

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

Исследование активности нейронов гиппокампа на модели диабета второго типа

**В.А. Чавушян, А.С. Исоян, К.В. Симонян,
К.А. Небогова, Р.А. Аветисян**

*Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА,
лаборатория нейроэндокринных взаимоотношений
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: фруктоза, гиппокамп, синаптическая пластичность

Возросшее потребление фруктозы в последнее десятилетие объяснялось ее потенциальной возможностью диетического заменителя сахара. Фруктоза – высоколипогенный сахар, который оказывает значительные метаболические воздействия на печень и ряд неблагоприятных последствий на здоровье людей и экспериментальных животных, включая ожирение, гипертриглицеридемию, гиперинсулинемию, нарушение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность, ускоренное старение [5, 17, 22]. Интенсивное потребление фруктозы вызывает метаболический синдром и инсулиновую резистентность [12], а также ассоциировано с повышением риска диабета типа 2 через различные биологические механизмы [16].

В то же время многочисленными изучениями последних трех десятилетий доказано, что инсулин вовлечен в разнообразные физиологические функции мозга, такие как поиск пищи, репродукция, обучение и память, нейромодуляция и нейропротекция. Дисфункция инсулина, в частности диабет, может содействовать или в некоторых случаях сыграть основную роль в развитии и прогрессировании нейродегенеративных и нейропсихических нарушений [8]. Доказана широкая распространенность инсулиновых рецепторов в центральной нервной системе и особенно высокая их плотность в коре, гиппокампе [20]. Инсулин также имеет нейромодуляторную функцию и аффлектирует электрофизиологические свойства нейронов [11], рецепторы нейротрансмиттеров [26] и проводимость ионных каналов [6].

Целью данного изучения явилось электрофизиологическое исследование вызванной активности нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции (ВЧС) энторинальной коры крыс на экспериментальной модели диабета типа 2, индуцированного потреблением 20% фруктозы.

Материал и методы

Модели диабета интактных грызунов классифицируются на: 1) генетические, или спонтанно индуцируемые и 2) негенетические, или экспериментально индуцируемые, среди которых более популярны стрептозотоциновая модель (вызывает диабет типа 1), модели вскармливания и выпивания фруктозы (вызывает диабет типа 2). Вскормленные фруктозой крысы используются как животные модели инсулинорезистентности [9], поскольку они рассматриваются как аналог наблюдаемого у людей мультиметаболического синдрома.

Эксперименты выполнены на 15 крысах-самцах альбиносах массой 230 ± 20 г, из коих 5 животных служили контролем (К) (употребляли обычную питьевую воду) и 10 экспериментальных животных – группа Ф (употребляли только 20% фруктозную питьевую воду в течение 6 недель ежедневно).

В группе Ф под нембуталовым наркозом (35 мг/кг, в/б) у 10 крыс определяли индивидуальный уровень глюкозы – исходный, спустя 3 недели и 6 недель после выпивания фруктозы – в плазме/сыворотке портативным глюкометром (Bayer HealthCare LLC – Contour; объем образца 0,6 мкл, время измерения 5 сек, шкала измерения 10-600 мг/дл). Данные представлены в виде $M \pm SEM$. Статистическая обработка информации проведена на основе программы SigmaPlot 11.

По истечении 6 недель под уретановым наркозом (1.2 мг/кг, в/б) животных фиксировали в стереотаксическом аппарате и ориентированные, согласно стереотаксическому атласу мозга крыс (Paxinos, Watson, 2005), стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 1 μ М, заполненные 2М раствором NaCl, многократно погружали в гиппокамп (поле CA1) для экстраклеточной регистрации фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов на ВЧС (100 Гц, в течение 1 сек) ипсилатеральной энторинальной коры. В группе К у 5 крыс зарегистрировано 294 нейрона гиппокампа, а в группе Ф у 10 крыс – 190 нейронов. Импульсный поток нейронов гиппокампа, после селекции посредством амплитудного дискриминатора, подвергался онлайн программному анализу, с последующим выводом распределенного в реальном времени пре- и постстимульного спайкинга активности единичного нейрона. Целью анализа являлось определение статистической достоверности различий в длительности межспайковых интервалов до и после действия стимуляции. Для решения этой задачи на гистограммах межспайковых интервалов определяли основные параметры распределения импульсного потока: средние значения частоты, моды, дисперсии. 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 Вилкок-

сона, 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). Для избираемых сравниваемых групп программно выводились усредненные перистимульные куммулятивные и разностные гистограммы для всего массива зарегистрированных нейронов (разработчик В.С. Каменецкий).

Эксперименты и уход за животными проведены в соответствии с «Правилами и нормами гуманного обращения с экспериментальными животными».

Результаты и обсуждение

Оценка ограничений, преимуществ, недостатков моделей диабета типа 2 [9] предполагает критическое отношение к выбору моделей в зависимости от специфичности изучаемых вопросов. У мышей, употребляющих 20% фруктозную воду в течение 4 недель, обнаружены гипергликемия, гиперинсулинемия с нарушенной чувствительностью к инсулину [28]. В нашем эксперименте у 10 крыс предварительный уровень глюкозы в плазме составлял $85,8 \pm 4,305$ мг/дл, а спустя 3 и 6 недель после выпивания 20% фруктозы – $108,5 \pm 6,201$, $P=0,007$ и $155,6 \pm 5,958$ мг/дл, $P<0,0001$ соответственно (рис., А). Наши данные о повышении уровня глюкозы после потребления фруктозы согласуются с данными Ahangarou [1] и Jalal [10] и Vagos [2], показавшими, что выпивание 20% фруктозы вызывает повышение концентрации глюкозы в плазме до 145-150 мг/дл. Это указывает на то, что животные в нашем эксперименте соответствовали модели диабета типа 2.

В то же время доказана связь инсулиновой резистентности и диабета типа 2 с дефицитом гиппокампальной декларативной памяти [14], а также со снижением формирования долговременной депрессии в нейронах гиппокампа [15, 18]. Гиппокамп имеет сравнительно простую организацию – трехслойная структура, обеспечивающая трехсинаптический путь, и информационный поток через трехсинаптическую цепь входит от энторинальной коры к дендритной извилине (проецируется через перфорантный путь), а от нее мшистые волокна проецируются к пирамидным клеткам региона СА3, которые в свою очередь через коллатерали Шаффера проецируются к пирамидальным нейронам поля СА1. Другим важным входом к СА1 выступает прямой перфорантный путь, не включающий дендритную извилину и СА3 [19]. Ниже представлен анализ синаптической активности нейрональных единиц поля СА1 в группах К (n=294 нейрона) и Ф (n=190 нейронов), который по существу отражает также анализ функциональной активности нейронов поля СА3 и дендритной извилины. Существующий в контроле баланс типов зарегистрированных ответов (рис., Б) – ТД-ПТД

(тетаническая депрессия-посттетаническая депрессия) (в 132 из 294 нейронов – 42,76 %), ТД-ПТП (тетаническая депрессия-посттетаническая потенциация) (в 130 из 294 нейронов – 40,76 %), ТП-ПТП (тетаническая потенциация-посттетаническая потенциация) (в 32 из 294 нейронов – 16,56 %) –

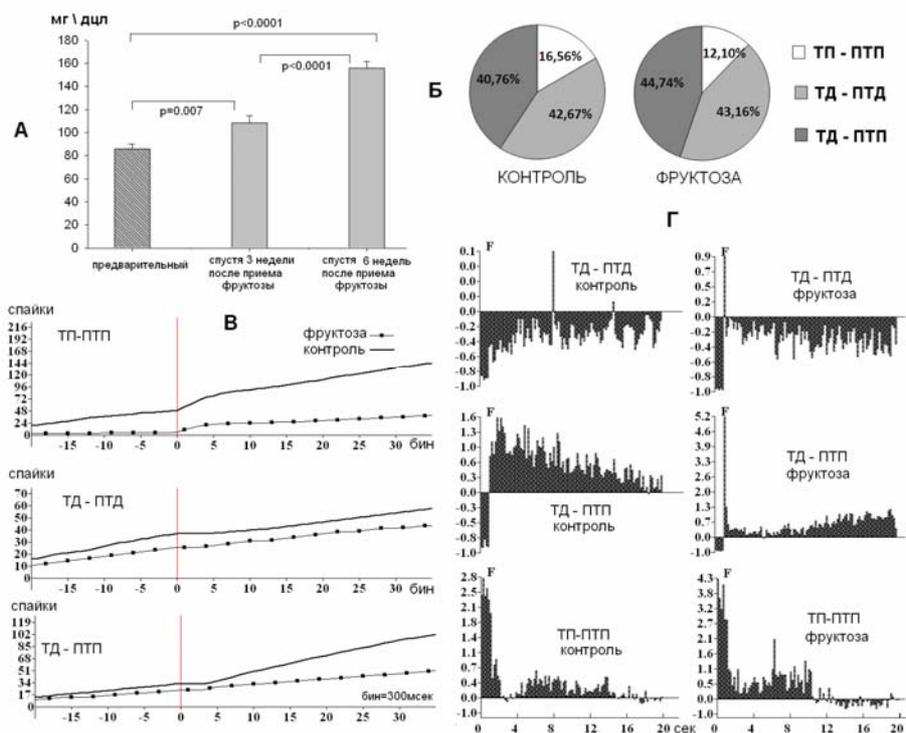


Рисунок. А – уровень глюкозы в плазме крови; Б – процентное долевое соотношение типов ответов для указанных групп; В – куммулятивные усредненные кривые для популяций нейронов гиппокампа с ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами; Г – разностные перистимульные гистограммы для популяций нейронов гиппокампа с ТД-ПТД,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

претерпевал следующее перераспределение их соотношения в группе Ф (спустя 6 недель): 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., Б).

Рисунок (Г), демонстрирующий выраженность ответов на время ВЧС и постстимульный отрезок на основе усредненных разностных гистограмм для групп К и Ф, свидетельствует о более высоком уровне тормозных ответов (ТД-ПТД) в группе К, по сравнению с таковыми в группе Ф. Возбудительные ответы (ТП-ПТП) в группе Ф 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., Г). Рисунок (В) демонстрирует сравнительные усредненные куммулятивные кривые спайковой активности популяций нейронов, проявляющих ТП-ПТП, ТД-ПТД и ТД-ПТП ответы, свидетельствуя о значительно низком по сравнению с контролем уровне престаимпульной / постстимульной активности всех зарегистрированных нейронов в группе Ф. Таким образом, согласно полученным данным, пластичность и жизнеспособность нейронов в данных патологических условиях проявляется модулированием через возбуждательные входы обработки информации в сети энторинальная кора – гиппокамп.

Долгосрочная потенция является одной из форм синаптической пластичности и одним из важных электрофизиологических параметров, содействующих процессам обучения и памяти [3]. По мнению многих исследований, дефекты длительной потенции в гиппокампе диабетических животных возникают как следствие аномальных глутаматных рецепторов [24]. С электрофизиологической точки зрения, снижение амплитуды и длительные задержки компонентов вызванных потенциалов были описаны в центральной нервной системе взрослых лиц с сахарным диабетом типа 1 и 2 [23]. Диабет влияет на синтез или секрецию нейромедиаторов во многих областях мозга [27]. Используя экспериментальный подход облегчения парного импульса, Biessels et al. обнаружили, что упрощение парных импульсов не модулировалось в стрептозотоциновой модели диабета типа 1, подтверждая, что хронический диабет у крыс не наносит ущерба пресинаптическим свойствам, но предпочитает постсинаптические механизмы (например, регуляцию AMPA-рецепторов), способствующие поддержанию долгосрочной потенции [4]. Электрофизиологические эксперименты указывают, что стрептозотоцин-индуцированный диабет у крыс связан с биофизическими аномалиями AMPA-рецепторов [25]. Длительная депрессия синаптической функции является другой формой активности зависимой синаптической пластичности, предусматриваемой для контроля обучения и памяти. Увеличивается число доказательств того, что выражение синаптической депрессии опосредовано модификациями постсинаптических токов, вызываемых AMPA подтипами глутаматных рецепторов [13]. В течение ВЧС переходная/транзиторная гиперактивность рецепторов NMDA (N-methyl-D-aspartat) ответственна за появление долгосрочного потенцирования в многочисленных путях, вовлеченных в процессы обучения и памяти. Следовательно, можно утверждать, что дефицит в синаптической пластичности на ранних стадиях диабета может отражать не повышенную чувствительность к эксайтотоксичности, а уже существующую экспрессию синап-

тической потенциации (так называемые эффекты окклюзии). В связи с этим диабет должен привести к стимуляции «молчащих» синапсов в гиппокампе. Такие изменения ответов могут быть вызваны увеличением числа рецепторов AMPA или их конформациями [21]. Показанное нами повышение выраженности возбудительных ответов на время высокочастотной стимуляции в группе Ф, возможно, обусловлено активацией «молчащих» синапсов в гиппокампе.

Оксидативный стресс играет важную роль для фенотипов метаболического синдрома, вызванного фруктозной диетой [7]. Поэтому немаловажно отметить существующее мнение о том, что дальнейшие исследования должны детерминировать различия вовлеченности NMDA-индуцированной токсичности в гиппокампе и / или окислительного стресса в дефекты синаптической пластичности диабетических мышей [24]. Возможно, для более углубленного разъяснения механизмов патологических изменений на использованной нами модели, необходимо выявление корреляционной связи маркеров окислительного стресса с проявлениями синаптической пластичности в гиппокампальных нейронах.

Поступила 14.07.14

Հիպոկամպի նեյրոնների ակտիվության հետազոտությունը երկրորդ տիպի շաքարախտի մոդելի վրա

Վ. Ա. Չավուշյան, Ա. Ս. Իսոյան, Կ. Վ. Միմոնյան, Կ. Ա. Ներսիսյան, Ռ. Ա. Ավետիսյան

Ֆրուկտոզի օգտագործման աճը վերջին տասնամյակում բացատրվում էր նրա շաքարին դիտարկվող փոխարինման պոտենցիալ հնարավորությամբ: Ֆրուկտոզի ինտենսիվ օգտագործումը առաջացնում է ինսուլինային ռեզիստենտություն և մեծացնում է 2-րդ տիպի շաքարախտի առաջացման վտանգը: Գլյուկոզի նախնական միջին մակարդակը 10 առնետների մոտ պլազմայում կազմել է $85,800 \pm 4,305$ մգ/դլ, իսկ 20% ֆրուկտոզ խմելուց 6 շաբաթ անց գլյուկոզի խտության աճը հասնում է մինչև $155,600 \pm 5,958$ մգ/դլ ($P < 0,0001$): Ինսուլինի առանցքային դերը նեյրոնալ սինապտիկ ձկունության մեջ պայմանավորված է ինսուլինային ընկալիչների բարձր խտությամբ կենտրոնական նյարդային համակարգում: Էնտորինալ կեղևի բարձր հաճախականությամբ խթանման ժամանակ հիպոկամպի նեյրոնների հրահրված ակտիվության էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտությունը 2-րդ տիպի շաքարախտի փորձարարական մոդելի վրա, որը խթանվել է 20% ֆրուկտոզի ջրային լուծույթի օգտագործմամբ, ի հայտ բերեց գրանցված նյարդային

բջիջների նախախթանիչ և հետխթանիչ սպայկային ակտիվության զգալի ցածր մակարդակի համեմատ ստուգիչ խմբի: Միևնույն ժամանակ Ֆրուկտոզի խմբում բարձր հաճախականության խթանման ընթացքում դրդիչ պատասխանների արտահայտվածությունը գերազանցել է նմանատիպ ցուցանիշները ստուգիչ խմբում, ինչը, հնարավոր է, պայմանավորված է հիպոկամպում «լռող» սինապսների ակտիվացմամբ: Գրանցված պատասխանների տեսակների գոյություն ունեցող հաշվեկշիռը ստուգիչ խմբում կրում էր ոչ զգալի վերաբաշխում Ֆրուկտոզի խմբում: Ստացված տվյալների համաձայն, էնտորինալ կեղև-հիպոկամպ ցանցում նեյրոնների ճկունությունը և կենսունակությունը տվյալ ախտաբանական պայմաններում արտահայտվում է դրդիչ մուտքերի միջոցով ազդանշանների մոդուլացմամբ:

Study of the activity of hippocampal neurons in rat model of type 2 diabetes

**V. A. Chavushyan, A. S. Isoyan, K. V. Simonyan, K. A. Nebogova,
R. A. Avetisyan**

Fructose consumption has largely increased over the past decades and is explained by its potential as a dietary sugar substitute. High fructose consumption induces insulin resistance and increases the risk of type 2 diabetes. In 10 rats preliminary mean plasma glucose level was $85,800 \pm 4,305$ mg/dl, and 6 weeks after 20% fructose drinking the increase in glucose concentration reached $155,600 \pm 5,958$ mg/dL ($P < 0,0001$). High density of insulin receptors in the central nervous system defines the key role of insulin in neuronal synaptic plasticity. Electrophysiological study of evoked activity of hippocampal neurons during high-frequency stimulation of entorhinal cortex in experimental rat model of type 2 diabetes, caused by the consumption of 20% fructose, showed significantly lower level of prestimulus and poststimulus spike activity of recorded neurons compared with the control. At the same time, the expression of excitatory responses during high frequency stimulation in fructose group exceeded those in the control, possibly due to activation of "silent" synapses in hippocampus. The existing balance of types of recorded responses in control group underwent an insignificant redistribution in fructose group.

According to the data obtained in these pathological conditions the plasticity and survival of neurons appears by modulation by excitatory inputs of information processing in entorhinal cortex – hippocampus network.

Литература

1. *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.
2. *Barros C.M., Lessa R.Q., Grechi M.P. et al.* Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. *Clinics (Sao Paulo)*, 2007;62:327–34.
3. *Baudry M., Lynch G.* Remembrance of arguments past: how well is the glutamate receptor hypothesis of LTP holding up after 20 years? *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2001, 76, p. 284 – 297.
4. *Biessels G.J., van der Heide L.P., Kamal A. et al.* Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 441, p.1 – 14.
5. *Bray G. A.* Fructose: should we worry? *Int. J. Obes. (Lond.)* 2008, 32, Suppl 7: S127–S131.
6. *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.
7. *Fariña J.P., García M.E., Alzamendi A. et al.* Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2013 Jul 1;125(2):87-97.
8. *Ghasemi R., Dargahi L., Haeri A. et al.* Brain Insulin Dysregulation: Implication for Neurological and Neuropsychiatric Disorders. *Mol. Neurobiol.*, 2013,47, 1, p.400-423.
9. *Islam M.S., Wilson R.D.* Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 933, p.161-74.
10. *Jalal R., Bagheri S.M., Moghimi A., Rasuli M.B.* Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2007;41:218–23.
11. *Kovacs P., Hajnal A.* In vivo electrophysiological effects of insulin in the rat brain. *Neuropeptides*, 2009, 43(4): 283–293.
12. *Lim J. S., Mietus-Snyder M., Valente A., Schwarz J-M., Lustig R. H.* The role of fructose in the pathogenesis of naFID and the metabolic syndrome. *Nature reviews / gastroenterology & hepatology* (May 2010), 7 (5): 251–264.
13. *Malinow R., Malenka R.C.* AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2002, 25, p. 103 – 126.
14. *Messier C.* Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol. Aging*, 2005, 26, Suppl 1: 26–30.
15. *Mielke J.G., Taghibiglou C., Liu L. et al.* A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *J. Neurochem.*, 2005, 93, p. 1568–1578,
16. *Montonen J., Järvinen R., Knekt P. et al.* Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. *J. Nutr.*, 2007;137:1447–54.
17. *Reddy S.S., Karuna R., Baskar R., Saralakumari D.* Prevention of insulin resistance by ingesting aqueous extract of *Ocimum sanctum* to fructose-fed rats. *Hormone and Metabolic Research*, 2008, 40, p. 44-49
18. *Ross A.P., Bartness T.J., Mielke J.G., Parent M.B.* A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2009, 92: 410–416.
19. *Rudy J.W.* *The neurobiology of learning and memory.* Massachusetts.: Sinauer Associates Inc., 2008
20. *Schulinkamp 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.
21. *Song I., Haganir R.L.* Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 2002, 25, p. 578 – 588.
22. *Stanhope K. L., Schwarz J. M., Keim N. 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.

23. *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.
24. *Trudeau F., Gagnon S., Massicotte G.* Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 490, p.177–186
25. *Vaithianathan, T., Bedi, D., Kanju, P.M. et al.* Evidence of AMPA-glutamate receptor dysfunction in brain of streptozotocin-diabetic rats. *Soc. Neurosci.*, 2003, 375, p.18.
26. *Wan Q., Xiong Z. G., Man H. Y. et al.* Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*, 1997, 388 (6643):686–690.
27. *Welsh B., Wecker L.* Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neurochem. Res.*, 1991, 16, p. 453 – 460.
28. *Zhao Y., 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, Jun 6., p. 50-58.