

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԻՍՈՅԱՆ ԱՐՄԻՆԵ ՍԱՄՎԵԼԻ

**STEVIA REBAUDIANA-ի ԵՎ GLIBENCLAMIDE-ի ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ
ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԸ ՖՐՈՒԿՏՈՉԱՅՈՎ ՀԱՐՈՒՑՎԱԾ ՄԵՏԱԲՈԼԻԿ
ԽԱԽՏՈՒՄՆԵՐԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2017

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. Л.А. ОРБЕЛИ

ИСОЯН АРМИНЕ САМВЕЛОВНА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09 – «Физиология человека и животных»

ԵՐԵՎԱՆ – 2017

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝

Կենաբանական գիտությունների դոկտոր
Վ.Ա. Չավուշյան-Պապյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կենաբանական գիտությունների դոկտոր
Ռ.Շ. Սարգսյան
Կենաբանական գիտությունների դոկտոր,
դոցենտ Ս.Հ. Սարգսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի Պետական Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կկայանա 2017թ. հունիսի 22-ին ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ
ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, ֆիզիոլոգիայի 023
մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, Երևան, Օրբելի եղբ. փող. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գրադարանում և www.physiol.sci.am կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2017թ. մայիսի 18-ին:

023 մասնագիտական խորհրդի

գիտական քարտուղար,

Կենաբ.գիտ.թեկնածու

Լ. Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на ученом совете Института физиологии им. Л. А. Орбели НАН
РА

Научный руководитель:

доктор биологических наук
В. А. Чавушян-Папаян

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Р. Ш. Саркисян
доктор биологических наук,
доцент С. Г. Саркисян

Ведущая организация:

Ереванский Государственный Университет

Защита диссертации состоится 22 июня 2017г. в 14⁰⁰ч. на заседании Специализированного
совета 023 по Физиологии, в Институте физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА (РА, 0028, г.
Ереван, ул. бр. Орбели 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. Л. А. Орбели
НАН РА и на сайте www.physiol.sci.am.

Автореферат разослан 18 мая 2017г.

Ученый секретарь специализированного совета 023

Кандидат биологических наук

Н.Э. Тадевосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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]. Потребление фруктозы ассоциировано с метаболическим синдромом и с повышением риска диабета второго типа [Elliott, et al., 2002; Le K., Tappy L., 2006; Lozano I. et al., 2016]. 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]. 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.A. 2008; Reddy S.S., et al., 2008; Stanhope K.L., et al., 2009; Lozano I. et al., 2016]. 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; Toop C., Gentili, 2016].

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 частью регуляторного механизма секреции инсулина (индукция инсулиновой резистентности, повышение маркеров оксидативного стресса) [Román C., et al., 2014]. Корректировка антиоксидантного статуса лабораторных грызунов в значительной степени предопределяет развитие инсулиновой резистентности и диабета [Styskal J., et al., 2012], а также развитие индуцированных фруктозой плюриметаболических изменений в нервной системе [Dekker M., et al., 2010; Su, et al., 2010]. Хотя НАДФ-оксидаза – известный источник реактивного кислорода (ROS) в ЦНС, однако вопреки традиционным взглядам об исключительно разрушительной роли показано, что ROS функционируют как мессенджерные молекулы каскадов сигнальной трансдукции физиологических процессов в гиппокампе (ROS может быть необходимой для гиппокампальной долговременной потенциации), и контролирование биохимии ROS необходимо для поддержания и сохранения специфических клеточных популяций головного мозга [Dickinson V., et al., 2011]. Доказано, что дисрегуляция редокс баланса ведет к повреждению ДНК, липидной пероксидации, aberrантной 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 мишенными протеинами, задействованными в прогрессировании нейродегенеративных заболеваний ЦНС [Peers Ch., et al., 2014]. Среди ингибиторов НАДФ-оксидазы натурального происхождения наибольшего внимания заслуживают полифенолы [Tullia M., et al., 2013; Gawel-Beben, et al., 2015].

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 Стевии обусловлена в основном полифенолами [Najihashemi, Ehsanpour, 2014]. Противовоспалительные эффекты Стевии (необходимые для предотвращения инсулиновой резистентности) осуществляются путем индуцирования систем сигнальной трансдукции и ферментов [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]. Фитохимические компоненты *Stevia rebaudiana* сделали Стевию важной частью лекарственного мира, а также индустрии продуктов питания и напитков [Yadav, et al., 2012; Gawel-Bebenetal, 2015].

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

При метаболических нарушениях, вызванных интенсивным потреблением фруктозы, и коррекции таковых остаются недостаточно изученными механизмы синаптической пластичности. Востребованы системные электрофизиологические исследования с использованием тетанической высокочастотной стимуляции (ВЧС), используемой для оценки состояния синаптического аппарата [Sweatt J., 1999], в частности, кратковременной потенциации/депрессии и ранней фазы долговременной потенциации/депрессии, которые лежат в основе формирования долговременной потенциации (LTP) и депрессии (LTD) [Zucker R., Regehr W., 2002].

Цель и задачи исследования.

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 Стевии (*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 базолатеральной амигдалы при ВЧС гиппокампа у крыс с фруктозой обогащенной диетой.
- ✓ Оценка воздействия Стевии на параметры синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы у интактных животных.
- ✓ Оценка протекторной эффективности Глибенкламида и Стевии в *in vivo* экстраклеточных исследованиях ВЧС-вызванной спайковой активности нейронов гиппокампа и базолатеральной амигдалы у крыс с фруктозой обогащенной диетой.
- ✓ Оценка параметров синаптической активности нейронов гиппокампа и амигдалы в динамике системного (внутримышечного) воздействия Глибенкламида и Стевиозида – фармакологически активного компонента *Stevia rebaudiana*.

✓ Оценка антиоксидантного воздействия *Stevia rebaudiana* на НАДФ-оксидазную активность гиппокампа, миндаля и другие ненейронные 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 базолатеральной миндалевидной железы и состояние НАДФ-оксидазной системы указанных формаций головного мозга, а также перспектив разработки многомишеневых и полифункциональных фитопрепаратов (с адаптогенной, антиоксидантной, антидиабетической, ноотропной активностью) из отечественного сырья *Stevia rebaudiana*. Получены новые данные в фундаментальных аспектах синаптической пластичности, указывающие на возможность модулирования синаптического аппарата сетей энторинальной кора-гиппокамп-миндалевидная железа путем Армянской Стевии как самостоятельно, так и при диабетическом стрессе. Впервые получены данные о состоянии НАДФ-оксидазы головного мозга и периферических тканей при индуцированных фруктозой метаболических нарушениях, и коррекции таковых Армянской Стевией, что возможно, послужит основой для совершенствования целевых лекарственных пищевых продуктов. Фундаментально аргументированная интерпретация связи модулированной нейрональной синаптической активности и НАДФ-оксидазной активности в структурах мозга, ответственных за обучение и память – новая теоретическая база, подтверждающая эффективность Армянской Стевии для предотвращения вредоносных последствий интенсивного потребления фруктозы. Выявлены электрофизиологические показатели идентичной (возбудительной) 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 подтверждение 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.

Структура диссертации. Диссертация изложена в традиционной форме на 125 страницах и включает 2 схемы, 20 иллюстраций, 9 таблиц. «Литературный обзор» изложен на 29 страницах, «Результаты и их обсуждение» - на 57 страницах. Список цитируемой литературы содержит 229 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 в течение 6 недель ежедневно вместо питьевой воды только питьевую воду с добавлением диетической фруктозы (20% раствор) (Группа Фруктоза $n=12$) (Гр.Ф); 3) животные на стандартном питье и получающие с пищей порошок листьев гидропонической Стевии 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; 8 животных употребляли питьевую воду на 20% фруктозе в течение 9 недель ежедневно (Гр.Ф); 8 животных употребляли питьевую воду на 20% фруктозе в течение 9 недель ежедневно и порошок листьев Стевии (20 мг/кг) получали с пищей с 6 по 9 недели (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. У тех же животных были изъяты гиппокамп, миндалина, печень, селезенка и легкие.

Растительное сырье *Stevia rebaudiana* Bertoni и биотехнологическое получение Стевиозида. Использовали листья *Stevia rebaudiana* Bertoni, выращенной методом гидропонии в Институте проблем гидропонии НАН РА, с целью получения экологически чистого растительного сырья обогащенного йодом, цинком, биологически активными веществами и с низким содержанием токсических элементов. За предоставление сырья и проведение биохимического анализа состава выражаем благодарность М.А. Бабахяну и Л.Э. Оганесян. Для получения Стевиозида путем биокаталитического ферментативного трансгликозилирования экстракта Армянской Стевии были использованы высокоэффективные циклодекстрин глюканотрансферазы, продуцируемые *Bacillus stearothermophilus* и *Bacillus pasteurii* [Кочикян В., 2004]. Использованный в экспериментах порошок Стевиозида содержит 90% Стевиозида и 10% Ребаудиозида А, за предоставление которого выражаем благодарность В.Т. Кочикяну (Научно-производственный центр «Армбиотехнология»).

***In vivo* экстраклеточные электрофизиологические исследования** проводили по истечении 6 недель. Регистрировали фоновую и вызванную спайковую активность одиночных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции (ВЧС) ипсилатеральной энторинальной коры, а также одиночных нейронов базолатеральной миндаловидной железы при ВЧС СА1 гиппокампа. Импульсный поток нейронов, после регистрации подвергался программному анализу, позволяющему исключить артефакты ВЧС и оценивать спайковую активность на время тетанизации. На основе распределенного в реальном времени пре- и постстимульного спайкинга активности единичных нейронов программно выводились диаграммы средних частот дифференцированно для пре- и постстимульного времени, включая период ВЧС (Рис. 1). Целью анализа являлось определение статистической достоверности различий частоты спайковой активности на пристимульном и постстимульном временном отрезке, а также на время ВЧС (время тетанизации).

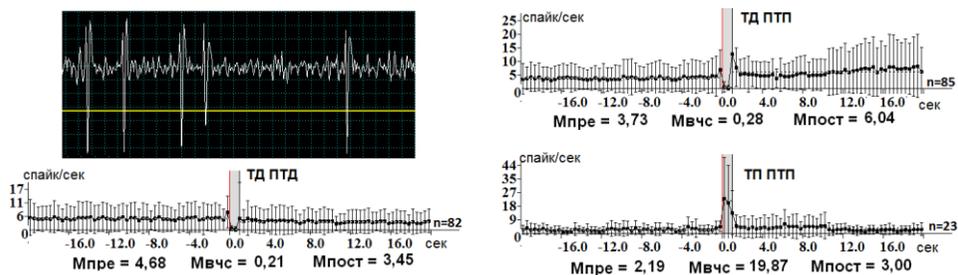


Рис.1 Спайковая активность единичного нейрона гиппокампа (желтая линия – амплитудный дискриминатор); перистимульные диаграммы средней частоты, построенные на основе пре- и постстимульных проявлений спайковой активности единичных нейронов гиппокампа при

стимуляции энторинальной коры в реальном времени 20 сек до стимуляции (Mpre), 20 сек после стимуляции (Mpost) и на время высокочастотной стимуляции (Mvcs), проявляющих указанный тип ответов (ТД-ПТД, ТД-ПТП, ПП-ПТП) в группе Фруктоза

Анализ импульсного потока единичных нейронов выявил ответы в виде учащения импульсного потока - тетанической потенциации (ТП) и посттетанической потенциации (ПТП), а также урежения импульсного потока – тетанической депрессии (ТД) и посттетанической депрессии (ПТД). Зарегистрированы также смешанные комбинации ответов – ТД-ПТП и ареактивных нейроны. Для избираемых сравниваемых экспериментальных групп (а также для отдельных популяций нейронов, проявляющих определенный одинаковый тип ответов) программно выводились усредненные перистимульные кумулятивные гистограммы.

Биохимические исследования. Для выделения комбинированной фракции изоформ Nox из ЦНС были изъяты гиппокамп и миндаля. Осуществляли гомогенизацию тканей (1г в 20 мл воды) 2 мин при 4°C и 1000 об/мин. К гомогенизатам добавляли свежий ферригемоглобин из гемолизата эритроцитов человека и инкубировали при 37°C и pH7,4-8 1ч. Инкубационные смеси с pH 5,6 центрифугировали при 10000xg 20 мин. Выделение и очистка мембран клеточных компонентов тканей крыс. Клеточные компоненты из печени, селезенки и легких выделяли дифференциальным центрифугированием гомогенатов тканей в 0,25М сахарозе по 10 мл/г тканей. После осаждения клеточных мембран супернатант отделяли для выделения Nox из плазменных мембран цитоплазмы. Осажденные фракции ядер, митохондрий и мембран клеток гомогенизировали водой (1:500об/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 2 ч. После отделения клеточных компонентов плазмы, осадок эритроцитов промывали физраствором (1:400 об/об) и осаждали центрифугированием при 5000xg 10 мин. Эритроциты подвергали гемолизу в воде (1:20 об/об) с перемешиванием гемолизата 10 мин. Эритроцитарные мембраны осаждали при pH5,6 при центрифугировании 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, при pH7,4-8, после инкубации растворов при 37°C 2ч. После 25-30-ти кратного разбавления этих фракций и центрифугирования при 10000xg 20 мин, супернатанты клеточных компонентов подвергали ионообменной хроматографии. Фракцию экстрацеллюлярной Nox (eNox) из экзосом сыворотки крови после разбавления таким образом подвергали ионообменной хроматографии. Фракции обогащенных изоформ Nox из колонки с ДЕ-52 элюировали 0,01М калий фосфатным буфером, pH7,4. eNox из колонки с ДЕАЕ А-50 – 0,03 М КФБ и после разбавления водой (25 раз) концентрировали на колонке с ДЕ-52, из которой eNox элюировали 0,03М калий фосфатным буфером [Симонян Р., и др., 2014]. Определение НАДФ- зависимой O₂⁻-продуцирующей активности изоформ Nox. НАДФ-зависимую O₂⁻-продуцирующую активность изоформ Nox определяли методом нитротетразолиевого синего. За единицу O₂⁻-продуцирующей активности изоформ Nox 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 O₂⁻-продуцирующую активность изоформ Nox определяли в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки или 1 г тканей. Расчетное удельное

содержание изоформ Nox определяли по плотности характерного максимального оптического поглощения (о.е.) при 530 нм (β - полоса поглощения) для 1 мл Nox, 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.Бунятяна НАН РА под руководством профессора М.А.Симоняна, за что выражаем благодарность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофизиологическое исследование воздействия Стевии и Глибенкламида на активность нейронов гиппокампа крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.

В Гр. Контроль имеем следующий баланс типов зарегистрированных ответов (Таблица) – 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%). Иными словами, зарегистрировано доминирование депрессорных ответов на время ВЧС (тетаническая депрессия в 89,12% (44,90+44,22%) нейронов) и незначительное процентное превосходство возбудительных ответов на постстимульное время (посттетаническая потенция в 54,00% (44,22+10,88%) нейронов). 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 %) (Таблица), 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. Контроль. 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%). В Гр. Фруктоза+Стевия 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 (Таблица), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (47,7+42,4+6,4=96,5%) (превышает уровень таковых в Гр.Контроль и Гр.Фруктоза) и незначительное превосходство возбуждения на постстимульное время (47,7+3,5=51,2%) (что близко к уровню таковых в Гр.Контроль). В Гр. 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% – ареактивность. 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 группе Фруктоза диаграмма средней частоты перистимульной спайковой активности нейронов с ответами в виде ТП-ПТП свидетельствует о 9-кратно выраженном возбудительном ответе на время ВЧС (19,87:2,19 спайк/сек) (Таблица). Согласно средней частоте в нейронах с ответами в виде ТД-ПТД (Таблица для группы Фруктоза) ТД выражена 22 раза (4,68:0,21). В популяции нейронов с ответами в виде ТД-ПТП (Таблица) 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 для гр. Контроль). Таким образом, в Гр.Фруктоза выявлены более выраженные по сравнению с Гр. К

ответы на время ВЧС. В Гр. Фруктоза+Стевия тетаническая потенциация 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) (Таблица для Гр. Фруктоза+Стевия). В нейронах гиппокампа, проявляющих лишь только ТД, выраженность такового составляла 18,6 (3,34 : 0,18 спайк/сек) (Таблица для Гр. Фруктоза+Стевия). Таким образом, в Гр. Фруктоза+Стевия выраженность ответов на время ВЧС имеет тенденцию приближения к таковым в Гр.Контроль.

Таблица

Цифровые значения на перистимульном временном отрезке и на время ВЧС, построенные на основе гистограмм средней частоты спайковой активности нейронов гиппокампа с указанными типами ответов для групп Контроль, Фруктоза и Фруктоза +Стевия.
 ↑повышение и ↓понижение частоты спайков

Гр. контроль (гиппокамп) n = 294	Типы ответов	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП 10,88%	8,11	32,45 ↑4 x	10,97 ↑1,4 x
	ТД-ПТП 44,22%	5,78	0,73 ↓7,9 x	9,88 ↑1,7 x
	ТД-ПТД 44,90%	6,53	0,76 ↓8,6 x	4,66 ↓1,4 x
Гр. Фруктоза (гиппокамп) n = 190	Типы ответов	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП 12,10%	2,19	21,03 ↑9,6 x	3,0 ↑1,4 x
	ТД-ПТП 44,74%	3,73	0,25 ↓14,9 x	5,98 ↑1,6 x
	ТД-ПТД 43,16%	4,68	0,23 ↓20,3 x	3,45
Гр. Фруктоза +Стевия (гиппокамп)	Типы ответов	М престимул спайк/сек	М высокочастотн. стимуляции спайк/сек	М постстимул спайк/сек
	ТП-ПТП 3,50%	2,38	3,33 ↑1,4 x	3,69 ↑1,5 x
	ТД-ПТП 47,70%	5,42	0,43 ↓11,3 x	7,26 ↑1,3 x

	ТД-ПТД 42,40%	6,50	0,37 ↓17,6 x	4,61
	ТД 6,40%	3,34	0,18 ↓18,6 x	3,30

Если учесть, что спайковая пререстимульная/постстимульная активности всех зарегистрированных нейронов (с ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами) в группе Фруктоза значительно ниже по сравнению с таковыми в норме, то в Гр. Фруктоза+Глибенкламид пререстимульный уровень спайковой активности превышает таковые в группе Фруктоза, приближая их к норме. Так в популяции нейронов, проявляющих ТД-ПТД ответы Мпрестим=4,68 спайк/сек в гр Фруктоза (Таблица) и Мпрестим=7,05 спайк/сек в гр Ф+Г; в популяции нейронов, проявляющих ТД-ПТП ответы Мпрестим=3,73 спайк/сек в гр. Фруктоза (Таблица) и Мпрестим=6,12 спайк/сек в Гр. Ф+Г. Анализ выраженности ответов на время ВЧС и постстимульный отрезок на основе перистимульных диаграмм средней частоты позволяет заключить: 1) в сравниваемых группах Фруктоза и Фруктоза+Глибенкламид 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); 2) учащение спайковой активности на время ВЧС (ТП ответы) в Гр. Фруктоза доходит до 19,87 спайк/сек (что девятикратно превышает пререстимульную частоту спайков), а в Гр. Фруктоза+Глибенкламид – до 5,43 спайк/сек (что превышает пререстимульную частоту спайков в 3,4 раза). В гр. Фруктоза+Глибенкламид ТП в нейронах гиппокампа с ТП-ПТП выражена 3,4 раз (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 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.Фруктоза. 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, можно утверждать о регулирующей роли Глибенкламида на возбудительные входы в сети энторинальная кора – гиппокамп.

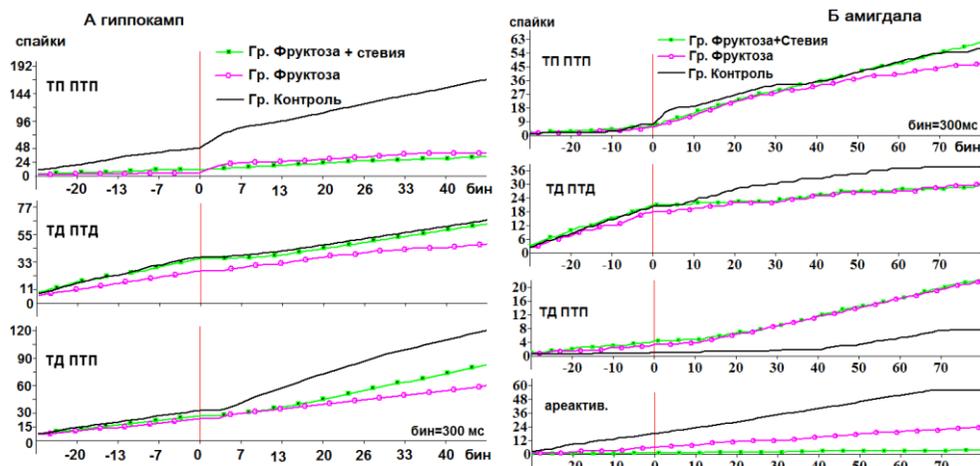


Рис. 2. Сравнительные кумулятивные кривые в группах Контроль, Фруктоза и Фруктоза+Стевия для указанных типов ответов в нейронах гиппокампа (А) и базолатеральной амигдалы (Б)

Анализ кумулятивных гистограмм в группах Контроль, Фруктоза, Фруктоза+Стевия (Рис. 2 А) выявил: 1) в нейронах с ТП- ПТП ответами наиболее высокий (количественный) уровень пре- и постстимульных спайков в Гр. Контроль, наиболее низкий уровень престимульных спайков в Гр. Ф, наиболее низкий уровень постстимульных спайков в Гр. Фруктоза+Стевия; 2) в нейронах с ТД-ПТД ответами практически одинаковый уровень пре- и постстимульных спайков в Гр. Контроль и Гр. Фруктоза+Стевия (таковые составляют 42,40%) и сравнительно низкий уровень таковых в Гр. Фруктоза; 3) в нейронах с ТД-ПТП ответами практически одинаковый уровень престимульных спайков (или фоновой активности) в группах Контроль, Фруктоза, Фруктоза+Стевия и наиболее высокий (количественный) уровень постстимульных спайков в Гр. Контроль, а наиболее низкий для таковых в Гр. Фруктоза.

Электрофизиологическое исследование воздействия Стевии и Глибенкламида на активность нейронов базолатеральной амигдалы крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой.

Сравнительный анализ кумулятивных гистограмм в группах Контроль и Фруктоза (Рис. 2 Б) 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, 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.Контроль зарегистрированы 168 нейронов, которые проявляли следующие типы ответов: ТП-ПТП (25%), ТД-ПТП (25%), ТД-ПТД (35,7%). 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 потенция (25+25=50%) (посттетаническая депрессия составляет 35,7%). Ареактивные единицы составляли 14,3% (24 нейрона). В Гр. Фруктоза+Глибенкламид 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, 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%).

Согласно детальному анализу на основе перистимульных диаграмм частоты в Гр. Фруктоза тетаническая потенция на время ВЧС в нейронах с ТП-ПТП выражена 2,1 раза (5,64 : 2,67 спайк/сек) (таковые в Гр. Контроль 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. Контроль выражены соответственно в 3,3 и

5,7 раза). В Гр. Фруктоза+Глибенкламид тетаническая потенциация 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-ПТД 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 Фруктоза+Глибенкламид зарегистрировано повышение интенсивности депрессии на время ВЧС по сравнению с группами Фруктоза и Контроль. В Гр. Фруктоза+Стевия тетаническая потенциация 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). Таким образом, в нейронах амигдалы группы Фруктоза+Стевия зарегистрировано повышение интенсивности депрессии на время ВЧС по сравнению с гр. Фруктоза, что приближает таковые к показателям гр. Контроль.

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 [Tudeau, 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 группой интактный Контроль при одновременном наличии значительно низкого уровня фоновой активности нейронов гиппокампа и амигдалы (согласно кумулятивным кривым) и выраженности тетанической потенциации (согласно диаграммам перистимульной средней частоты) во всех популяциях нейронов амигдалы в гр. Фруктоза. В электрофизиологических экспериментах обнаружено, что облегчение парных импульсов не модулировалось в 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 потенциации [Biessels, et al., 2002]. Электрофизиологические эксперименты указывают, что диабет стрептозотоцин индуцированных крыс связан с биофизическими аномалиями AMPA-рецепторов [Vaithianathan, 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 и 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. Фруктоза популяции всех нейронов проявляли значительно низкий уровень перистимульной активности по сравнению с гр. Контроль (Рис. 2 А). 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, либо они являются электрофизиологически “молчащими” [Isaac, et al., 1995]. Такие изменения ответов могут быть вызваны увеличением числа рецепторов AMPA или их конформациями [Song, et al., 2002]. Нами показано увеличение доли ТП-ПТП ответов (12,10% вместо 10,88% в контроле). 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) [Rassa C., et al., 2000]. Высоочастотная стимуляция инициирует быстрое (30–60 сек) встраивание в мембрану из депо глутаматных рецепторов при участии транспортных белков. На этом этапе важна стабильность существующего цитоскелета [Kucker, 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 престаимульные и постстимульные временные отрезки в группе 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]. 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. 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 рилингу пулов нейротрансмиттеров на каждый потенциал действия [Stevens, Wesseling, 1999]. Синаптический прирост осуществляется через облегчение, аугментацию или посттетаническую потенциацию. 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 рилингу везикулов, и может также возникать от возвратной активации пресинаптических рецепторов и от постсинаптического процесса десенситизации [Zucker, et al., 2002].

Электрофизиологическое исследование динамики воздействия однократной дозы Глибенкламида и Стевиозида – основного фармакологического активного компонента листьев Стевии на активность нейронов гиппокампа и амигдалы крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой

В отдельных сериях экспериментов исследована вызванная спайковой активности нейронов амигдалы при ВЧС гиппокампа, а также нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры в условиях однократного системного применения Глибенкламида и стевиозида 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 20-50 и повторно 85-95 минуты) и нейронов амигдалы (также с двумя пиками активации) в динамике воздействия Глибенкламида (Рис. 3 А, Б).

Степень улучшения Глибенкламидом неврологической функции пациентов оспаривается: у некоторых пациентов ограниченное восстановление моторной и когнитивной функции наблюдались после начала терапии [Battaglia, et al., 2012], однако, у многих пациентов Глибенкламид и другие сульфониуреазы оказались неэффективными для восстановления неврологической функции, если даже они благополучно контролировали диабет [Itoh, et al., 2013]. Тем не менее, Глибенкламид является широко распространенным антидиабетическим препаратом с потенциальным благотворным эффектом при заболеваниях ЦНС [Tournier, et al., 2013].

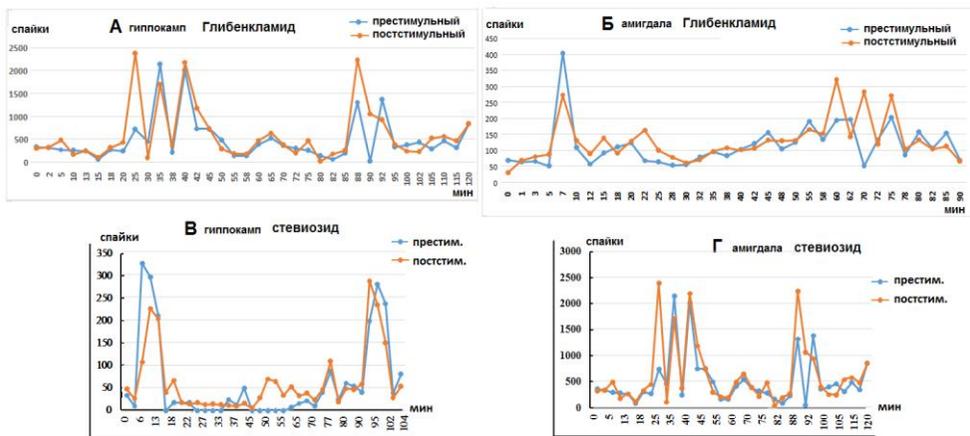


Рис 3. Кривые изменения престимульной и постстимульной спайковой активности единичных нейронов гиппокампа (А, В) и амигдалы (Б, Г) в динамике от 0 (исходный уровень) до 90-120 мин после в/м введения Глибенкламида (4 мг/кг) и Стевиозида (2 мг/кг). Абсцисса – время воздействия Глибенкламида и Стевиозида (минуты), ордината – количество пре- и постстимульных спайков (спайки)

In vitro изучениями показано, что Глибенкламид является субстратом для семейства транспортеров и АТФ-связывающих сайтов, которые могут оказывать влияние на распространение и фармакокинетику Глибенкламида *in vivo* (лимитированный захвата в головном мозге) [Tournier, et al., 2013]. Глибенкламид-зависимые изменения синаптической трансмиссии являются дифференцированными изменениями в ответ на применение агонистов возбуждательных ингибиторных аминокислот, и предполагают комплексную модуляцию функций транскриптерных рецепторов [Ostroumov, 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 гр. Фруктоза+Глибенкламид (ТД-ПТД 55,2% и ТД-ПТП 22,1 %, всего 77,3%) уровня таковых в группах Контроль и Фруктоза, 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. Глибенкламид способен достичь мозга в концентрациях, достаточных для воздействия на активность K_{ATP} канала [Mlynarski, et al., 2007]. Зарегистрированные нами перистимульная спайковая активность нейронов гиппокампа и амигдалы в динамике воздействия однократной в/м инъекции Глибенкламида, по-видимому свидетельствует о наличии, косвенных эффектов, судя по вариабельности фармакокинетики: зарегистрированы индивидуальные временные проявления при наличии тенденции возбудительных проявлений (рис. 3 А, Б). Основным различием между инсулиновой терапией и лечением сульфонилмочевиной 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. Изучены электрофизиологические параметры эффектов однократного внутримышечного введения Стевиозида (в/м 2 мг/кг) в нейронах гиппокампа ($n=3$) и амигдалы ($n=3$). На рисунке 3 (В) демонстрируется кривая динамики (от 0 до 104 мин) изменения количества спайков на время престоимой 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 престоимой 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). 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. 3 Г), 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 престоимой 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).

Данные о воздействии Стевиозида на системы нейротрансмиттеров отсутствуют. 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, et al., 2001], что, возможно, и обеспечивает конечный возбудительно-тормозный эффект холинэргического входа на нейрональную активность изученных нами цепей (стимуляция энторинальной коры при регистрации нейронов гиппокампа и стимуляция гиппокампа при регистрации нейронов амигдалы). Таким образом, в нейронах гиппокампа и амигдалы выявлены преимущественно возбудительные эффекты при однократной инъекции терапевтической дозы Стевиозида

Воздействие стевии на активность НАДФ-оксидазы гиппокампа, амигдалы и ненейрональных тканей в условиях метаболических нарушений, вызванных фруктозой

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 НАДФ-зависимую O_2^- -продуцирующую активность комбинированной фракции изоформ Nox, выделенных из гиппокампа, амигдалы и ненейрональных тканей. Искользованные листья *Stevia rebaudiana* обладают существенной СОД-миметической активностью (20 ед/мг), определенной методом обесцвечивания кумасибриллянтного синего супероксидными радикалами, генерированными при расщеплении перекиси водорода [Simonyan, 1982]. Путем подавления рилизинга Nox из биомембран Стевия оказывает мембраностабилизирующий эффект. При этом Стевия защищает мембраны клеточных компонентов от повреждающего действия гидроксильных радикалов, которые являются активными стимуляторами липидной перекисидации клеточных мембран.

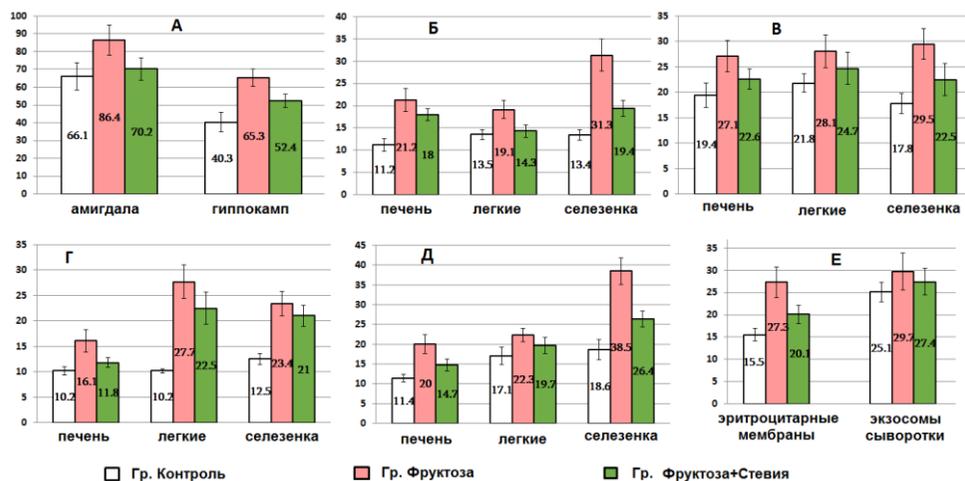


Рис. 4. Расчетная удельная НАДФ-зависимая O_2^- -продуцирующая активность суммарной фракции изоформ Nox (ед/г ткани) в гиппокампе и амигдале (А), из клеточных компонентов печени, легких, селезенки (Б - из клеточных ядер; В - из митохондрий; Г - из клеточных мембран; Д - из цитозоля), а также из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки (Е) в гр. Контроль, гр. Фруктоза и гр. Фруктоза+Стевия.; ($M \pm m$; $n=6$; $p<0,05$)

По сравнению с показателями Гр.К, в Гр.Ф наблюдается снижение оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}) суммарной фракции изоформ Nox из клеточных компонентов амигдалы и гиппокампа. 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. 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. 4). 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. 4). Таким образом, можно утверждать, что Стевия играет

антистрессорную, мембраностабилизирующую роль, снижая степень релизинга изоформ Nox из клеток амигдалы, гиппокампа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы воздействия метаболизма глюкозы на гиппокампальную физиологию сопряжены с модуляторами и затрагивают синаптическую пластичность (синаптическую потенциацию и депрессию), структуральную пластичность (динамику дендритных отростков) и зрелый нейрогенез, предоставляющих функциональный и структуральный субстрат для интеграции нейронов в сетях и ведущих к модификации фундаментальных когнитивных действий [Mainardi, et al, 2015]. Аномальные глутаматные рецепторы [Trudeau, et al., 2004], снижение амплитуды и длительные задержки компонентов вызванных потенциалов [Suzuki, et al., 2000], предпочтительное афферентирование постсинаптических AMPA рецепторов [Biessels, et al., 2002] – характерные показатели ЦНС диабетических животных. С такими же 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, et al., 1995], либо их конформации [Song, 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. В головном мозге большинство энергии от метаболизма глюкозы расходуется на генерацию потенциала действия, а также на биосинтез нейротрансмиттеров [Dienel, 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, Pani, 2013]. И 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., et al, 2013], что согласуется с нашими данными о наименьшей уязвимости нейронов с депрессорными ответами, а также адаптивной роли доминирующего торможения под воздействием Стевии. 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, 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 стевियोзида, дает основание допустить возможность модулирования аллостерических сайтов энзимов G-протеин связанных рецепторов. 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, Bischofs, 2016]. На системном уровне аллостерическая модуляция Стевией предусматривает нейропротекцию путем долговременных изменений аллостерических лигандов, что в свою очередь ведет к увеличению нейротрофических факторов.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Чавушян В.А., Исоян А.С., Симонян К.В., Небогова К.А., Аветисян Р.А. Исследование активности нейронов гиппокампа на модели диабета второго типа. Медицинская наука Армении. 2014, т. LIV, № 4, с. 36-44
2. Исоян А.С., Чавушян В.А., Симонян К.В., Нагапетян Х.О., Оганесян Л.Э., Бабаханян М.А. Натуральный подсластитель *Stevia rebaudiana* Bertoni – потенциальный модулятор активности нейронов гиппокампа. В сборнике "Фундаментальные проблемы нейронаук: функциональная асимметрия, нейропластичность и нейродегенерация", Российская Академия Наук, ФГБУ «Научный центр неврологии» РАН ФАНО, Научный Совет РФ по неврологии, Москва 18-19 декабря 2014, с. 576- 581
3. Симонян Р.М., Чавушян В.А., Исоян А.С., Симонян Г.М., Симонян К.В., Аветисян Л.Г., Нагапетян Х.О., Бабаханян М.А., Симонян М.А. Мембраностабилизирующие эффекты *Stevia rebaudiana* при фруктоза-индуцированном диабете второго типа у крыс. Медицинская Наука Армении. 2015, Т. LV, № 3, с. 51-60
4. Simonyan K.V., Isoyan A.S., Chavushyan V.A. An electrophysiological study of effect of stevia on neural activity in the hippocampus in rat model of type II diabetes. Proceedings of International Youth Conference "Science and Innovation" 2015 September 25-27, Tsaghkadzor, Armenia. P. 188-195
5. Simonyan K.V., Isoyan A.S., Chavushyan V.A. Study of the activity of hippocampal neurons in rat model of type 2 diabetes. Neuronus 2015, IBRO & IRUN Neuroscience Forum, Poland, S.37, p. 119
6. Чавушян В.А., Исоян А.С., Небогова К.А., Симонян К.В. Электрофизиологическое изучение эффектов глибенкламида на нейрональную активность амигдалы на модели диабета второго типа у крыс. Медицинская Наука Армении. 2016, т. LVI, № 4 с. 41-51
7. Исоян А.С. Электрофизиологическое исследование воздействия глибенкламида на активность нейронов гиппокампа крыс на модели диабета второго типа. Медицинская Наука Армении. 2016, т. LVI, № 1, с. 66-73
8. Исоян А.С. *Stevia rebaudiana* - потенциальный модулятор нейрональной активности на модели инсулиновой резистентности. Вопросы теоретической и клинической медицины. 2016, № 6, с. 35-39

**STEVIA REBAUDIANA-Ի ԵՎ GLIBENCLAMIDE-Ի ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ
ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԸ ՖՐՈՒԿՏՈՂԱՅՈՎ ՀԱՐՈՒՑՎԱԾ ՄԵՏԱԲՈԼԻԿ
ԽԱԽՏՈՒՄՆԵՐԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Դիետիկ ֆրուկտոզայի ինտենսիվ օգտագործումը ասոցացվում է մետաբոլիկ համախտանիշի և երկրորդ տիպի շաքարային դիաբետի առաջացման ռիսկի հետ: Տվյալ հետազոտությամբ բացահայտված են դիետիկ ֆրուկտոզայի նյութափոխանակության ազդեցության բնորոշ առանձնահատկությունները հիպոկամպի և բազոլատերալ նշահամալիրի նյարդաբջիջների սինապտիկ պլաստիկության և ուղեղի նշված գոյացություններում ՆԱԴՖ-օքսիդազ (NADPH-oxidase) օքսիդանտային համակարգի կարգավիճակի վերաբերյալ տվյալներ: Ցույց են տրված հայկական *Stevia rebaudiana*-ից բազմաթիրախ և բազմաֆունկցիոնալ ադապտոգեն հակաօքսիդիչ, հակադիաբետիկ, նոոտրոպ ակտիվությամբ օժտված բուսական դեղանյութերի մշակման հեռանկարները: Ֆրուկտոզայով հարստացված սնունդ ընդունող առնետների հիպոկամպի CA1 դաշտի բարձրահաճախ խթանմամբ (ԲՀԽ) հրահրված սպայկային ակտիվության, *in vivo* արտաբջջային հետազոտություններում բացահայտվել է ԲՀԽ ժամանակահատվածում դրդիչ պատասխանների տոկոսային հարաբերակցության ավելացում և դեպրեսիայի նվազում: Այն համակցված է հիպոկամպի նյարդաբջիջներում ԲՀԽ ժամանակահատվածում պատասխանների ինտենսիվության բարձրացմամբ և նախա- և հետխթանիչ ժամանակահատվածում սպայկային ակտիվության մակարդակի իջեցմամբ: Դիետիկ ֆրուկտոզայի ինտենսիվ օգտագործման պայմաններում երկրորդ տիպի դիաբետի բուժման համար հայտնի դեղամիջոց համարվող գլիբենկլամիդոլ (Glibenclamide) մոդուլավորվում է էնտորինալ կեղև-հիպոկամպ-նշահամալիր ցանցի պլաստիկությունը տոկոսային հաշվեկշռի տեղաշարժմամբ՝ ի օգուտ ԲՀԽ ժամանակահատվածում դեպրեսիվ պատասխանների և դրանց արտահայտվածության ինտենսիվության բարձրացման: Դիետիկ ֆրուկտոզայի և մեդրախոտի համակցված

օգտագործման պայմաններում հիպոկլամպի բջիջների գերակշիռ մասում գրանցվել են ԲՀԽ ժամանակահատվածում դեպրեսիվ պատասխաններ, որոնց արտահայտվածության ուժգնությունը մոտ է բնականոն վիճակին: Նշահամալիրի բջիջներում դեպրեսոր պատասխանները գերակշռում են ինչպես ԲՀԽ, այնպես էլ հետխթանիչ ժամանակահատվածում: Ստևոգիդի՝ մեղրախոտի հիմնական դեղաբանական ակտիվ բաղադրիչի թերապևտիկ չափաբաժնի միանվագ ներարկումից հետո *in vivo* արտաբջջային գրանցումով հիպոկլամպի և նշահամալիրի նյարդաբջիջներում բացահայտվել է դրդիչ պատասխանների ակտիվացում, ինչը թույլ է տալիս ենթադրել, որ մեղրախոտը գլխուղեղի նյարդային ցանցերը ադապտացնում է դրդիչ նյարդամիջնորդանյութերի համակարգի ակտիվացման միջոցով՝ հաստատելով և ամրապնդելով դեպրեսիվ դրսևորումները: Ստևոգիդի և Գլիբենկլամիդի ազդեցության ուղղվածության էլեկտրաֆիզիոլոգիական ցուցանիշները համանման են: Ֆրոկտոզայի ինտենսիվ օգտագործման պայմաններում հիպոկլամպի և նշահամալիրի, ինչպես նաև ոչ նյարդային հյուսվածքներում NADPH- կախյալ O_2^- արտադրող ակտիվությունը բարձրանում է: Մեղրախոտի տերևների հակաօքսիդանտային ակտիվությունը իրականացվում է NADPH-օքսիդազի ընտրողական կայունացման ճանապարհով: Սովորեցման և հիշողության համար պատասխանատու կառույցներում մոդուլացված նյարդային սինապտիկ ակտիվության և NADPH-օքսիդազային ակտիվության կապի վերաբերյալ հիմնարար տվյալները հանդիսանում են նոր տեսական բազա հայկական մեղրախոտի միջոցով ֆրոկտոզայի ինտենսիվ օգտագործման վնասաբեր ազդեցությունների կանխարգելման արդյունավետ կազմակերպման համար: Այս հետազոտությամբ հաստատվում է հայկական մեղրախոտի՝ որպես դիետիկ սննդային բաղադրիչի ներդրման նպատակահարմարությունը բնակչության կյանքի որակի բարելավման հարցերում:

ARMINE ISOYAN

**INDICES OF EFFECTIVENESS OF *STEVIA REBAUDIANA* AND *GLIBENCLAMIDE* IN
FRUCTOSE-INDUCED METABOLIC DISORDERS**

S U M M A R Y

Excess dietary fructose intake associated with metabolic syndrome and insulin resistance and increased risk of developing type 2 diabetes. In this study, the characteristic features of the metabolic effects of dietary fructose on synaptic plasticity in hippocampal neurons and basolateral amygdala and the state of the NADPH-oxidase oxidative system of these brain formations are revealed, as well as the prospects for development of multitarget and polyfunctional phytopreparations (with adaptogenic, antioxidant, antidiabetic, nootropic activity) from native raw material of *Stevia rebaudiana*. In vivo extracellular studies of evoked spike activity of hippocampal neurons during high-frequency stimulation (HFS) of the entorhinal cortex, as well as basolateral amygdala neurons during HFS of hippocampus in rats fed on fructose-rich (20% body weight / volume) diet (for 6 weeks) in hippocampal neurons revealed an increase in the percentage of excitation and a decrease in depression during HFS, along with an increased intensity of responses during HFS and a lower level of peristimulus spiking. In the neurons of amygdala, the dominance of depression during HFS and an equal balance of excitation / depression for post-stimulant time are recorded along with a reduced intensity of excitation and depression during HFS. In conditions of prolonged consumption of dietetic fructose, Glibenclamide (a sulfonylurease drug used to treat type 2 diabetes) modulates the plasticity of the entorhinal cortex-hippocampus-amygdala network by shifting the percentage balance in favor of depressor types of responses during HFS and an increase in their intensity. Under combined fructose and stevia intake conditions, in most neurons of the hippocampus depressor responses were recorded during HFS and excitation for the post-stimulus time and the severity of which was close to norm. In amygdala neurons depressor responses dominated during HFS and poststimulation time. After a single injection of a therapeutic dose of stevioside (the main pharmacologically active component of *Stevia* leaves) in vivo extracellular recording of neuronal activity in the hippocampus and amygdala revealed activation of excitatory responses, suggesting that *Stevia* adapts neural networks of the brain by imposing and / or strengthening depression mediated by activation of the excitatory neurotransmission system. Electrophysiological indices of directionality of the effects of stevioside and Glibenclamide in the CNS are identical. Under intense fructose intake

conditions, an increase in NADPH-dependent O_2^- -producing activity occurs in hippocampal and amygdala tissues (as well as in non-neuronal tissues). Antioxidant capacity of Stevia leaves is realized via selective stabilization of NADPH-oxidase. Fundamental data of relationship between modulation of neuronal synaptic activity and NADPH-oxidase activity in the brain structures involved in learning and memory – a new theoretical basis for effectiveness of the Armenian Stevia to prevent the adverse effects of *excessive* fructose consumption, which dictates the feasibility of introducing the Armenian Stevia as a dietary food product with a view to improving the quality of life of the population.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Alina', written in a cursive style.

