

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

Электрофизиологическое исследование воздействия глибенкламида на активность нейронов гиппокампа крыс на модели диабета второго типа

А.С. Исоян

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

Ключевые слова: фруктоза, глибенкламид, активность нейронов гиппокампа

Потребление диетической фруктозы в больших количествах приводит к ожирению, гипертриглицеридемии, гиперинсулинемии, нарушению толерантности к глюкозе, гиперурикемии, инсулинорезистентности и т.д. [5, 14, 17,18]. Нарушение чувствительности тканей к инсулину (инсулинорезистентность), или мультиметаболический синдром, наблюдается у пациентов в преддиабетическом состоянии, характеризующемся нарушением толерантности к глюкозе, который прогрессирует в сахарный диабет II типа.

В качестве животной модели инсулинорезистентности используются крысы, получающие фруктозу [8], поскольку они рассматриваются как аналог наблюдаемого у людей мультиметаболического синдрома [13].

Известно, что инсулин вовлечен в разнообразные физиологические функции мозга, такие как поиск пищи, репродукция, обучение и память, нейромодуляция и нейропротекция. В настоящее время доказано, что расстройство инсулина (дисфункция инсулина), в частности диабет, может содействовать или в некоторых случаях сыграть основную роль в развитии и прогрессировании нейродегенеративных и нейропсихиатрических нарушений [7].

У мышей, употребляющих 20% фруктозную воду в течение 4 недель, обнаруживается гипергликемия, гиперинсулинемия и дислипидемия с нарушенной чувствительностью к инсулину [20]. В то же время имеются многочисленные изучения, указывающие на связь инсулиновой резистентности и диабета II типа с дефицитом гиппокампальной декларативной памяти [6,9]. У крыс на фруктозной диете выявлена гиппокампальная инсулиновая резистентность, ассоциированная со снижением формирования долговременной депрессии в нейронах гиппокампа [10,15].

Показан протекторный эффект глибенкламида на нарушения обучаемости и памяти после тотального лишения сна у крыс [16]. В гиппокампе крыс глибенкламид реверсирует изменения уровня окислительного стресса и воспалительных медиаторов (пероксиды липидов, миелопероксидазы, TNF- α и PGE(2)), вызванных ишемией при ишемия-реперфузионном повреждении [2].

Целью данного изучения явилась оценка электрофизиологических параметров синаптической активности нейронов гиппокампа крыс после применения глибенкламида на экспериментальной модели диабета II типа, индуцированного длительным потреблением фруктозы.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 10 крысах-самцах альбиносах: 5 животных употребляли только питьевую воду на 20% фруктозе в течение 6 недель ежедневно (группа I) 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 II). Эксперименты и уход за животными проведены в соответствии с «Правилами и нормами гуманного обращения с экспериментальными животными».

Индивидуальный уровень глюкозы в плазме крови – исходный, спустя 3 и 6 недель после приема фруктозы – определяли под нембуталовым наркозом (35 мг/кг в/б) посредством портативного глюкометра (Bayer Health Care LLC – Contour).

По истечении 6 недель животных фиксировали в стереотаксическом аппарате для экстраклеточной регистрации фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции (ВЧС) ипсилатеральной энторинальной коры. Стекланный микроэлектрод с диаметром кончика 1мкм, заполненный 2М раствором NaCl, многократно погружали в гиппокамп, а биполярный цилиндрический электрод для ВЧС (100 Гц в течение 1сек) вживляли в энторинальную кору по соответствующим координатам (AP -3,2-3,5; L 1,5-3,5; DV 3,0-4,0 мм и AP -9; L 3,5; DV 4 мм). Импульсный поток нейронов, после селекции посредством амплитудного дискриминатора, подвергался программному анализу. 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. 2 А, Б) (разработчик В.С. Каменецкий). Целью анализа являлось определение статистической достоверности различий частоты спайковой активности на престимульном и постстимульном временном отрезке, включая также время ВЧС.

Результаты и обсуждение

У мышей, употреблявших питьевую воду на 20% фруктозе в течение 4 недель, обнаружены гипергликемия, гиперинсулинемия с нарушенной чувствительностью к инсулину [20]. В нашем эксперименте у 6 крыс в группе I предварительный уровень глюкозы в плазме составлял $91,30 \pm 9,11$ мг/дцл, а спустя 3 и 6 недель после выпивания 20% фруктозы – $95,67 \pm 8,64$, $p=0,4$ и $107,17 \pm 11,29$ мг/дцл, $p=0,02$ соответственно (рис.1, гр.I). Наши данные о повышении уровня глюкозы после потребления фруктозы согласуются с данными Ahangarpour et al. [3], показавшими, что выпивание 20% фруктозы вызывает повышение концентрации глюкозы в плазме. Это указывает на то, что животные в нашем эксперименте соответствовали модели диабета II типа. В нашем эксперименте у крыс группы II предварительный уровень глюкозы в плазме составлял $81,4 \pm 11,26$ мг/дцл, спустя 3 недели после выпивания 20% фруктозы – $94,60 \pm 11,55$, $p=0,1$, а спустя 6 недель после приема фруктозы (из коих 3 недели они получали глибенкламид) – $79,60 \pm 14,06$ мг/дцл, $p=0,82$, (рис.1, гр. II).

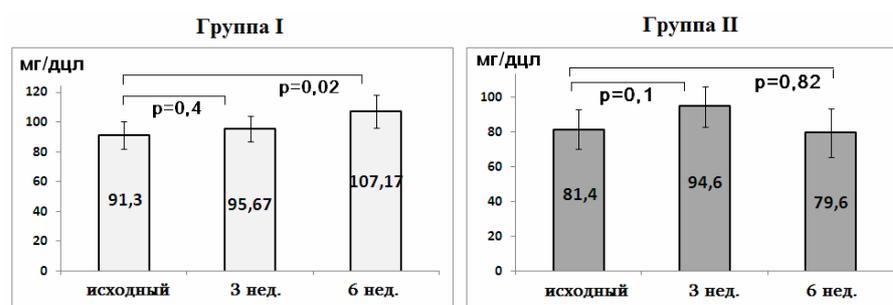


Рис. 1. Уровень глюкозы в плазме крови (исходный, спустя 3 и 6 недель после приема фруктозы без и с применением глибенкламида) в группах I и II

Среди сахароснижающих средств для лечения сахарного диабета II типа важное место занимают производные сульфонилмочевины. Основным механизмом сахароснижающего действия производных сульфонилмочевины является стимуляция секреции инсулина за счет связывания со специфическими рецепторами плазматической мембраны бета-клеток поджелудочной железы, интегрированными в структуру АТФ-зависимых K^+ -каналов [4].

Среди всех производных сульфонилмочевины наиболее выраженным эффектом обладает внедренный с 1969 года в клиническую практику глибенкламид. Высокая сахароснижающая активность глибенкламида объясняется особенностями его химической структуры, наличием не только сульфонилмочевинной, но и бензамидной группировки. Соединяясь с двумя связывающими местами рецепторов бета-клеток поджелудочной железы, глибенкламид наиболее быстро и мощно способствует закрытию АТФ-зависимых K^+ -каналов (K^+ -АТФ-каналы, локализующиеся на плазматической мембране бета-клеток поджелудочной железы), стимулирует деполяризацию мембраны, повышение внутриклеточного Ca^{2+} и, следовательно, секрецию инсулина. Повышение внутриклеточного содержания кальция посредством активации

кальций/кальмодулинзависимой протеинкиназы II стимулирует экзоцитоз секреторных гранул с инсулином, в результате чего гормон проникает в межклеточную жидкость и кровь. В отношении этого препарата накоплен самый большой опыт клинического применения: глибенкламид повышает чувствительность периферических тканей к инсулину и степень его связывания с клетками-мишенями.

[ЗН] Глибенкламид, сильный АТФ-чувствительный блокатор K^+ - каналов, является также специфическим лигандом рецепторов сульфонилмочевины в гиппокампе крыс [19]. Для детерминирования пре- или постсинаптической локализации рецепторов в гиппокампе крыс изучали влияние каината или колхицином вызванных селективных повреждений на региональное распределение связывания [ЗН]глибенкламида. Сайты связывания глибенкламида в основном были локализованы на мшистых волокнах в СА3, на зернистых клетках зубчатой фасции и пирамидальных нейронах в СА1 [19].

В группе I нами зарегистрировано 190 нейронов гиппокампа, а в группе II – 169 нейронов. Анализ импульсного потока нейронов гиппокампа 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). Выраженность ответов оценивается согласно значениям средней частоты на престимульное время (Мпрестим.), постстимульное время (Мпостстим.) и время ВЧС (Мвчс).

На рис. 2 представлен анализ синаптической активности нейрональных единиц поля СА1 в группе I (n=190 нейрона) и II (n=169 нейронов). В группе I 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. 2 А, В), что можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (87,9%) и возбуждения на постстимульное время (56,8%). В группе II 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 (рис. 2 Б, В). Распределение типов ответов можно рассматривать как доминирование торможения на время ВЧС (93,60%) и на постстимульное время (52,70%).

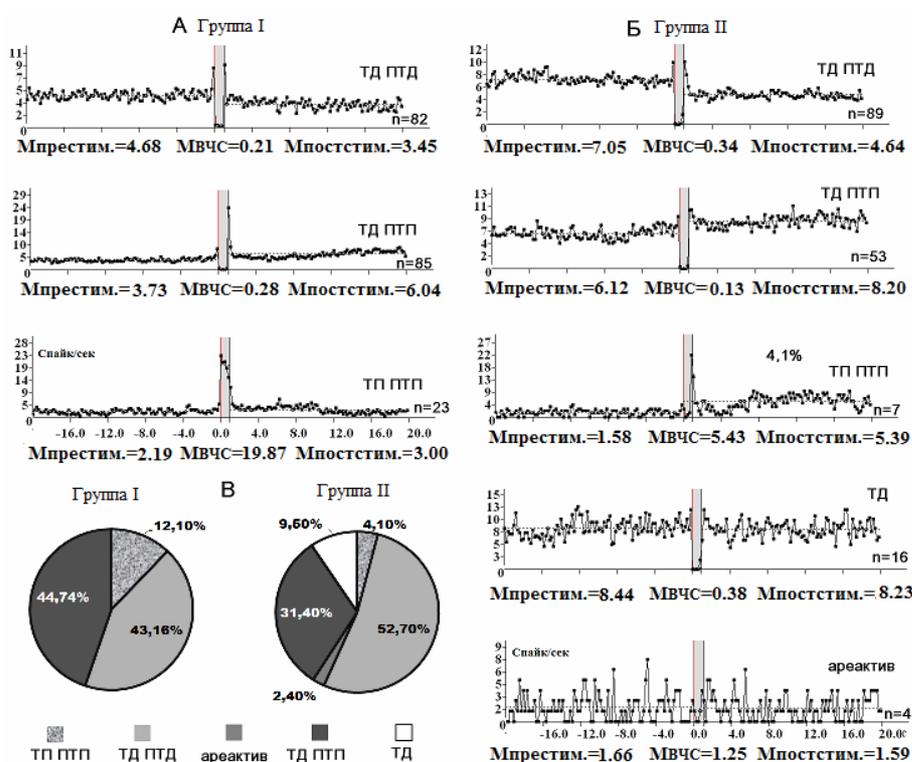


Рис.2 А, Б – перистимульные диаграммы средней частоты импульсного потока единичных нейронов гиппокампа, проявляющих указанный тип ответов (ТД ПТД, ТД ПТП и ТП ПТП) при стимуляции

энторинальной коры в группе I (А) и в группе II (Б). Под каждой диаграммой приведены цифровые значения средней частоты импульсного потока в реальном времени 20 сек до (Мпрестим.), 20 сек после (Мпостстим.) стимуляции, включая время ВЧС (Мвчс). В – процентное доленое соотношение типов ответов для указанных групп

Нами ранее показано, что спайковая престаимульная / постстимульная активность всех зарегистрированных нейронов (ТД ПТД, ТД ПТП и ТП ПТП ответы) в группе I значительно ниже по сравнению с таковыми в норме [1]. В группе II престаимульный уровень спайковой активности превышает таковые в группе I, приближая их к норме. Так, в популяции нейронов, проявляющих ТД ПТД ответы Мпрестим.=4,68 спайк/сек в группе I и Мпрестим.=7,05 спайк/сек в группе II; в популяции нейронов, проявляющих ТД ПТП ответы Мпрестим.=3,73 спайк/сек в группе I и Мпрестим.=6,12 спайк/сек в группе II (рис. 2 А, Б).

Анализ выраженности ответов на время ВЧС и постстимульный отрезок на основе перистимульных диаграмм средней частоты позволяет заключить:

- в сравниваемых группах I и II 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. 2 А, Б);
- учащение спайковой активности на время ВЧС (ТП ответы) в группе I доходит до 19,87 спайк/сек (что девятикратно превышает престаимульную частоту спайков), а в группе II – до 5,43 спайк/сек (что превышает престаимульную частоту спайков в 3,4 раза) (рис. 2 А, Б).

Учитывая, что в группе I по сравнению с нормой в популяциях нейронов, проявляющих ТП ПТП и ТД ПТП, возбуждение на время ВЧС и постстимульное время более выражено [1], можно сделать утверждение о регулирующей роли глибенкламида на возбудительные входы в сети энторинальная кора – гиппокамп.

Долгосрочные защитные эффекты глибенкламида на гиппокамп после умеренной черепномозговой травмы осуществляются через рецепторы сульфонилмочевины (SUR1), которые играют ключевую роль в различных формах повреждения ЦНС [12]. Рецепторы сульфонилмочевины также вовлечены в повышение нейрогенеза и функционального восстановления глибенкламидом после экспериментальной церебральной ишемии у крыс [11]. В настоящее время таргетированное ингибирование SUR1-регулируемых каналов сульфонилмочевины глибенкламидом предлагается в качестве эффективного варианта лечения ишемических и геморрагических форм инсульта [16].

Полученные нами электрофизиологические данные вносят определенный вклад в неизвестные аспекты воздействия препарата глибенкламид.

Поступила 10.08.15

**Հիպոկամպի նեյրոնների ակտիվության վրա գլիբենկլամիդի ազդեցության
էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտությունը երկրորդ տիպի շաքարախտով
առնետների մոդելում**

Ա.Ս. Իսոյան

Ֆրուկտոզի երկարատև և ինտենսիվ օգտագործումը առնետների մոտ հանդիսանում է 2-րդ տիպի շաքարախտի ընդունված փորձարարական մոդել: Ինսուլինային դիմադրողականությունը և 2-րդ տիպի շաքարախտը առաջացնում են հիպոկամպալ հիշողության խանգարում: Առնետների հիպոկամպում հայտնաբերված են 2-րդ տիպի շաքարախտի բուժման համար կիրառվող հակաշաքարային դեղամիջոց գլիբենկլամիդի կապող ընկալիչներ:

Տվյալ աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել՝ ֆրուկտոզով հարուցված 2-րդ տիպի շաքարախտի փորձարարական մոդելի վրա՝ գլիբենկլամիդ օգտագործելուց հետո առնետների հիպոկամպի նեյրոնների սինապտիկ ակտիվության էլեկտրաֆիզիոլոգիական պարամետրերի գնահատումը:

Հիպոկամպի նեյրոնների խթանիչ ակտիվության ծրագրային վերլուծությունը ի հայտ է բերել սեպային ակտիվության նախախթանիչ մակարդակի բարձրացում և բարձր հաճախականության խթանման ժամանակահատվածում՝ գլիբենկլամիդի ազդեցության պայմաններում արգելակման գերազանցման հետ մեկտեղ (93.60%) դրդման արտահայտվածության նվազում: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել ֆրուկտոզի ինտենսիվ օգտագործումից հետո էնտորինալ կեղև – հիպոկամպ ցանցի դրդող մուտքերի փոփոխությունների վրա գլիբենկլամիդի կարգավորող ազդեցության մասին:

**Electrophysiological study of the effect of glibenclamid on neuronal activity in the
hippocampus in rat model of type 2 diabetes**

A.S. Isoyan

Long-term and intensive consumption of fructose is an accepted experimentally induced rat model of type 2 diabetes. Insulin resistance and type 2 diabetes are thought to cause hippocampal memory impairment. The binding sites have been revealed for hypoglycemic glibenclamide (in the treatment of type 2 diabetes) in the rat hippocampus.

The aim of this study was to evaluate the electrophysiological parameters of synaptic activity of hippocampal neurons of rats after use of glibenclamide in experimental model of type 2 diabetes induced by prolonged fructose consumption. Under the influence of glibenclamide the software analysis of impulse activity of hippocampal neurons at high frequency stimulation of the entorhinal cortex revealed: increase in prestimulus level of spike activity, as well as reduced severity of excitation

during high frequency stimulation, along with the dominance of inhibition during high frequency stimulation (93,60%). These findings suggest that glibenclamide may have a role in the regulation of changes in excitatory inputs in the entorhinal cortex – hippocampus network after intensive fructose consumption.

Литература

1. *Чавушян В.А., Исоян А.С., Симомян К.В., Небогова К.А., Аветисян Р.А.* Исследование активности нейронов гиппокампа на модели диабета второго типа. Мед. наука Армении НАН РА, 2014, т.LIV, 4, с.36-44.
2. *Abdallah D. M., Nassar N. N., Abdelsalam R. M.* Glibenclamide ameliorates ischemia–reperfusion injury via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Brain research*, 02/2011; 1385:257-62.
3. *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.
4. *Ashcroft F.M., Gribble F.M.* Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *Diabetes Complications*, 2000; Jul–Aug;14(4):192-6.
5. *Bray G. A.* Fructose: should we worry? *Int. J. Obes. (Lond)* 32, Suppl. 7: 2008;S127–S131.
6. *Convit A.* Links between cognitive impairment in insulin resistance: an explanatory model. *Neurobiol. Aging*, 2005;26, Suppl. 1: 31–35.
7. *Ghasemi R., Dargahi L., Haeri A., Moosavi M., Mohamed Z., Ahmadiani A.* Brain Insulin Dysregulation: Implication for Neurological and Neuropsychiatric Disorders. *Mol. Neurobiol.*, 2013;V47, 1, p.400-423.
8. *Islam M.S., Wilson R.D.* Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol. Biol.*, 2012;933:161-74.
9. *Messier C.* Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol. Aging*, 2005;26, Suppl 1: 26–30.
10. *Mielke J.G., Taghibiglou C., Liu L., Zhang Y., Jia Z., Adeli K., Wang Y.T.* A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *J. Neurochem.*, 2005; 93: 1568–1578.
11. *Ortega F.J., Jolkkonen J., Mahy N., Rodríguez M.J.* Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2013; Mar; 33(3): 356–364.
12. *Patel A. D., Gerzanich V., Geng Z., Simard J.M.* Glibenclamide reduces hippocampal injury and preserves rapid spatial learning in a model of traumatic brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2010; Dec; 69(12):1177-90.
13. *Reaven G. M., Banting L.* Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988;37, 1595-1607.
14. *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, 44-49.
15. *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; Oct;92(3):410-6. doi: 10.1016/j.nlm., 2009.05.007.
16. *Shehata A. M., Rizk H. A.* Total sleep deprivation compromises blood–brain barrier integrity and impairs learning and memory: a protective effect of glibenclamide and recovery sleep. *Journal of Global Biosciences*, ISSN 2320-1355 2015;Vol. 4, 4, p. 1971-1981.
17. *Stanhope K. L., Schwarz J.M., Keim N. L., Griffen S. C., Bremer A. A., et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.*, 2009;119:1322–1334.
18. *Thorburn A. W., Storlein L.H., Jemkins A.B., Khouri S. , Kraegen E.W.* Fructose induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1989; 49, 1155- 1163.

-
19. *Tremblay E., Zini S., Ben-Ari Y.* Autoradiographic study of the cellular localization of [3H]glibenclamide binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, June 1991; Vol. 127, 1, 10, p. 21-24.
 20. *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.