф и Гр.Ф+С; 4) в ареактивных нейронах амигдалы наиболее низкий уровень перистимульного спайкинга зарегистрирован в Гр. Ф+С, а наиболее высокий в Гр. К. Анализ остаточных перистимульных гистограмм (Рис 16) в группах К, Ф, Ф+С для тех же типов ответов свидетельствует: 1) о наиболее богатом спектре постстимульных депрессорных ответов в популяции нейронов с ТД ПТД ответами в группе Ф+Стевия ; 2) наиболее скудный уровень ПТП в нейронах с ТД ПТП ответами в группе Ф+С; 3) в популяции нейронов с ТП ПТП ответами диффузное равномерное распределение возбуждательных ответов на время ВЧС и постстимульное время в группах Ф и Ф+С, в отличие от строго дифференцированных ТП и ПТП в контроле.

В Гр.Ф зарегистрированы 158 нейронов амигдалы, из которых 25 (15.8%) при ВЧС гиппокампа проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 43 нейрона (27.2%) – в виде ТД-ПТП, 68 нейронов (43%) – в виде ТД-ПТД, и в 22 нейронах (13,9%) не зарегистрированы какие-либо ответы (Рис 15Г), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС ($43+27,2=70.2\%$) и равнозначный баланс посттетанической потенциации ($15,8+27,2=43\%$) и посттетанической депрессии (43%).

В Гр.Ф+С зарегистрированы 174 нейрона амигдалы, из которых 30 нейронов (17.24%) проявляли ответы в виде ТП-ПТП, 48 нейронов (27.59%) – в виде ТД-ПТП, 88 нейронов (50.57%) – в виде ТД-ПТД, и 8 нейронов (4.6%) проявляли ареактивность (Рис 15Г и Таблица 7). Можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС ($50,57+27,59=78.16\%$) и некоторое смещение баланса посттетанических ответов в пользу тормозных (посттетаническая потенциация составляла 44,83% ($17,24+27,59\%$), а посттетаническая депрессия 50.57%).

В Гр.К зарегистрированы 168 нейронов, которые проявляли следующие типы ответов: ТП-ПТП (25%, 42 нейрона), ТД-ПТП (25%, 42 нейрона), ТД ПТД (35,7%, 60 нейронов). Иными словами, процентное соотношение торможения на время ВЧС составляет 60,7% ($35,7+25\%$), что незначительно превалирует над тетанической потенциацией, в то время как в посттетанических ответах доминирует посттетаническая

потенциация (25+25=50%) (посттетаническая депрессия составляет 35.7%). Ареактивные единицы составляли 14,3% (24 нейрона).

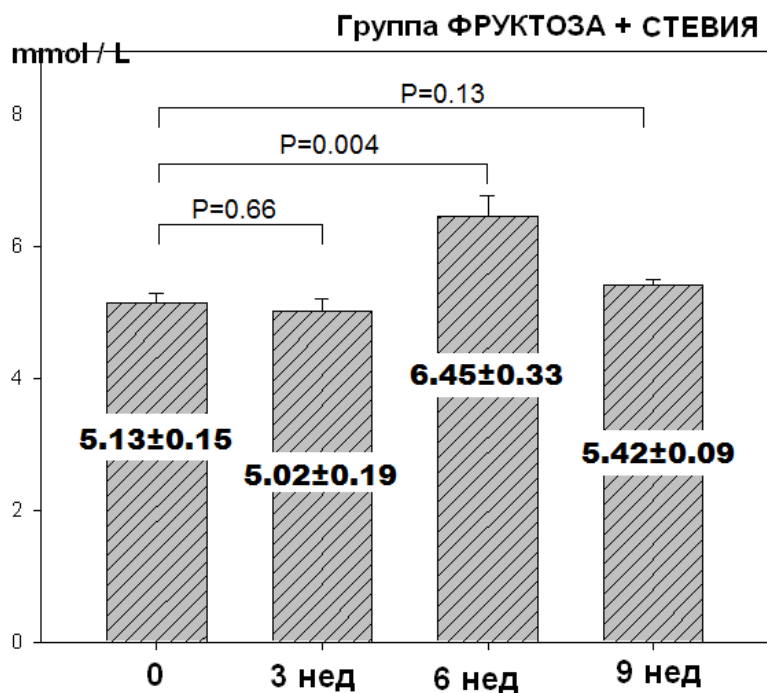


Рис. 17. Уровни глюкозы в плазме крови спустя 3, 6, 9 недель после потребления фруктозы для групп Фруктоза и Фруктоза+Стевия

В Гр. Ф нами получены данные о недостоверном повышении уровня глюкозы к 3 неделе ($5,33 \pm 0,2$ ммоль/л $P=0,38$) и достоверном повышении к 6-ой ($5,97 \pm 0,3$ ммоль/л $P=0,03$) и 9-ой ($7,53 \pm 0,2$ ммоль/л $P=0,001$) неделе от начала потребления фруктозы по сравнению с исходным уровнем средних значений глюкозы ($5,07 \pm 0,2$ ммоль/л) в данной группе (Рис. 17 гр. Ф). В гр Ф+Стевия получены данные о достоверном повышении уровня глюкозы к 6-ой неделе ($6,45 \pm 0,3$ ммоль/л $P=0,004$), на фоне которого применение Стевии наряду с фруктозой в течении последующих 6-9 экспериментальных недель обеспечивает уровень глюкозы, недостоверно отличимый ($5,42 \pm 0,09$ ммоль/л $P=0,13$) от предварительного среднего уровня ($5,13 \pm 0,15$ ммоль/л) данной группы (Рис. 17 гр. Ф+Стевия). Результаты согласуются с данными о гипогликемической активности Армянской Стевии, используемой в качестве дополнительной терапии у двенадцати больных диабетом средней и тяжелой степени [Нагапетян Х.О. и др., 2015]. Результаты указывают на развитие гипергликемии и предотвращении таковой под воздействием

Стевии. Это свидетельствует о нарушении функционирования β -клеток поджелудочной железы, с соответственным снижением уровня секретируемого инсулина в гр.Ф. В гр.Ф+Стевия Стевия оказывает положительную роль в функционировании β -клеток поджелудочной железы животных [Koulajian K., et al., 2013]. С учетом того факта, что повышение уровня глюкозы повышает риск деменций у диабетических и недиабетических индивидуумов на 40% и 18% соответственно [Crane P. K., et al, 2013], уместно напомнить о нулевом гликемическом индексе Стевии. Метаболизм глюкозы, контролируемый сложной сетью органов, желез, молекулярных мессенджеров, основная цель которых установление оптимального баланса между запасаемой энергией и непосредственно доступным топливом для клеточных процессов. Гормоны и пептиды, вовлеченные в гомеостаз глюкозы, такие как инсулин, инсулиноподобный фактор роста-I, глюкагон-подобный пептид-1 и грелин – модуляторы нейрональной пластичности гиппокампа. Механизмы воздействия метаболизма глюкозы на гиппокампальную физиологию сопряжены с указанными модуляторами и затрагивают синаптическую пластичность (напр. синаптическую потенцию и депрессию), структурную пластичность (напр. динамику дендритных отростков) и зрелый нейрогенез, предоставляющих функциональный и структурный субстрат для интеграции нейронов в сети и ведущих к модификации фундаментальных когнитивных действий [Mainardi M., et al, 2015]. В головном мозге большинство энергии от метаболизма глюкозы расходуется на генерацию потенциала действия и постсинаптические потенциалы, а также на биосинтез нейротрансмиттеров [Dienel G.A., 2012.]. При этом транскрипционный фактор CREB, задействованный в пластичность мозга – метаболический сенсор, модулируемый истощением энергетических ресурсов. Поэтому чрезмерное количество питательных субстратов ослабляют синаптическую трансмиссию и вызывают когнитивный спад, в то время как ограничение энергетического снабжения (как в случае нулевой калорийности Стевии) повышает нейрональное выживание и улучшает когнитивную функцию [Fusco S., Pani G., 2013]. Интересно, что активность-зависимая синаптическая пластичность у инсулинорезистентных крыс проявлялась в уменьшении LTP в CA3–CA1 синапсах, в то время как LTD оставалась не затронутой

[Kamal A., et al, 2013], что согласуется с нашими данными о наименьшей уязвимости нейронов с депрессорными ответами, а также адаптогенной роли доминирующего торможения под воздействием Стевии. Более того, инсулин является модулятором синаптической пластичности AMPA рецепторов, в которых при хроническом повышении мозгового инсулина в CA1 гиппокампа больше всего снижается LTP при ВЧС [Adzovic L., Domenici L., 2014], что имело место в нашей группе Ф. При этом необходимо учесть, что эффекты относительно LTP и базального уровня трансмиссии (о чем свидетельствуют наши кумулятивные гистограммы на Рис. 13В, 15В) могут быть радикально противоположными, о чем также свидетельствуют данные этих же авторов.

Аминокислота глицин, как известно, действует как позитивный аллостерический модулятор и обязательный ко-агонист глутамата в NMDA рецепторном комплексе. Транспортёры глицина (GlyT) играют важную роль в постсинаптическом глицинэргическом действии и установлении низкой концентрации экстрацеллюлярного глицина путем обратного захвата в пресинаптическом термине или глиальными клетками. За повышение интрацеллюлярной аккумуляции глицина ответственны широко распространенные в ЦНС крыс GlyT1 [Cubelos B., et al., 2005], где они облегчают ингибиторный потенциал в глицинэргических синапсах. Экспрессия GlyT1 значительно доминирует в регионах мозга с большими популяциями глутаматэргических нейронов (например, гиппокамп). При различных физиологических состояниях внутренние и внешние факторы модулируют способности, локализацию и функциональную активность этих транспортеров. Транскрипционная регуляция и экспрессия рецепторов глицина в ЦНС изучалась относительно их способности облегчать нейротрансмиссию через глицинэргические синапсы, в осуществлении которого играют роль регуляция а) передвижения и плотности транспортеров, б) модуляторов активности транспортеров. Интрацеллюлярная аккумуляция глицина при стрессе (в том числе диабетическом) повышает жизнестойкость клеток, но остается не раскрытым, как контролирование путем экспрессии GlyT1 вовлекается в специфические координаты регуляторной сети во время эпигенетических, транскрипционных, трансляционных или посттрансляционных процессах. Экстракт Стевии в гиппокампальной культуре индуцирует биохимические

маркеры типичные для LTP (pCREB: активируемый cAMP response element binding protein; pMAPK: активируемый mitogen-activated protein kinase; GluR1 на поверхности AMPA рецепторов) (<https://www.google.com/patents/WO2009071277A1>). Как активатор GlyT1, Стевия способствует аккумуляции глицина в окрестности NMDA рецепторов, тем самым активируя их, и в конечном счете индуцирует LTP. Однако долговременное увеличение концентрации внесинаптического глицина может вызвать более диффузную и продолжительную тоническую ингибицию (осуществляемую экстрасинаптическими рецепторами), противопоставляемую фазической ингибиции [Birke G., et al., 2010]. В регуляции нейрональной возбудимости Стевией суммарная депрессия, вызванная экстрасинаптическим увеличением глицина может превышать величину фазической передачи, что и формирует баланс потенциации и депрессии. Модуляция фоновой активности, сохранение уровня общей активности, селективное подавление определенных входных путей, пластические изменения в ингибиторных синапсах путем транскрипционной регуляции и экспрессии рецепторов в конечном счете обуславливает консолидацию пространственного кодирования в нейрональных сетях наших животных в гр. Ф+Стевия.

При интенсивном потреблении фруктозы нейрональный захват фруктозы повышен, и транспортер фруктозы демонстрирует чрезмерную выраженность mRNA, сопровождаемую повышением уровня GLUT5 в гиппокампе [Shu et al., 2006]. У грызунов диета с высоким содержанием фруктозы вызывает снижение уровней фосфорилированных протеинов сигнального каскада инсулина в гиппокампе и коре с последующим когнитивным дефицитом [Mielke et al., 2005]. Наши данные согласуются с фактами об облегченной индукции долговременной депрессии у диабетических крыс [Artola et al., 2005]. Осуществляя нейромодуляторную функцию инсулин изменяет электрофизиологические параметры нейронов [Kovacs, Hajnal, 2009], а также выраженность рецепторов нейротрансмиттеров (глутаматные и ГАМК рецепторы) [Wan et al., 1997] и проводимость ионных каналов [Fadool et al., 2000]. Надо отметить, что для AMPA рецепторов идентифицировано относительно мало форм аллостерической модуляции со стороны внеклеточного пространства, что согласуется с представлениями

об их роли в быстрой синаптической передаче, которая не должна быть чувствительна к внешнему влиянию [Biessels et al., 2002]. На AMPA рецепторы оказывает положительное модулирующее влияние внеклеточный Zn^{2+} [Dreixler J.C., et al., 1997], которым обогащена гидропоническая Стевия (таблица 1 в разделе Материалы и методы). Zn^{2+} оказывает также модулирующее влияние на транскрипцию транспортеров глицина [Cubelos B., et al., 2005].

Наконец, у инсулинорезистентных мышей Стевиозид способен даун-регулировать NF- κ B опосредованные сигнальные пути, улучшая инсулиновую чувствительность всего организма, что позволило предположить, что Стевиозид регулирует инсулиновую резистентность снижением воспалительных процессов [Wang et al., 2012]. Учитывая, что прогрессирование инсулиновой резистентности в метаболический синдром ассоциирован с ROS и TNF α – потенциальными активаторами JNK [Guo et al., 2008], а также роли Стевии в предотвращении инсулиновой резистентности путем регулирования адипоцитокина TNF α , PPAR γ , JNK и ингибиторов β киназы нуклеарного фактора κ B (IKK β) [Mohd-Radzman et al., 2013], предполагаем вовлеченность указанных молекулярных механизмов в описанных нами результатах протекторной эффективности Стевии в ЦНС при интенсивном потреблении фруктозы.

Выявленные нами электрофизиологические параметры нейронов гиппокампа и амигдалы в условиях длительного потребления диетической фруктозы указывают на ключевую роль депрессии для генерации оптимальной активности в сетях энторинальная кора-гиппокамп-амигдала, сопряженных с процессами памяти. Стевия адаптирует (приближая к норме) нарушенный баланс и степень выраженности потенциации/депрессии в исследуемых сетях, что указывает на модулирование пластичности нейронов.

3.10. ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СТЕВИИ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ, ЛЕГКИХ, СЕЛЕЗЕНКИ И ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАНАХ / ЭКЗОСОМАХ В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Фруктоза вызывает повреждение β -клеток поджелудочной железы крыс путем модуляции активности локализованной НАДФ-оксидазы, и за счет продуцированных

супероксидных радикалов (O_2^-) приводит к оксидативному повреждению этих клеток, проявляющегося в виде снижения степени секреции инсулина и повышения фона воспалительных явлений [Román C., et al., 2014]. В результате потребления 10% фруктозы с питьевой водой в течение трех недель у крыс отмечается увеличение уровня Nox и O_2^- с соответствующим повышением фона оксидативного стресса [Fariña J., et al., 2013].

Имеются данные о потенциальной пригодности Nox в качестве мишеней терапии диабета второго типа: ингибитор Nox (апоцинин) предотвращает индуцированные обогащенной фруктозой диетой изменения метаболизма и антиоксидантной системы печени крыс [Castro M., et al., 2012], а липоиновая кислота за счет антиоксидантной активности проявляет антистрессорный эффект [Castro M., et al., 2014]. Показано, что препараты с антиоксидантной активностью (галармин, витамин Е) оказывают мембраностабилизирующее действие путем определенного подавления индуцируемого ферригемоглобином процесса отщепления изоформ Nox из мембран клеточных компонентов тканей млекопитающих [Simonyan R.M. et al., 2013; Фесчан С.М., и др., 2012; 2013]. С другой стороны, при стрептозотоцин-индуцированном диабете крыс положительный антидиабетический и антистрессорный эффект оказывают гликозиды из растения *Stevia rebaudiana* [Shivanna N., et al., 2013; Wölwer-Rieck U., 2012].

Целью исследований, представленных в данной главе, явилось определение антиоксидантной активности Стевии и возможной роли НАДФ-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox в механизмах антидиабетического действия *Stevia rebaudiana* при фруктозо-индуцированном диабете второго типа.

Как показано в Таблице 8, в гр. Фруктоза по сравнению с показателями группы Контроль наблюдается неадекватное увеличение удельного содержания изоформ Nox из клеточных компонентов (мембраны ядер, митохондрий, мембраны клеток и цитоплазматических мембран цитозоля) тканей легких, печени, селезенки, а также эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки. В то же время, НАДФ-зависимая O_2^- -продуцирующая активность изоформ Nox клеточных компонентов исследованных тканей (Рис. 18) в гр.Фруктоза существенно повышается и приближается к показателям гр. Ф+Стевия.

Удельное содержание изоформ Nox (A_{530} в оптических единицах - ое) из клеточных компонентов печени, легких, селезенки, а также из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки в группах Контроль (гр. К), Фруктоза (гр. Ф) и Фруктоза в сочетании со Стевией (гр. Ф+стевия)

Клеточные компоненты					
источники		ядро	митохондрия	мембрана	цитозоль
печень	гр. К	$0,24 \pm 0,02$ $p=0,005$	$0,21 \pm 0,006$ $p=0,01$	$0,23 \pm 0,02$ $p=0,003$	$0,15 \pm 0,02$ $p=0,01$
	гр. Ф	$0,37 \pm 0,02$ $p=0,005$	$0,44 \pm 0,03$ $p=0,002$	$0,56 \pm 0,04$ $p=0,01$	$0,25 \pm 0,02$ $p=0,003$
	гр.Ф+стев.	$0,26 \pm 0,03$ $p=0,01$	$0,28 \pm 0,01$ $p=0,005$	$0,31 \pm 0,002$ $p=0,003$	$0,14 \pm 0,01$ $p=0,001$
легкие	гр. К	$1,7 \pm 0,03$ $p=0,02$	$1,2 \pm 0,1$ $p=0,01$	$2,2 \pm 0,2$ $p=0,005$	$0,2 \pm 0,01$ $p=0,01$
	гр. Ф	$2,5 \pm 0,02$ $p=0,001$	$2,8 \pm 0,3$ $p=0,03$	$5,0 \pm 0,2$ $p=0,02$	$0,4 \pm 0,03$ $p=0,01$
	гр.Ф+стев.	$2,0 \pm 0,1$ $p=0,002$	$1,6 \pm 0,2$ $p=0,002$	$3,1 \pm 0,4$ $p=0,003$	$0,3 \pm 0,01$ $p=0,002$
селезенка	гр. К	$2,1 \pm 0,4$ $p=0,01$	$3,2 \pm 0,5$ $p=0,003$	$1,8 \pm 0,3$ $p=0,002$	$0,7 \pm 0,1$ $p=0,01$
	гр. Ф	$3,0 \pm 0,5$ $p=0,03$	$4,1 \pm 0,4$ $p=0,02$	$3,4 \pm 0,2$ $p=0,005$	$1,3 \pm 0,2$ $p=0,001$
	гр.Ф+стев.	$2,4 \pm 0,2$ $p=0,005$	$3,6 \pm 0,4$ $p=0,004$	$2,2 \pm 0,4$ $p=0,001$	$0,9 \pm 0,1$ $p=0,003$

источники	гр.К	гр.Ф	гр.Ф+стев.
эритроцитарные мембраны	$1,2 \pm 0,2$ $p=0,001$	$2,2 \pm 0,4$ $p=0,01$	$1,6 \pm 0,2$ $p=0,003$
экзосомы сыворотки	$0,16 \pm 0,02$ $p=0,02$	$0,38 \pm 0,04$ $p=0,03$	$0,26 \pm 0,02$ $p=0,001$

Каковы возможные механизмы приведенных изменений? Использованные листья *Stevia rebaudiana* обладают существенной СОД-миметической активностью (20 ед/мг), определенной методом обесцвечивания кумассибриллиантового синего супероксидными радикалами, генерированными при расщеплении перекиси водорода [Simonyan M.A. 1982] (напомним, что активность Cu, Zn-СОД составляет 3000 ед/мг). С другой стороны, препараты с антиоксидантной активностью подавляют релизинг Nox из мембран клеточных формирований [Фесчан С.М., и др., 2013; Simonyan R.M. et al., 2013]. Наряду с

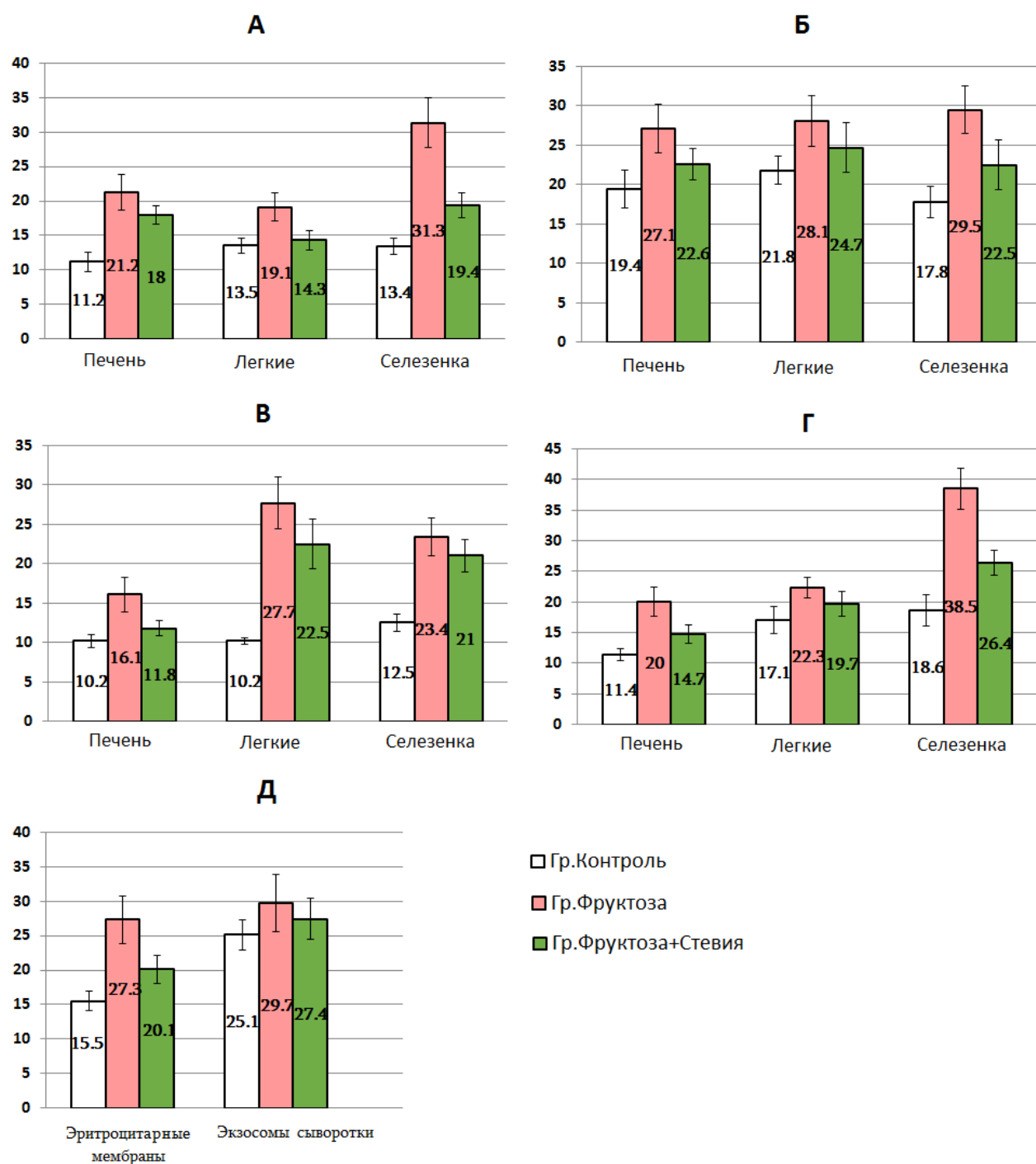


Рис. 18 Удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность изоформ NADPH оксидазы из клеточных компонентов печени, легких, селезенки, а также из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки в гр. Контроль, гр. Фруктоза и гр. Фруктоза+Стевия. А - из клеточных ядер; Б - из митохондрий; В - из клеточных мембран; Г - из цитозоля; Д - из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки.

этим, в последнее время показано, что процесс релизинга изоформ Nox из мембран различных клеточных формирований млекопитающих стимулируется ферригемоглобином за счет образования нестабильного комплексного соединения с Nox, локализованной в биомембранах, и на этом основании был разработан лицензированный способ получения изоформ Nox из клеточных формирований [Симонян Р.М., и др., 2014]. Именно процесс такого отщепления изоформ Nox подавляется под влиянием биоактивных соединений, обладающих антиоксидантной активностью. Это свидетельствует о роли перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот мембран клеточных формирований при отщеплении из них изоформ Nox.

Путем подавления этого процесса антиоксидантами, соответственно снижается и интенсивность отщепления Nox, которая является важным структурно-функциональным компонентом биомембран. За счет продуцируемых супероксидов Nox регулируют окислительно-восстановительные метаболические процессы, происходящие при фагоцитозе, экспрессии генов, митохондриальном дыхании и кислородном гомеостазе [Simonyan G.M, et al., 2006]. В этом и заключается большая заинтересованность к исследованиям Nox. Фактически, подавление релизинга изоформ Nox из клеточных формирований тканей крыс в Гр. Ф в основном ассоциируется с антиоксидантной активностью *Stevia rebaudiana*, хотя не исключается воздействие второго, пока неизвестного фактора. Примечательно, что в приведенных условиях Стевия не изменяет оптические спектральные характеристики и ферментативную активность изоформ Nox. Таким образом, путем подавления релизинга Nox из приведенных биомембран Стевия оказывает мембраностабилизирующий эффект. При этом Стевия защищает мембраны клеточных компонентов от повреждающего действия супероксидов, соответственно, и гидроксильных радикалов, которые являются активными стимуляторами липидной пероксидации клеточных мембран. Возможно, Стевия, защищая этим путем и β -клетки поджелудочной железы, обеспечивает нормальную секрецию инсулина. Можно заключить, что Стевия, обладает высокой СОД-миметической активностью, за счет чего подавляет релизинг изоформ Nox из мембран клеток, ядер, митохондрий, плазмменных мембран цитозоля тканей крыс, а также из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки,

тем самым проявляя мембраностабилизирующий эффект, возможно, путем селективного ингибирования Nox. С тех пор как игнорирование физиологического значения реактивного кислорода привело к неудовлетворительным клиническим результатам, классические антиоксидантные терапии считаются неадекватными: более оправданным и приемлемым подходом могут быть селективные ингибиторы Nox [Maraldi T. 2013].

3.11. ВОЗДЕЙСТВИЕ СТЕВИИ НА АКТИВНОСТЬ НАДФ-ОКСИДАЗЫ ГИППОКАМПА И АМИГДАЛЫ В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ФРУКТОЗОЙ

Основным источником оксидативного стресса и нейродегенеративных заболеваний мозга (в том числе возраст-ассоциированный когнитивный дефицит) признан O_2^- генерирующий фермент NADPH oxidase 2 (Nox2) [Cahill-Smith, Li, 2014; Rojo et al., 2014; Qiu et al., 2016]. Имеются очевидные доказательства связи повышенного прооксидантного статуса с таким многофакторным метаболическим нарушением, как инсулиновая резистентность [Houstis et al., 2006]. Обсуждается двойственная роль реактивного кислорода как клеточной мессенджерной молекулы для нормальной синаптической пластичности, так и в качестве повреждающей токсической молекулы. При этом оценка роли ионных каналов, как мишеных протеинов, подвергающихся оксидативной модуляции, позволит осмыслить влияние таковых на прогрессирование нейродегенеративных заболеваний ЦНС [Peers, et al, 2014]. Таким образом, свойство обоюдоострого меча Nox создает сложность для терапевтического нацеливания этого фермента. Поэтому терапевтическая модуляция активности Nox должна быть усовершенствована с учетом специфики заболевания, тканевой и внутриклеточной локализации Nox, изоформы Nox, и, при этом придается большое значение современным доступным Nox-ингибиторам натурального происхождения [Maraldi T. 2013].

Антиоксиданты и сенситизаторы инсулина были признаны эффективными для предотвращения большинства вызванных фруктозой аномалий и ранних феноменов оксидативного стресса, ассоциированных с компенсаторными метаболическими механизмами печени при обогащенных фруктозой диетах [Castro M.S., et al., 2013]. Тем не

менее, дискутируется роль антиоксидантного статуса в развитии инсулиновой резистентности или диабета у экспериментальных грызунов [Styskal, et al., 2012].

Отмечается обширный рост использования растительных препаратов для мишеней инсулиновой резистентности и оксидативного стресса, вызванных диетами с высоким содержанием фруктозы [Rasineni, et al., 2011]. Достижением считаются экспериментальные и клинические доказательства роли “сладкой травы” Стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) в молекулярных механизмах прогрессирования инсулиновой резистентности и развития такового в диабет второго типа [Mohd-Radzman, et al., 2013]. Фитохимические компоненты Стевии проявляют фармакологическую активность [Brahmachari, et al., 2011].

Целью изучения данной серии на крысиной модели метаболического синдрома, индуцированного длительным потреблением диетической фруктозы явилась оценка терапевтических эффектов Стевии на оптические спектральные показатели, удельное содержание, удельную NADPH зависимую O_2^- -продуцирующую активность комбинированной фракции изоформ Nox, выделенных из гиппокампа, амигдалы и спинного мозга.

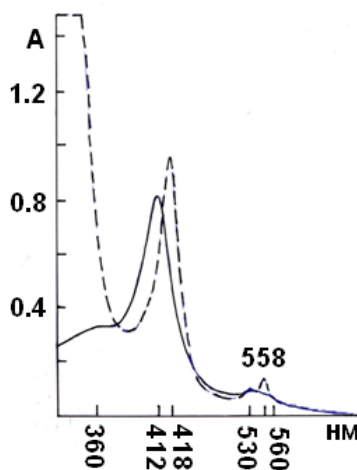


Рис. 19. Форма оптического спектра поглощения комбинированной фракции изоформ Nox (по 20 мл) из амигдалы и гиппокампа крыс Гр.К, Гр.Ф и Гр.Ф+С в окисленном состоянии (сплошная линия) и после восстановления дитионитом натрия (пунктирная линия). Белки растворены в 0,1 М калий фосфатном буфере, pH 7,4

Оптические спектры поглощения комбинированной фракции изоформ Nox (семейство Nox: 22 phox, 91 gphox, 40phox, 47 phox, 67 phox), выделенные из амигдалы и

гиппокампа крыс Гр.К, Гр.Ф и Гр.Ф+С приведены на рисунке 19. Фракции изоформ индивидуальных Nox или комбинированных Nox являются кислыми гемопротеинами и, как уже отметили, элюируются из колонки DE-52 0,1 М КФБ. Приведенные спектры поглощения фракций индивидуальной или комбинированной Nox в группе К, Гр.Ф и Гр.Ф+С практически не отличаются по форме и по максимумам характерного оптического поглощения (отдельные рисунки не приводятся), однако они отличаются по оптическим спектральным индексам (A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}), как это показано на Рис. 19.

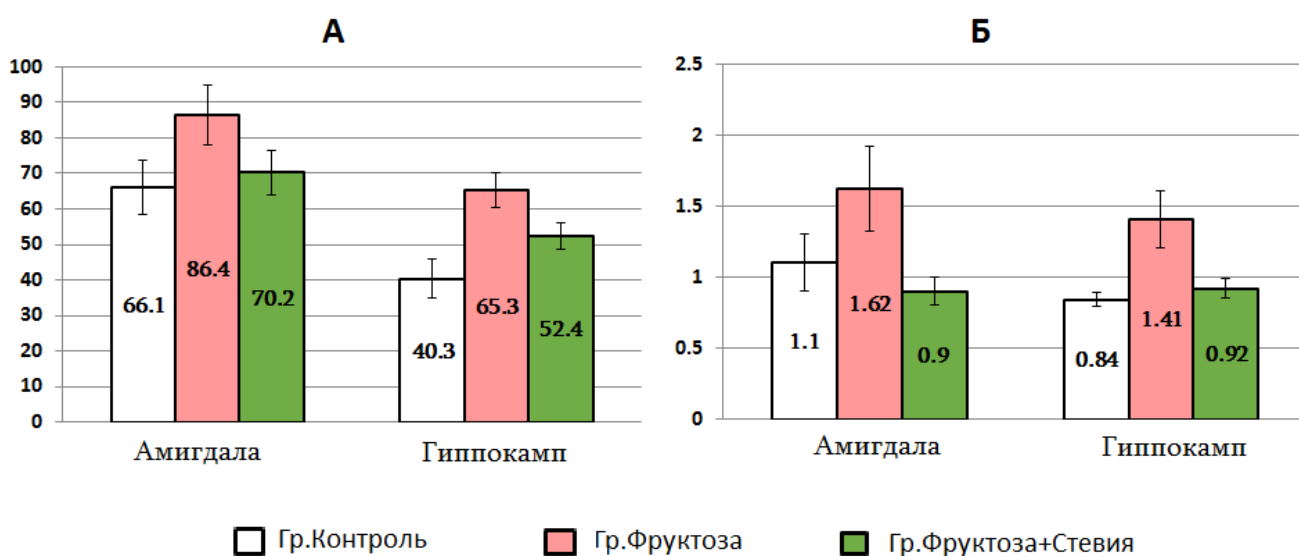


Рис. 20 А. Расчетная удельная NADPH зависимая O_2^- - продуцирующая активность суммарной фракции изоформ Nox (ед/г ткани) в указанных группах ($M \pm m$; $n=6$; $p<0,05$); Б. Расчетное удельное оптическое поглощение суммарной фракции изоформ Nox (в оптических единицах), выделенных из амигдалы и гиппокампа крыс указанных групп ($M \pm m$; $n=6$; $p<0,05$)

В окисленном состоянии имеются α -поглощение при 560нм, β -поглощение при 530нм, поглощение Core – при 412нм, и поглощение при 350-360нм. После восстановления дитионитом натрия появляются характерные оптические спектральные поглощения при 558нм, 535нм, 418нм. Однако, величины оптических спектральных индексов (отношения A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}) приведенных Nox в Гр.К, Гр.Ф и Гр.Ф+С существенно отличаются от таковых у Nox из других тканей, в частности, из легких крыс, за счет увеличения плотности оптического поглощения при 350-360 нм (таблица 9), как результат повышения содержания ФАД в молекуле Nox [Hashida et al., 2004].

Таблица 9

Оптические спектральные индексы отношения A_{412}/A_{360} (1) и A_{412}/A_{530} (2) суммарной фракции изоформ Nox, выделенных из амигдалы и гиппокампа крыс указанных групп ($M \pm m$; $n=6$; $p<0,05$)

Ткань	Группа Контроль		Группа Фруктоза		Гр.Фруктоза+Стевия	
	1	2	1	2	1	2
Амигдала	1.90 ± 0.3 ($p=.005$)	9.57 ± 1.1 ($p=.01$)	1.41 ± 0.3 ($p=.001$)	9.02 ± 0.7 ($p=.03$)	1.82 ± 0.3 ($p=.004$)	9.3 ± 0.4 ($p=.003$)
Гиппокамп	1.81 ± 0.2 ($p=.001$)	8.80 ± 0.7 ($p=.01$)	1.61 ± 0.5 ($p=.003$)	8.72 ± 0.4 ($p=.01$)	1.74 ± 0.4 ($p=.003$)	8.7 ± 0.7 ($p=.003$)

Как показано в таблице 9 по сравнению с показателями Гр.К, в Гр.Ф наблюдается неадекватное снижение оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}) суммарной фракции изоформ Nox из клеточных компонентов амигдалы, гиппокампа и спинного мозга. С другой стороны, под влиянием Стевии в Гр.Ф+С эти показатели приближаются к показателям Гр.К, и при этом не изменяют другие оптические показатели Nox. Максимальное оптическое поглощение при 350-360нм свойственно поглощению свободного или связанного с белками ФАД, и, как известно, изоформы Nox являются ФАД содержащими гемопротеинами – цитохромами b_{558} , при этом ФАД играет роль активатора Nox, как источника электронов [Hashida et al., 2004; Case et al., 2009]. На этом фоне изменение расчетного удельного содержания и НАДФ-зависимой O_2^- -продуцирующей активности комбинированной фракции изоформ Nox в Гр.К, Гр.Ф и Гр.Ф+С происходит также неадекватным образом (Рис. 20). По сравнению с показателями Гр.К, в Гр.Ф наблюдается существенное повышение уровня отщепленных изоформ Nox и их НАДФ-зависимой O_2^- -продуцирующей активности. В Гр.Ф+С эти данные приближаются к показателям Гр.К (Рис. 20). Таким образом, можно утверждать, что

Стевия играет антистрессорную, мембраностабилизирующую роль, снижая степень релизинга изоформ Nox из клеток амигдалы, гиппокампа и спинного мозга, а также снижает мембранодестабилизирующий эффект экстраэритроцитарного ферригемоглобина/ феррогемоглобина в клетках ЦНС. Увеличение удельного содержания отщепленной суммарной фракции изоформ Nox указанных тканей ЦНС в Гр.К. при фруктозо-индуцированном диабете ассоциировано с повышением липидной пероксидации клеток этих тканей. Этим путем доступ гемоглобина к Nox, локализованной на поверхности мембран, повышается, с увеличением степени комплексообразования с гемоглобином и уровня отщепления Nox [Фесчан и др., 2013]. В Гр.Ф+С уровень отщепленных Nox приближается к показателям Гр.К путем подавления липидной пероксидации ненасыщенных жирных кислот под воздействием Стевии, обладающей СОД-миметической активностью (20 ед/мг). Таким путем Стевия оказывает мембраностабилизирующий эффект на клетки амигдалы, гиппокампа и спинного мозга, предотвращая мембранодестабилизирующий эффект внеэритроцитарного гемоглобина. Увеличение НАДФ-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ отщепленной суммарной фракции Nox из амигдалы и гиппокампа в Гр.Ф по сравнению с показателями Nox Гр.К связано с повышением уровня ФАД (увеличение плотности максимального оптического поглощения при 350-360нм или снижение оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{360}) на оптическом спектре поглощения фракции изоформ Nox. Фактически, ФАД является активатором [Case et al., 2009; Hashida et al., 2004] и для Nox амигдалы и гиппокампа. Другим фактором активации приведенных Nox может быть повышение степени фосфорилирования Nox, отщепленных из тканей ЦНС (в ЦНС повышен уровень фосфорилирования Nox) [Bokoch et al., 2009; Infanger et al., 2006]. Как результат этого в Гр.Ф наблюдается увеличение NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей активности суммарной фракции изоформ отщепленной Nox амигдалы, гиппокампа и спинного мозга (3-5 раз). Чрезмерное уменьшение или увеличение активных форм кислорода приводит к ухудшению нейрональной сигнализации в гиппокампе и повреждению формирования памяти [Кнарр, Клapp, 2002]. Мембранные (gp91phox и p22phox) и цитозольные протеины (p40phox, p47phox, p67phox, Rac) - составные активных оксидаз - локализованы и

функционируют в синаптических сайтах [Tejada-Simon et al., 2005]. Продукция супероксида через НАДФ-оксидазы играет важную роль в различных неврологических расстройствах, включая БА. По мере прогрессирования заболевания NOX белки цитозольных субъединиц (p67 (phox), p47 (phox) и p40 (phox)) были значительно повышены; мембраносвязанные субъединицы (gp91 (phox) и p22 (phox)) оставались стабильными [Mubeen A. A., et al., 2011]. При фруктозной диете Стевия за счет СОД-миметической активности, подавляет релизинг суммарной фракции изоформ Nox из тканей ЦНС, с регуляцией НАДФ-зависимой O_2^- -продуцирующей активности этого фермента, проявляя мембраностабилизирующий эффект клеток амигдалы и гиппокампа, с подавлением мембранодестабилизирующего воздействия экстрацеллюлярного гемоглобина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейропротекция и нейропластичность рассматриваются как фундаментальные нейробиологические процессы, участвующие в реализации эндогенной защитной активности организма. Аномальные глутаматные рецепторы [Trudeau F., et al., 2004], снижение амплитуды и длительные задержки компонентов вызванных потенциалов [Suzuki C., et al., 2000], предпочтительное аффертирование постсинаптических AMPA рецепторов [Biessels G., et al., 2002] – характерные показатели ЦНС диабетических животных. С таковыми согласуются наши данные о смещении соотношения ТП ПТП, ТД ПТД, ТД ПТП ответов в условиях интенсивного потребления фруктозы. Более того, оценивая кратковременную пластичность (1 сек на время тетанизации и до 20-30 сек постстимульный временной отрезок регистрации) в данном изучении на модели диабета второго типа выявлено: 1) усиление ТП и ТД ответов (что может быть результатом активации «молчащих» AMPA рецепторов [Isaac J., et al., 1995], либо их конформации [Song I., et al., 2002] или сенсibilизации [Zucker et al., 2002]); 2) урежение перистимульного спайкинга (по-видимому как результат адаптивного снижения функциональной активности NMDA рецепторов). Эти данные мы оцениваем как проявление пластичности

ЦНС в условиях интенсивного потребления фруктозы и вызываемых ею нарушений сигнальных систем глюкозы и инсулина.

Используемая для оценки состояния синаптического аппарата (в том числе нейромедиации) ВЧС вызывает суммацию потенциалов действия и быстротечную/кратковременную активацию некоторых энзимов, осуществляющих индукцию кратковременной потенциации. В экспериментальных изучениях обычно принято LTP делить на три последовательные фазы: кратковременная потенциация, ранняя фаза LTP и поздняя фаза LTP [Sweatt 1999]. Наименее изученными остаются механизмы кратковременной потенциации. Хотя мало значения придается клинической роли LTP, тем не менее, таковые имеют весомый вклад в ряд неврологических заболеваний (депрессия, БА, нейропатическая боль и медикаментозная зависимость) [Cooke, Bliss, 2006].

В условиях интенсивного потребления фруктозы нами показана активация НАДФ-зависимой оксидазы в ЦНС и в ненейрональных тканях. Допускаем, что дисгомеостаз активности НАДФ-зависимой оксидазы есть один из компонентов прямых причин нарушения нейрональной активности. Подкрепляют наше предположение факты о функционировании ROS в качестве посредников сигнальной трансдукции в гиппокампе [Dickinson B. et al., 2011], а также о роли дисрегуляции окислительно-восстановительного баланса в локализации везикулярного аппарата в дендритах и аксонах [Wilson, Gonzalez, 2015]. С этой точки зрения нами получены данные, что Стевия – специфический ингибитор НАДФ-зависимой оксидазы в нейрональной и ненейрональной ткани, что расширяет ее терапевтические возможности. Селективное таргетирование Nox – более продвинутый подход [Maraldi et al., 2013].

Выявленные нами в экспериментальной модели интенсивного потребления фруктозы электрофизиологические данные о преимущественной активации возбуждательных реакций после системного однократного введения терапевтической дозы стевииозидов, дает основание допустить возможность модулирования аллостерических сайтов энзимов G-протеин связанных рецепторов. Хотя мы склонны аргументировать это допущение кратковременностью и ранней выявляемостью эффектов, но осознаем необходимость дополнительных доказательств. В пользу функционирования Стевии в

роли аллостерического модулятора выступают данные о краткосрочных активационных и долгосрочных депрессорных эффектах, что согласуется с представлениями о молекулярных и клеточных факторах контролирования сигнальной трансдукции через переключаемые аллостерические модуляторные протеины, ключевым из которых для натуральных субстратов является G-протеин связанный рецептор [Babel H., Bischofs I.B., 2016]. В этом контексте, многие лигандзависимые трансмембранные каналы дополнительно модулируются аллостерическими лигандами, или аллостерическими регуляторными молекулами, которые могут выступать как активаторами, так и ингибиторами активных сайтов энзимов. Показанная нами электрофизиологическая идентичность фармакологических эффектов Стевиозида и Глибенкламида в ЦНС, также подкрепляет гипотезу аллостерической модуляции сигнальной трансдукции, поскольку в известных механизмах сульфониуреазных рецепторов основную роль выполняют K_{ATP} -зависимый ионные каналы. На системном уровне аллостерическая модуляция Стевией предусматривает нейропротекцию путем долговременных изменений аллостерических лигандов (что в свою очередь ведет к увеличению нейротрофических факторов).

В заключение, результаты предусматривают определенный вклад в понимание механизмов и специфических мишеней контролирования пластичности мозга листьями Стевии при интенсивном потреблении фруктозы и вызываемых ею нарушений сигнальных систем глюкозы и инсулина. Фитохимические компоненты *Stevia rebaudiana* сделали Стевию важной частью лекарственного мира, а также индустрии продуктов питания и напитков [Yadav S.K., et al., 2012]. В листьях Стевии продолжают выявляться такие дополнительные компоненты как негликозидные дитерпены, флавоноиды, полифенолы, витамины и питательные вещества [Gawel-Bebenetal, 2015], что расширяет возможности Стевии как источника мультифункциональных натуральных антиоксидантов.

ВЫВОДЫ

1. В условиях интенсивного потребления диетической фруктозы выявлена аномальная синаптическая активность в нейронах гиппокампа и амигдалы: нарушения частоты престаимпульного спайкинга, нормального соотношения возбуждения и депрессии, а также интенсивности ответов на высокочастотную стимуляцию.
2. В условиях интенсивного потребления диетической фруктозы Глибенкламид модулирует пластичность сети кора-гиппокамп-амигдала путем нормализации показателей частоты престаимпульного спайкинга, увеличения процентного соотношения и интенсивности депрессорных ответов на высокочастотную стимуляцию.
3. У интактных животных после перорального приема листьев Стевии выявлены: а) недостоверное понижение уровня глюкозы в крови; б) отсутствие токсических воздействий на ферментативную систему печени; в) модуляция пластичности цепи кора-гиппокамп-амигдала путем учащения перистимульного импульсного потока наряду с доминированием депрессорных ответов на высокочастотную стимуляцию.
4. На модели интенсивного потребления фруктозы оценкой электрофизиологических параметров синаптической активности в динамике реального времени после инъекции однократной терапевтической дозы Глибенкламида и стевиозида – основного фармакологически активного компонента листьев Стевии – выявлена активация преимущественно возбуждательных реакций в нейронах гиппокампа и амигдалы.
5. В условиях сочетанного потребления фруктозы и Стевии выявлены близкие к норме показатели фоновой активности, а также процентного баланса и интенсивности возбуждательных / депрессорных реакций на время высокочастотной стимуляции и на постстимульное время, указывающие на сохранность пластических свойств сети кора-гиппокамп-амигдала.
6. В условиях интенсивного потребления фруктозы повышается НАДФ-зависимая O_2^- -продуцирующая активность тканей гиппокампа и амигдалы (а также ненейрональных тканей). Антиоксидантная активность листьев Стевии осуществляется путем селективного стабилизирования НАДФ-оксидазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Բարախանյան Մ. Ա., Հովհաննիսյան Լ., Գուլյան Ա., Նահապետյան Խ., Կարազամյան Պ., Բեգլարյան Գ. Նոր տեխնիկական մշակարարական մեղրախոտի (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) ինտրոդուկցիան ՀՀ-ում և ԼՂՀ-ում՝ շահավետ հեռանկարային առաջարկ պետական և մասնավոր ներդրումների համար: Ագրագիտություն 2012, 5-6 մայիս-հունիս, 296-302.
2. Кочикян В.Т. Трансгликозилирование стевиозида и ребаудиозида А с применением бактериальных ЦГТаз. Биол.журн.Армении 2004. 3-4 (56), с.150-154.
3. Нагапетян Х.О., Бабаханян М.А., Майтесян О.В., Симонян К.В., Овсепян Г., Арутянян Р.А. Применение стевии, культивируемой в Арменииб при лечении больных сахарным диабетом (сообщение 2). Мед.наукаАрменииНАНРА, т.LV, N 3, 2015, с. 75-80.
4. Симонян Р.М., Симомян Г.М., Симонян М.А. Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агенства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
5. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. Цитохром b₅₅₈ из сыворотки крови и мембран эритроцитов: выделение, очистка и краткие характеристики. Биохимия 1995. 60(12): 1977–1987.
6. Фесчан С.М., Симонян Р.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Роль гемоглобина в процессе появления экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин. Вопр.теорет.клин.мед. 2012.т. 15(4), с. 12-16.
7. Фесчан С.М., Симонян Р.М., Саргсян А.С., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. α-Токоферол подавляет релизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс. Вопр.теорет.клин.мед. 2013. т. 16(1), с. 36-39.
8. Abramov A. Y., Jacobson J., Wientjes F., Hothersall J., Canevari L., Duchen M. R. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes The Journal of Neuroscience 2005. vol. 25, no. 40, pp. 9176–9184.
9. Adzovic L., Domenici L. Insulin induces phosphorylation of theAMPA receptor subunit GluR1, reversed by ZIP, and overexpression of Protein KinaseMzeta, reversed by amyloid beta. Journal of Neurochemistry 2014.vol. 131, no. 5, pp. 582–587.

10. Ahangarpour A., Yahyavi H. Effect of *Cyperus rotundus* rhizomes on blood glucose, lipid, insulin and hepatic enzymes in insulin resistance model of male rats. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2011.5:70–5.
11. Akirav I., Sandi C., and Richter-Levin G. Hippocampus and amygdala involvement in spatial learning as a function of stress. 2001. Submitted.
12. Akomolafe A., Beiser A., Meigs J.B., Au R., et al. Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease: results from the Framingham Study. *Arch Neurol* 2006.63(11):1551–1555.
13. Arruda A.P., Milanski M., Coope A., Torsoni A.S., Ropelle E., Carvalho D.P., Carvalheira J.B., Velloso L.A. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* 2011. 152(4):1314–1326.
14. Artola A., Kamal A., et al. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. *Eur J Neurosci* 2005.22(1): 169-78.
15. Avila J., Wandosell F., Hernandez F. Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurother* 2010.10 (5):703–710.
16. Babel H., Bischofs I.B. Molecular and cellular factors control signal transduction via switchable allosteric modulator proteins (SAMPs). *BMC Syst Biol*. 2016 Apr 27; 10:35.
17. Banks W.A., Kastin A.J. Differential permeability of the blood–brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* 1998.19(5):883–889.
18. Battaglia D., Lin Y.-W., Brogna C., Crinò A., Grasso V., Mozzi A.F., et al. Glyburide ameliorates motor coordination and glucose homeostasis in a child with diabetes associated with the KCNJ11/S225T, del226-232 mutation. *Pediatr Diabetes*. 2012.13: 656–660.
19. Bedard K., Krause K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
20. Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 2009. 30:586–623.
21. Biessels G. J., Kamal A. et al. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res* 1998.800(1): 125-35.

22. a)Biessels G.J., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006.5(1):64–74. 6)Biessels G.J., van der Heide L.P., Kamal A., Bleys R.L., Gispen W.H. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 2002. 441, 1 – 14.
23. Birke G., Draguhn A. No Simple Brake – the Complex Functions of Inhibitory Synapses. *Pharmacopsychiatry* 2010. 43 (Suppl. 1): S21 – S31.
24. Bokoch G. M., Diebold B., Kim J.-S., Gianni D. Emerging Evidence for the Importance of Phosphorylation in the Regulation of NADPH Oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 2009.11(10): 2429–2441.
25. Bray G.A. Fructose: should we worry? *Int J Obes (Lond)* 2008.32, Suppl 7: S127–S131.
26. Bremer A. A., Mietus-Snyder M., Lustig R. H. Toward a Unifying Hypothesis of Metabolic Syndrome. *Pediatrics* 2012 February 20. vol. 129, p. 557-570.
27. Brennan-Minnella A. M., Shen Y., Swanson R.A. Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death *Cell Death and Disease.* 2013.vol. 4: e580.
28. Bruce-Keller A. J., White C. L., Gupta S., Knight A.G., Pistell P. J., Ingram D.K., Morrison Ch. D., Keller J. N. NOX activity in brain aging: Exacerbation by high fat diet. *Free Radical Biology and Medicine.* Jul 2010.vol. 49: 22-30.
29. Bruce-Keller A.J., Gupta S., Parrino T. E., Knight A. G., Ebenezer Ph. J., Weidner A. M., H. LeVine, Keller J. N., Markesbery W. R. NOX Activity Is Increased in Mild Cognitive Impairment. *Antioxidants & Redox Signaling.* May 2010.12(12): 1371-1382.
30. Brunham L.R., Kruit J.K., Verchere C.B., Hayden M.R. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2008.118(2):403–408.
31. Bunn H.F., Higgins P.J. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science.* 1981. 213(4504):222-224.
32. Caffes N., Kurland D.B., Gerzanich V., Simard J.M. Glibenclamide for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 4.16(3):4973-84.
33. Cahill L., Weinberger N. M., Roozendaal B., McGaugh J. L. Is the amygdala a locus of “conditioned fear”? Some questions and caveats. *Neuron* 1999.23, 227–228.

34. Cahill-Smith S., Li J.-M. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. *British Journal of Clinical Pharmacology* September 2014.vol78, Issue 3, pages 441–453.
35. Canteras N. S., Swanson L. W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHALanterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol* 1992.8, 180–194.
36. Case Ch. L., Rodriguez J. R., Mukhopadhyay B. Characterization of an NADH oxidase of the flavindependent disulfide reductase family from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Microbiology* 2009. 155, 69–79.
37. Casper G. Schalkwijk, Coen D. A. Stehouwer, Victor W. M. van Hinsbergh Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev* 2004. 20: 369–382.
38. Castro M.C, Massa M.L., Schinella G., Gagliardino J.J., Francini F. Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan. 1830(1):2226-32.
39. Castro M.C., Francini F., Schinella G., Caldiz C.I., Zubiría M.G., Gagliardino J.J., Massa M.L. Apocynin administration prevents the changes induced by a fructose-rich diet on rat liver metabolism and the antioxidant system. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Dec.123(12):681-92.
40. Castro M.C., Massa M.L., Schinella G., Gagliardino J.J., Francini F. Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochim Biophys Acta*, 2014. vol. 1840(3), vol. 1145-51.
41. Castro M.C., Massa M.L., Schinella G., Gagliardino J.J., Francini F. Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan.1830(1):2226-32.
42. Cekic V., Vasovic V., Jakovljevic V., Mikov M., Sabo A. Hypoglycaemic action of stevioside and a barley and brewer's yeast based preparation in the experimental model on mice. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 2011.vol. 11, no. 1, pp. 11– 16.
43. Chang J.C., Wu M.C., Liu I.M., Cheng J.T. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Horm. Metab. Res* 2005. vol. 37, №10. pp. 610–616.
44. Chatsudthipong V., MuanprasatC. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*2009. vol. 121, pp. 41-54.

45. Chatsudthipong V., Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther.* 2009. 121:41–54.
46. Chen T.H., Chen S.C., Chan P., Chu Y.L., Yang H.Y., Cheng J.T., Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Planta Med* 2005.71:108–13.
47. Choi S. H., Da Y. L., Seung U. K., Byung K. J. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. *The Journal of Neuroscience* 2005.vol. 25, no. 16, pp. 4082–4090.
48. Choi S. H., Da Y. L., Seung U. K., Byung K. J. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. *The Journal of Neuroscience* 2005.vol. 25, no. 16, pp. 4082–4090.
49. Cifuentes-Pagano E., Meijles D. N., Pagano P. J. The Quest for Selective Nox Inhibitors and Therapeutics: Challenges, Triumphs and Pitfalls. *Antioxidants & Redox Signaling* Jun 2014. vol. 20, No. 17: 2741-2754.
50. Collingridge G.L., Peineau S., Howland J.G., Wang Y.T. Long-term depression in the CNS. *Neuroscience*. July 2010.vol. 11, pp. 459-473.
51. Cooke SF, Bliss TV (July 2006). "Plasticity in the human central nervous system". *Brain: A Journal of Neurology* 129 (Pt 7): 1659-73.
52. Crane P. K., Walker R., Larson E. B. Glucose levels and risk of dementia. *The New England Journal of Medicine* 2013.vol. 369, no.19, pp. 1863–1864.
53. Cubelos B., Gimenez C., Zafra F. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* 2005. 15, 448-59.
54. Dao K. N., Le V. H. Biological properties of flavonoids from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Tap Chi Duoc Hoc* 1995. vol.2, pp. 17–21.
55. Dekker M.J., Su Q., Baker C., Rutledge A.C., Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010.299: E685–E694.
56. Devaskar S.U., Singh B.S., Carnaghi L.R., Rajakumar P.A., Giddings S.J. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept* 1993.48(1–2):55–63.
57. Dickinson B. C, Peltier J., Stone D., Schaffer D. V., Chang C.J. Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nature Chemical Biology* 2011.7, 106–112.

58. Dienel G. A. Fueling and imaging brain activation. *ASN Neuro*2012.vol. 4, no. 5, pp. 267–321.
59. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 2011.51: 1289-1301.
60. Divya S. J., Ganga B., Arun K. Memory Enhancing Effect of Ethanolic Extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) *International Journal of Phytomedicine* 2010.2.166-171.
61. Dreixler J.C., Leonard J.P. Effects of external calcium on zinc modulation of AMPA receptors. *Brain Res* 1997.752: 170-174.
62. Duarte A.I., Moreira P.I., Oliveira C.R. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res*2012.384017.
63. Duarte A.I., Santos M.S., Oliveira C.R., Rego A.C. Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons—involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 2005.39(7):876–889.
64. Dwyer D. D. Glucose metabolism in the brain. San Deigo Academic Press 2002.
65. Eckert G.P., Kirsch C., Leutz S., Wood W.G., Muller W.E. Cholesterol modulates amyloid beta-peptide's membrane interactions. *Mol Neurobiol Pharmacopsychiatry* 2003.36(Suppl 2): S136–S143.
66. Elias M.F., Elias P.K., Sullivan L.M., Wolf P.A., D'Agostino R.B. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiol. Aging* 2005.26:11–16.
67. Elliott S. S., Keim N. L., et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002.76(5): 911-22.
68. Fadool D., Tucker K., Phillips J., Simmen J. Brain insulin receptor causes activity-dependent currents uppression in the olfactory bulb through multiplephosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 2000.83 (4):2332.
69. Fariña J.P., García M.E., Alzamendi A., Giovambattista A., Marra C.A., Spinedi E., Gagliardino J.J. Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Jul 1.125(2):87-97.
70. Farrar C., Houser C.R., Clarke S. Activation of the PI3K/Akt signal transduction pathway and increased levels of insulin receptorn in protein repair-deficient mice. *Aging Cell* 2005.4(1):1–12.
71. Frolich L., Blum-Degen D., Riederer P., Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999.893:290–293.
72. Fusco S., Pani G., Brain response to calorie restriction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013. vol. 70, no. 17, pp. 3157–3170.

73. Gaby A.R. Adverse effects of dietary fructose. *Alternative Medicine Review. Neurobiol Aging* 2004.25(1):93–103.
74. Gastaldelli A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011.vol. 93, no. 1, pp. S60–S65.
75. Gawel-Beben K., Bujak T., Nizioł-Lukaszewska Z. et al. *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. *Molecules* 2015. V. 20, p. 5468-5486
76. Geuns J.M. Stevioside. *Phytochemistry* 2003. 64: 913-21.
77. Ghasemi R., Dargahi L., Haeri A., Moosavi M., Mohamed Z., Ahmadiani A. Brain Insulin Dysregulation: Implication for Neurological and Neuropsychiatric Disorders. *MolNeurobiol* 2013.vol47, N1, p.400-423.
78. Gold S.M., Dziobek I., Sweat V., Tirsi A., Rogers K., Bruehl H., Tsui W., Richardson S., Javier E., Convit A. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007.50:711–719.
79. Goodrich K.M., Crowley S.K., Lee D.-C., Sui X.S., Hooker S.P., Blair S.N., Associations of cardiorespiratory fitness and parental history of diabetes with risk of type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2012.vol.95, no.3, pp. 425– 431.
80. Gregersen S., Jeppesen P. B, Holst J. J., Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*.2004.vol.53, no.1, pp. 73–76.
81. Gribble F.M., Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era *Diabetologia*. Springer-Verlag 2003.46: 875–891.
82. Guemez-Gamboa A., Estrada-Sánchez A. M., Montiel T., Páramo B., Massieu L., Morán J. Activation of NOX2 by the Stimulation of Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptors Contributes to Glutamate Neurotoxicity In Vivo Through the Production of Reactive Oxygen Species and Calpain Activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* Nov 2011. vol. 70: 1020-1035.
83. Guo H., Ling W., Wang Q., Liu C., Hu Y., Xia M. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂- or TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase activation. *Biochemical Pharmacology* 2008.vol. 75, no. 6, pp. 1393–1401.
84. Hajhashemi Sh., Ehsanpour A. A. Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* B. to polyethylene glycol and paclobutrazol treatments under in vitro culture. *Appl Biochem Biotechnol* 2014 Apr 7.172(8):4038-52.
85. Hashida Sh., Yuzawa S., Suzuki N. N., Fujioka Y., Takikawa T., Sumimoto H., Inagaki F., Fujii H. Binding of FAD to Cytochrome b₅₅₈ Is Facilitated during Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase, Leading to Superoxide Production. *The Journal of Biological Chemistry* 2004.279, 26378-26386.

86. Havel P.J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 2009. 2005.63.133. 157.
87. Havrankova J., Roth J., Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 1978. 272(5656):827–829.
88. Havrankova J., Roth J., Brownstein M.J. Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocintreated rodents. *J Clin Invest* 1979.64(2):636–642.
89. Henquin J.C. The fiftieth anniversary of hypoglycaemicsulphonamides. How did the mother compound work? *Diabetologia* 1992.35: 907–912.
90. Holscher C. Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 2011.39(4):891.
91. Hotamisligil G. S., Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology* 2008.vol. 8, no. 12, pp. 923–948.
92. Hu D., Serrano F., Oury T.D., Klann E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J. Neurosci* 2006.26:3933–3941.
93. Hu X., Paik P.K., Chen J., Yarilina A., Kockeritz L., Lu T.T., Woodgett J.R., Ivashkiv L.B. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 2006. 24(5):563–574.
94. Ikegaya Y., Abe K., Saito H., Nishiyama N. Medial amygdala enhances synaptic transmission and synaptic plasticity in the dentate gyrus of rats in vivo. *J. Neurophysiol.* 1995.74, 2201–2203.
95. Ikegaya Y., Saito H., Abe K. Attenuated hippocampal long-term potentiation in basolateral amygdala-lesioned rats. *Brain Res.* 1994.5, 157–164.
96. Ikegaya Y., Saito H., Abe K. Requirement of basolateral amygdala neuron activity for the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Brain Res.* 1995.13, 351–354.
97. Infanger D. W., Sharma R. V., Davisson R. L. A. NADPH Oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function. *Antioxid. Redox Signal* 2006. 8-10, 1583–1596.
98. Isaac J.T.R., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. *Neuron* 1995. 15, 427 – 434.
99. Islam M. S., Wilson R. D. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol.* 2012. V. 933, P.161–174.
100. Ismail W. I. W., King J.A., Pillay T.S. Insulinresistance induced by antiretroviral drugs: current understanding of molecular mechanisms. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa* 2009.vol.14, no.3, pp. 129–132.

101. Itoh S., Matsuoka H., Yasuda Y., Miyake N., Suzuki K., Yorifuji T., et al. DEND syndrome due to V59A mutation in KCNJ11 gene: unresponsive to sulfonylureas. *J PediatrEndocrinolMetab* 2013.26: 143–146.
102. Jeppesen P. B., Gregersen S., Alstrup K. K., Hermansen K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine* 2002.vol.9, no 1, pp.9–14.
103. Jeppesen P. B., Gregersen S., Rolfsen S. E. D., et al. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism* 2003.vol.52, no.3, pp. 372–378.
104. Ji D., Lape R., Dani J. A. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 2001. 31, 131–141.
105. Jiang F., Zhang Y., Dusting G. J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair *Pharmacological Reviews* 2011.vol. 63, no. 1, pp. 218–242.
106. Juyal D. S., Bisht G., Kumar A. Memory Enhancing Effect of Ethanolic Extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) *International Journal of Phytomedicine* 2010. V.2. P.166-171.
107. Kamal A., Ramakers G.M.J., Gispen W.H., Biessels G.J. Hyperinsulinemia in rats causes impairment of spatial memory and learning with defects in hippocampal synaptic plasticity by involvement of postsynaptic mechanisms,” *Experimental Brain Research*, vol. 226, no. 1, pp. 45–51, 2013.
108. Kamsler A., Segal M. Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol* 2004.29:167–178.
109. Khanna A., Walcott B.P., Kahle K.T., Simard J.M. Effect of glibenclamide on the prevention of secondary brain injury following ischemic stroke in humans. *Neurosurg Focus* 2014 Jan.36(1):E11.
110. Kishida K.T., Pao M., Holland S.M., Klann E. NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 2005.94:299–306.
111. Knapp L. T., Klann E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J. Neurosci. Res* 2002.70:1–7.
112. Konoshima T., Takasaki M. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. *Pure and Applied Chemistry* 2002. vol.74, no.7, pp. 1309–1316.
113. Koulajian K., Desai T, Liu G/C., Iovic A, Patterson J.N., Tang C, El-Benna J, Joseph J.W., Scholey J.W., Giacca A. NADPH oxidase inhibition prevents beta cell dysfunction induced by prolonged elevation of oleate in rodents. *Diabetologia* 2013.vol. 56(5), p. 1078-1087.

114. Kovacs P., Hajnal A. In vivo electrophysiological effects of insulin in the rat brain. *Neuropeptides* 2009. 43(4): 283–293.
115. Krucker T., Siggins G.R., Halpain S. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2000.vol. 97. P. 6856–6861.
116. Kunte H., Schmidt S., Eliasziw M., del Zoppo G.J., Simard J.M., Masuhr F., Weih M., Dirnagl U. Sulfonylureas improve outcome in patients with type 2 diabetes and acute ischemic stroke. *Stroke* 2007.38 (9): 2526–30.
117. KurlandD.B., TosunC., PamporiA., KarimyJ. K., CaffesN.M., GerzanichV., SimardJ. M. Glibenclamide for the Treatment of Acute CNS Injury.*Pharmaceuticals* 2013.6(10), 1287-1303.
118. Lambert J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007.43: 332-347.
119. Lawrence M.C., McKem N.M., Ward C.W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Current Opinion in Structural Biology* 2007.vol 17, no 6, pp.699-705.
120. Le K. A., Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2006. 9:469–475.
121. Lee O., Bruce W.R., Dong Q., Bruce J., Mehta R., O`Brien P.J. Fructose and carbonyl metabolites as endogenous toxins. *Chem Biol Interact* 2009. 178 (1-3):332-339.
122. Lemus-Mondaca R., Vega-G´alvez A., Zura-Bravo L., Kong A.H. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 2012. vol.132, no. 3, pp. 1121–1132.
123. Liu R., Liu I.Y., Bi X., Thompson R.F., Doctrow S.R., Malfroy B., Baudry M. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003.100:8526–8531.
124. Lozano I., Van der Werf R. , Bietiger W. , Seyfritz E. , Peronet C. , et al High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & Metabolism* 2016 13:15 p. 1-13
125. Mainardi M., Fusco S., Grassi C. Modulation of Hippocampal Neural Plasticity by Glucose-Related Signaling . *Neural Plasticity* 2015.v. 10. p. 5-15
126. Malenka, R. C., Bear M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004.44(1): 5-21.
127. Malik V.S., Schulze M.B., Hu F.B. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006. 84: 274-88.
128. Malinow R., Malenka R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci* 2002. 25, 103 – 126.

129. Manning C., Ragozzino M., Gold P. Glucose enhancement of memory in patients with probable senile dementia of the Alzheimer's type. *Neurobiol Aging*. 2009.14:523–8.
130. Maraldi T. Natural Compounds as Modulators of NADPH Oxidases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013.vol. 2013, 10 p.
131. Maren S. Fanselow M. S. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal stimulation in vivo. *J. Neurosci*. 1995.15, 7584–7564.
132. Massey P. V., Bashir Z. I. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* 2007.30(4): 176-84.
133. Massey P. V., Bashir Z. I. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* 2007.30(4): 176-84.
134. Mello L. E., Tan A. M., Finch D. M. Convergence of projections from the rat hippocampal formation, medial geniculate and basal forebrain onto single amygdaloid neurons: an in vivo extra- and intracellular electrophysiological study. *Brain Res*. 1992b. 31, 24–40.
135. Mello L. E., Tan A. M., Finch D. M. GABAergic synaptic transmission in projections from the basal forebrain and hippocampal formation to the amygdala: an in vivo iontophoretic study. *Brain Res*. 1992a. 31, 41–48.
136. Mielke J., Taghibiglou C., et al. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *Journal of Neurochemistry* 2005.93: 1568-78.
137. Mlynarski W., Tarasov A. I., Gach A., Girard C. A., Pietrzak I., Zubcevic L., Kusmierek J., Klupa T., Malecki M. T., Ashcroft F. M. Sulfonylurea Improves CNS Function in a Case of Intermediate DEND Syndrome Caused by a Mutation in KCNJ11. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007.3(11):640-645.
138. Mohd-Radzman N. H., Ismail W. I. W., Adam Z., Jaapar S. S., Adam A. Potential Roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013. vol.1 p. 1-11
139. Montonen J., Järvinen R., Knekt P., Heliövaara M., Reunanen A. Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. *J Nutr*. 2007.137:1447–54.
140. Moreira P.I., Cardoso S.M., Santos M.S., Oliveira C.R. The key role of mitochondria in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006.9(2):101–110.
141. Moreira P.I., Santos M.S., Sena C., Seica R., Oliveira C.R. Insulin protects against amyloid beta-peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. *Neurobiol Dis* 2005. 18(3):628–637.
142. Mubeen A. Ansari, Stephen W. Scheff NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression. *Free Radical Biology and Medicine* Jul 2011.Vol. 51: 171-178.

143. Nolan C.J., Damm P., Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011; 378(9786):169–81.
144. Ogden C.L., Carroll M.D., Curtin L.R., McDowell M.A., Tabak C.J., Flegal K.M. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006; Apr 5;295(13): 1549-1555.
145. Olefsky J. M., Glass C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010.72:219–246.
146. Ortega F.J., Gimeno-Bayon J., Espinosa-Parrilla J.F., Carrasco J.L., Batlle M., Pugliese M., Mahy N., Rodríguez M.J. ATP-dependent potassium channel blockade strengthens microglial neuroprotection after hypoxia-ischemia in rats. *Exp. Neurol* 2012. 235 (1): 282–96.
147. Ostroumov K., Grandolfo M., Nistri A. The effects induced by the sulphonylurea glibenclamide on the neonatal rat spinal cord indicate a novel mechanism to control neuronal excitability and inhibitory neurotransmission. *Br J Pharmacol* 2007 Jan. 150(1): 47–57.
148. Otmakhova N.A., Lewey J., Asrican B., Lisman J.E. Inhibition of perforant path input to the CA1 region by serotonin and noradrenaline. *J Neurophysiol* 2005.94(2):1413-22.
149. Ott A., Stolk R.P, van Harskamp F., Pols H.A., Hofman A., Breteler M.M. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 1999.53:1937–1942.
150. Ottersen O. P. Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 1982.V. 10, P. 30–48.
151. Palovcik R. A., Phillips M.I., Kappy M.S., Raizada M.K. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* 1984.309(1):187–191.
152. Pan A., Lucas M., Sun Q., van Dam R.M., Franco O.H., Manson J.E., Willett W.C., Ascherio A, Hu F.B. Bidirectional association between depression and type 2 diabetes mellitus in women. *Arch Intern Med* 2010.170(21):1884–1891.
153. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney. Acad. press., 2005.
154. Peers Ch., Boyle J.P. Oxidative Modulation of K⁺ Channels in the Central Nervous System in Neurodegenerative Diseases and Aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2014.22, 505–521.
155. Perez M. R., Medina-Gomez G. Obesity, adipogenesis and insulin resistance. *Endocrinología y Nutrición*. 2011.vol. 58, no. 7, pp. 360–369.
156. Qiu L.-L., Ji M.-H., Zhang H., Yang J.-J., et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in the hippocampus might contribute to microglial activation in

- postoperative cognitive dysfunction in aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. Jan 2016. vol. 51: 109-118.
157. Racca C., Stephenson F.A., Streit P., Roberts J.D., Somogyi P. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. *J. Neurosci* 2000. vol. 20. p. 2512–2522.
 158. Ragozzino M.E., Gold P.E. Glucose injections into the medial septum reverse the effects of intraseptal morphine infusions on hippocampal acetylcholine output and memory. *Neuroscience*. 1995.68:981–8.
 159. Rao S.S., Attaluri A., Anderson L., Stumbo P. Ability of the normal human small intestine to absorb fructose: evaluation by breath testing. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007.5:959-963.
 160. Rasineni K., Desireddy S. Preventive effect of *Catharanthus roseus* (Linn.) against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in male Wistar rats. *Journal of Diabetes Mellitus* 2011.vol 1, No.3, 63-70.
 161. Reddy S.S., Karuna R., Baskar R. and Saralakumari D. Prevention of insulin resistance by ingesting aqueous extract of *Ocimum sanctum* to fructose-fed rats. *Hormone and Metabolic Research* 2008.40, 44-49.
 162. Reddy V.P., Zhu X., Perry G., Smith M.A. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009.16(4):763–774.
 163. Rensink A.A., Otte-Holler I., de Boer R., Bosch R.R., ten Donkelaar H.J., de Waal R.M., Verbeek M.M., Kremer B. Insulin inhibits amyloid beta-induced cell death in cultured human brain pericytes. *Neurobiol Aging* 2004.25(1):93–103.
 164. Richter-Levin G., Akirav I. Amygdala-Hippocampus Dynamic Interaction in Relation to Memory. *Molecular Neurobiology* 2000, vol. 22(1–3), p. 11–20.
 165. Rizzo B., Zamboni L., Angeloni C., Leoncini E., Dalla Sega F.V., Prata C., Fiorentini D., HreliaSteviol S. Glycosides Modulate Glucose Transport in Different Cell Types. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013.vol 2013.11p.
 166. Rojo A. I., McBean G., Cindric M., Egea J., López M. G., Rada P., Zarkovic N., Cuadrado A. Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*. Oct 2014.vol. 21, No. 12: 1766-1801.
 167. Román C. L., Flores L. E., Maiztegui B., Raschia M. A., Del Zotto H., Gagliardino J.J.. Islet NADPH oxidase activity modulates β -cell mass and endocrine function in rats with fructose-induced oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* December 2014. vol. 1840(12), p. 3475–3482.
 168. Ross A.P., Bartness T.J., Mielke J.G., Parent M.B. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *NeurobiolLearnMem* 2009.92: 410–416.
 169. Rudy J. W. The neurobiology of learning and memory. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 2008.

170. Rutledge A.C., Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev* 2007. 65: S13-S23.
171. Ryu B.R., Ko H.W., Jou I., Noh J.S., Gwag B.J. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. *J Neurobiol* 1999. 39(4):536–546.
172. Sameh S. A., Jared W. Y., Chelsea K. W., Gresack J., Jeste D. V., Geyer M. A., Dugan L. L., Risbrough V. B. Initial evidence linking synaptic superoxide production with poor short-term memory in aged mice. *Brain Research*. 2011. vol. 1368: 65-70.
173. Schulingkamp R., Pagano T., Hung D., Raffa R. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 2000. 24(8):855–872.
174. Seino S., Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003.81: 133–176.
175. Serrano-Martín X., Payares G., Mendoza-León A. Glibenclamide, a blocker of K⁺(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother* 2006.50 (12): 4214–6.
176. Sharma D., Puri M., Tiwary A. K., Singh N., Singh A.J. Antiamnesic effect of stevioside in scopolamine-treated rats. *Indian J Pharmacol* 2010 June. 42(3): 164–167.
177. Shivanna N., Naika M., Khanum F., Kaul V. K. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2012. vol. 27, no.2, pp. 103–113.
178. Shu H.J., Isenberg K., Cormier R.J., Benz A., Zorumski C.F. Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats. *Neuroscience* 2006.140: 889–895.
179. Simard J.M., Woo S.K., Schwartzbauer G.T., Gerzanich V. Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2012.32 (9): 1699–717.
180. Simonyan M.A. Reduction of some organic and inorganic oxidants in alkaline media by superoxide dismutase and scavengers of hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. vol. 108(4), p. 1751-1756.
181. Simonyan G.M, Simonyan R.M., Simonyan M.A. The reduction of hemoglobin by erythrocyte membranes cytochrome b₅₅₈ at various pathological states in vitro. *Electronic J. of Natural Sci. NAS RA* 2006.vol. 2(7), p. 3-6.
182. Simonyan R.M., Chailyan G.S., Shrinyan S.V., Simonyan G.M., Alexanyan S.S., Simonyan M.A. Inadequate changes of the level and activity of extracellular NADPH oxidase, isolated from fluid's nanoparticles of ascetic human lung carcinoma depending on the duration of the disease. *Intern simp. NANO 2014. Moscow* July 13-18, p. 144.

183. Simonyan R.M., Galoyan K.A., Hachatryan A.R., Babayan M.A, Oxuzyan G.R., Simonyan M.A. Ferrihemoglobin induces the release of NADPH oxidase from brain-membrane tissue ex vivo: the suppression of this process by galarmin. *Neurochemical Journal* 2013. 7(3): 221-225.
184. Song I., Huganir R.L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2002. 25, 578 – 588.
185. Song S.-X., Gao J.-L., Wang K.-J. et al. Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats. *Molecular Medicine Reports* 2013.vol. 7, no. 1, pp. 327–331.
186. Sorce S. and Krause K. H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease, *Antioxidants and Redox Signaling* 2009.vol. 11, no. 10, pp. 2481–2504.
187. Sorce S., Krause K.-H., Jaquet V. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Jul 2012.Vol. 69: 2387-2407.
188. Srimaroeng C., Chatsudthipong V., Aslamkhan A. G., Pritchard J.B. Transport of the natural sweetener stevioside and its aglycone steviol by human organic anion transporter (hOAT1; SLC22A6) and hOAT3 (SLC22A8). *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 May. 313(2):621-8.
189. Stanhope K. L., Schwarz J. M., Keim N. L., Griffen S. C., Bremer A. A., Graham J. L., et al. Consuming fructose-sweetened, notglucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009.119:1322–1334.
190. Stanhope K.L., Havel P.J. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr.Opin. Lipidol* 2008. 16–24.
191. Steen E., Terry B.M., Rivera E.J., Cannon J.L., Neely T.R., Tavares R., Xu X.J., Wands J.R., de la Monte S.M. Impaired insulin and like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease—is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 2005.7(1).63–80.
192. Stevens C. F., Wesseling J. F. Augmentation is a Potentiation of the Exocytotic Process. *Neuron* 1999.22 (1): 139–146.
193. Strachan M.W., Deary I.J., Ewing F.M., Frier B.M. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care* 1997.20:438–445.
194. Stranahan A.M., Norman E.D., Lee K., Cutler R.G., Telljohann R.S., Egan J.M., Mattson M.P. Diet-Induced Insulin Resistance Impairs Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitiion in Middle-Aged Rats. *Hippocampus*. 2008.18:1085–1088.

195. Styskal J., Van Remmen H., Richardson A., Salmon A. B. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radical Biology and Medicine* 2012.vol.52, no.1, pp. 46–58.
196. Su Q., Baker C., Rutledge A.C., Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010. 299: E685–E694.
197. Susuki H., Kasai T., Sumihara M., Influence of oral administration of stevioside on levels of blood glucose and liver glycogenofint actrats. *NipponNogeiKagaku Kaishi* 1977. vol. 51, pp. 171–173.
198. Suzuki C., Ozaki I., Tanosaki M., Suda T., Baba M., Matsunaga M. Peripheral and central conduction abnormalities in diabetes mellitus. *Neurology* 2000.54, 1932 – 1937.
199. Swanson L. W., Kohler C. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *J. Neurosci* 1986.6, 3010–3023.
200. Sweatt J. Towardamolecularexplanationforlong-term potentiation. *Learn Mem* 1999. (5): 399–416.
201. Takeda S., Sato N., Uchio-Yamada K., Sawada K., Kunieda T., Takeuchi D., Kurinami H., Shinohara M., Rakugi H., Morishita R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 Apr 13.107(15):7036–41.
202. Tan Y., Kamal M. A., et al. Chinese herbal extracts (SK0506) as a potential candidate for the therapy of the metabolic syndrome. *ClinSci (Lond)* 2011.120(7): 297–305.
203. Tejada-Simon M.V., Serrano F., Villasana L.E., Kanterewicz B.I., Wu G.Y., Quinn M.T., Klann E. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 2005. May.29(1):97–106.
204. Thomas J. E., Glade M. J. Stevia: It's Not Just About Calories. *The Open Obesity Journal*, 2010.2, 101–109.
205. Toop C. R., Gentili Sh. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2016, 8, 577, p. 1–15
206. Tournier N., Saba W., Cisternino S., Peyronneau M.A., Damont A., Goutal S., Dubois A., Dollé F.,Scherrmann J.M., Valette H., Kuhnast B.,Bottlaender M. Effects of selected

- OATP and/or ABC transporter inhibitors on the brain and whole-body distribution of glyburide. *AAPS J.* 2013 Oct.15(4).1082-90.
207. Tran L.T., Yuen V.G., McNeill J.H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and cellular biochemistry* 2009.332: 145–159.
 208. Tremblay E., Zini S., Ben-Ari Y. Autoradiographic study of the cellular localization of [³H]glibenclamide binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 10 June 1991.vol 127, Issue 1, Pages 21–24.
 209. Trudeau F., Gagnon S., Massicotte G. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology* 490. 2004. 177–186.
 210. Tu Y.F., Tsai Y.S., Wang L.W., Wu H.C., Huang C.C., Ho C.J. Overweight worsens apoptosis, neuroinflammation and blood–brain barrier damage after hypoxic ischemia in neonatal brain through JNK hyperactivation. *J Neuroinflammation* 2011.8:40.
 211. Vaithianathan T., Bedi D., Kanju P. M., Wang Z., Bahr B.A., Dityatev A., Judd R.L. Suppiramaniam, V.D. Evidence of AMPA-glutamate receptor dysfunction in brain of streptozotocin-diabetic rats. *Soc. Neurosci* 2003.375.18.
 212. Verberne A. J. M., Sabetghadam A., Korim W. S. Neural pathways that control the glucose counterregulatory response. *Frontiers in Neuroscience* 2014.no. 8, article 38.
 213. Virsolvy-Vergine A., Brück M., Dufour M., Cauvin A., Lupo B., Bataille D. An endogenous ligand for the central sulfonylurea receptor. *FEBS Lett* 1988.242: 65–69.
 214. Virsolvy-Vergine A., Leray H., Kuroki S., Lupo B., Dufour M., Bataille D. Endosulfine, An Endogenous Peptidic Ligand for the Sulfonylurea Receptor: Purification and Partial Characterization From Ovine Brain (Insulin Release) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1992. vol. 89, pp. 6629-6633.
 215. Vos M.B., McClain C.J. Fructose takes a toll. *Hepatology* 2009.50:1004–1006.
 216. Waldstein S.R., Katzel L.I. Interactive relations of central versus total obesity and blood pressure to cognitive function. *Int. J. Obes. (Lond.)* 2006.30:201–207.
 217. Wan Q., Xiong Z. G., Man H. Y., Ackerley C. A., Branton 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.

218. Wang Z., Xue L., Guo C. Stevioside ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by downregulating the NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012.vol. 417, no.4, pp. 1280–1285.
219. Ward M.A., Carlsson C.M., Trivedi M.A., Sager M.A., Johnson S.C. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurol* 2005.23.
220. Wellen K.E., Hotamisligil G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin Invest* 2005.115(5):1111–1119.
221. Welsh J., Dietz W. Sugar-sweetened beverage consumption is associated with weight gain and incidence of type 2 diabetes. *Clin Diabetes* 2005. 23: 150-2.
222. Wickelgren I. Tracking insulin to the mind. *Science* 1998. 280(5363):517–9.
223. Wilson C., González-Billault C. Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Front Cell Neurosci* 2015 Sep 30. 9:381.
224. Xu W.L., Qiu C.X., Wahlin A., Winblad B., Fratiglioni L. Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-upstudy. *Neurology* 2004.63(7):1181–1186.
225. Yadav S., Guleria P. Steviol glycosides from stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*2012. vol. 52, no. 11, pp. 988–998.
226. Yamasaki K., Murakami C., Ohtanietal K. Effects of the standardized Panaxginseng extractG115ontheD-glucosetransport by Ehrlich as cites tumour cells. *Phytotherapy Research* 1993. vol.7, no. 2, pp. 200–202.
227. Yokozawa T., Kobayashi T., Oura H., Kawashima Y. Stimulation of lipid and sugar metabolism in ginsenoside-Rb2treated rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1984. vol.32, no.7, pp. 2766–2772.
228. ZhaoY., Yang X., Ren D.,Wang D., Xuan Y. Preventive effects of jujube polysaccharides on fructose-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice.*Food Funct.* 2014. 5:1771–1778.
229. Zucker R. S., Regehr W. G. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 2002.vol. 64, p. 355–405.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БА – болезнь Альцгеймера	JNK – c-Jun N-terminal kinases c-Jun NH ₂ – концевые киназы
ВЧС – высокочастотная стимуляция	LTD – (Long-term depression) долговременная депрессия
ГАМК – Гамма-аминомасляная кислота	LTP – (Long-term potentiation) долговременная потенция
НАДФ – никотинамидаденин- динуклеотидфосфат	MAPK – mitogen-activated protein kinase (митоген активируемая протеинкиназа)
ПТД – посттетаническая потенция	MEK – mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase митоген-активируемая протеинкиназа/ внеклеточная сигнал-связанная протеинкиназа
ПТП – посттетаническая потенция	NMDA – N- methyl -D-L-aspartate (N-метил-D-L-аспарат)
ТД – тетаническая депрессия	NO – nitric oxide (оксид азота)
ТП – тетаническая потенция	NOX – NADPH-oxidase (Nicotinamid- dinucleotidphosphat) oxidase (НАДФ- оксидаза)
ЦНС– центральная нервная система	PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase (фосфатидилинозитол 3-киназа)
AMPA рецепторы – 2-амино-3-гидрокси- 5-метилизоксазол-4-пропион чувствительные рецепторы (2-amino-3-hidroxi-5-methyl-3-oxo-1,2- oxazol-4-ylpropanoicacid)	PKC – proteinkinase C (протеинкиназа C) PKA – proteinkinase A (протеинкиназа A) PPAR γ –Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (активатор пролиферации пероксисом γ)
AGEs – advanced glycation end products (повышенные конечные продукты гликации)	ROS (Reactive Oxygen Species) – реактивные кислородные радикалы
CREB – cAMP response element-binding protein (цАМФ-ответный элемент активирующего белка)	SUR1 – sulfonylurea receptor 1 (рецептор 1 сульфонилмочевины)
ERK – extracellular signal-regulated kinase (внеклеточная сигнал-связанная протеинкиназа)	TNF- α – tumor necrosis factor α (фактор некроза опухоли α)
GLUT – glucose transporter (транспортер глюкозы)	
GSK-3 – Glycogen synthase kinase (гликоген-синтаза киназа)	
IKK β – ингибитор ядерного фактора κ B kinase β	
IRS1 – субстрат 1 рецептора инсулина	