

ИНГИБИРОВАНИЕ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА ИНСУЛИНОМ КАК ОСНОВА ЕГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ *IN VITRO*

© 2023 г. И. О. Захарова¹, Л. В. Баюнова¹, Д. К. Аврова¹, Н. Ф. Аврова^{1,*}

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

*e-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 23.06.2023 г.

После доработки 03.08.2023 г.

Принята к публикации 04.08.2023 г.

Инсулин является одним из наиболее перспективных нейропротекторов. Существенным пробелом в понимании механизма его действия является отсутствие данных о том, способен ли он предотвращать аутофагическую гибель нейронов. Целью нашей работы были оценка вклада аутофагии и апоптоза в гибель нейронов коры мозга крыс в культуре при окислительном стрессе и изучение способности инсулина предотвращать эту гибель и ингибировать процессы аутофагии и апоптоза в нервных клетках. Изучено влияние перекиси водорода и инсулина на уровень двух основных маркеров аутофагии (LC3BII и SQSTM1/p62) и маркера апоптоза (расщепленная каспаза-3). Для оценки жизнеспособности нейронов использовали МТТ-тест, для измерения уровня маркерных белков применяли иммуноблоттинг. Найдено, что окислительный стресс вызывает активацию аутофагии и апоптоза в нейронах. Это проявляется в достоверном увеличении маркеров аутофагии LC3B-II и апоптоза (расщепленной каспазы-3) и в снижении уровня белка SQSTM1/p62. Содержание SQSTM1/p62, участвующего в образовании аутофагосом, снижается при активации аутофагии, т.к. белок подвергается деструкции в лизосомах. Перекись водорода вызывает аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов, о чем свидетельствует значительное увеличение жизнеспособности нейронов в условиях окислительного стресса при действии ингибиторов аутофагии (3-метиладенина) и апоптоза (z-DEVD-FMK). В свою очередь инсулин, предотвращая гибель нейронов при окислительном стрессе, препятствует развитию аутофагии, вызывая снижение уровня липидированной формы LC3B-II и увеличение уровня SQSTM1/p62, и апоптоза, уменьшая уровень расщепленной каспазы-3. Защитное действие инсулина опосредуется активацией специфических сигнальных путей, связанных с рецепторами инсулина и IGF-1. Так, ингибитор рецепторов инсулина и IGF-1 BMS-754807 полностью блокирует нейропротекторный эффект инсулина. Таким образом, ярко выраженная активация аутофагии при окислительном стрессе является одной из причин гибели нейронов, а защита нейронов инсулином связана с подавлением не только апоптотической, но и аутофагической гибели этих клеток.

Ключевые слова: нейроны коры мозга, окислительный стресс, инсулин, аутофагия, апоптоз

DOI: 10.31857/S0044452923050091, **EDN:** KQJTRP

ВВЕДЕНИЕ

Инсулин, относящийся к числу основных ростовых и трофических факторов, в настоящее время рассматривается как один из наиболее перспективных нейропротекторов. Так, было показано, что при его интраназальном введении он оказывает защитный эффект на нейроны мозга и улучшает когнитивные функции при таких нейродегенеративных болезнях, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Позитивный эффект интраназального введения инсулина (ИВИ) в большой мере обусловлен тем, что при таком способе доставки он попадает непосредственно в мозг, минуя гематоэн-

цефалический барьер [1, 2]. При этом хорошо выраженный защитный эффект такого введения инсулина выявлен не только в опытах на животных [3, 4], но и при клинических испытаниях ИВИ людям (см., например, [5–7]).

Защитный эффект инсулина при его интрацеребровентрикулярном [8] и системном введении (см., например, [9, 10]) показан и при ишемическом поражении мозга млекопитающих. Но работы по изучению способности интраназально введенного инсулина предотвращать гибель нейронов мозга при его ишемическом поражении и последующей реперфузии практически отсутствуют. Ис-

ключением являются лишь несколько работ нашей лаборатории, посвященных изучению способности инсулина нормализовать метаболические нарушения у молодых и старых крыс при глобальной ишемии переднего мозга [11, 12].

Влияние инсулина, введенного животным или людям, на аутофагическую гибель нейронов мозга при нейродегенеративных и ишемических воздействиях на мозг остается пока почти не изученным. Серьезным пробелом в изучении механизма нейротропного эффекта инсулина является также отсутствие данных о его влиянии на процессы аутофагии и аутофагической гибели нервных клеток, вызванной токсическими воздействиями, в опытах *in vitro*. И это, несмотря на большой интерес в современных научных исследованиях к той роли, которую играет аутофагия в гибели нейронов при патологических процессах различной этиологии. Долгое время полагали, что активация аутофагии носит преимущественно защитный характер. При этом считалось, что для понимания протекторного действия тех или иных соединений на нервные клетки важно расшифровать преимущественно механизмы их антиапоптотического и антинекротического действия. Но затем во многих работах было показано, что чрезмерная активация аутофагии может приводить к гибели нейронов, а вещества, ингибирующие процессы аутофагии, обладают свойствами нейротропных [13–17]. Стало ясно, что невозможно достичь понимания нарушений в мозге при различных видах патологических процессов и оценить механизм защитного действия нейротропных без изучения в том числе и аутофагической гибели нейронов. По-видимому, сигнальные молекулы и внутриклеточные каскады, ответственные за регуляцию аутофагии, могут стать одной из важнейших терапевтических мишеней при лечении различных поражений ЦНС [18–20]. Недавно нами было впервые показано [21], что интраназальное введение инсулина крысам практически предотвращает аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов в СА1 районе гиппокампа при глобальной ишемии переднего мозга и уменьшает ее в коре мозга. Актуальным является дальнейшее изучение способности инсулина подавлять процессы аутофагии и аутофагической гибели нейронов при неблагоприятных воздействиях в опытах *in vivo* и *in vitro*, а также расшифровка механизмов его ингибирующего влияния. Так, в литературе пока отсутствуют данные о том, что инсулин способен нормализовать изменения в нервных клетках основных маркеров аутофагии, таких как LC3B-II, SQSTM1/p62 или Beclin-1, свидетельствующие о ее активации, вызванной какими-либо патологическими воздействиями на нейроны.

Целью настоящей работы было определение влияния инсулина, перекиси водорода и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-MA и z-DEVD-FMK

соответственно) на жизнеспособность нейронов коры мозга крыс *in vitro*, а также на содержание в них маркеров аутофагии и апоптоза. Для понимания возможного механизма этих эффектов инсулина интерес представляют данные о модуляции инсулином ряда протеинкиназ, полученные нами на культуре нейронов коры мозга крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид (МТТ), перекись водорода, инсулин и додецилсульфат натрия были приобретены у фирмы Sigma (США). Диметилформамид закуплен у фирмы Вектон (Россия). Среда для культивирования нейронов “Нейробазальная”, аланил-глутамин и бессывороточная ростовая добавка “НейроМакс” изготовлены компанией ООО НПП “ПанЭко” (Россия), тогда как ростовой комплимент В-27 без инсулина был куплен у фирмы Invitrogen (США). Ингибиторы аутофагии 3-метиладенин (3-MA) и тирозинкиназного домена рецепторов IGF-1 и инсулина BMS-754807 были получены от фирмы Sigma (США), ингибитор каспазы-3 и апоптотической гибели клеток z-DEVD-FMK — от BLDpharm (Китай). Экспрессию маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62, активность ряда протеинкиназ и содержание про- и антиапоптотических белков Bax и Bcl-2, соответственно, изучали с помощью специфических антител, характеристика которых представлена в разделе методов исследования, описывающих иммуноблоттинг.

Выделение и культивирование нейрональных клеток из коры мозга эмбрионов крыс. Нейрональные клетки выделяли из развивающегося мозга эмбрионов крыс линии Вистар на 17–18-й день развития с помощью модифицированного метода Дихтера [22], как это описано ранее [23]. Выделенные клетки высевали в 48-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, по 2.9×10^5 клеток/лунку для определения жизнеспособности МТТ-методом и в 12-луночные планшеты в концентрации 1.1×10^6 клеток/лунку для анализа экспрессии белков методом иммуноблоттинга. Для этого использовали Нейробазальную среду (ПанЭко, Россия), содержащую 2% ростовой добавки НейроМакс, 1% аланил-глутамин, пенициллин G (100 U/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл) (полная ростовая среда). Клетки снабжали свежей средой каждые 3 дня, для этого отбирали половину объема из каждой лунки и добавляли аналогичный объем свежей среды. Опыты начинали проводить на 6–7-й день культивирования клеток.

Определение жизнеспособности нейронов коры мозга в культуре МТТ-методом. Прежде чем перейти к опытам по определению жизнеспособности нейронов, первичную культуру дважды промывали

стерильным фосфатным буфером (DPBS). Затем клетки переводили в Нейробазальную среду, содержащую 1% ростовой добавки B-27 без инсулина (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США), в этой среде их оставляли на ночь. На следующий день нейроны преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч или с 5 мМ 3-МА или с 5 мкМ z-DEVD-FMK в течение 0.5 ч в Нейробазальной среде, содержащей 1% ростовой добавки B-27 без инсулина. По окончании преинкубации с инсулином и ингибиторами окислительный стресс, длительность которого составляла 8 ч, инициировали 50 мкМ H_2O_2 . Определение жизнеспособности нейронов проводили, используя МТТ метод, основанный на восстановлении митохондриями жизнеспособных клеток МТТ в окрашенный МТТ-формазан [24]. В клеточную среду вносили МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл за 2 ч до окончания инкубации (с перекисью водорода или без нее). Для солиubilизации кристаллов формазана в лунки добавляли по 150 мкл лизирующего буфера, представляющего собой 20%-ный раствор додецилсульфата натрия в 50%-ном диметилформамиде в 0.1 N соляной кислоте. Экстинкцию контрольных проб принимали за 100%, экстинкции остальных проб выражали в процентах от контроля. Для определения защитного эффекта инсулина и других соединений рассчитывали, гибель какого числа нейронов при токсическом действии перекиси водорода удалось предотвратить благодаря применению каждого из протекторов ("rescue rates"). Для этого вычисляли разницу между значениями экстинкций проб, выраженных в % по отношению к 100%-ному контролю, при действии на нейроны одной перекиси водорода и этого прооксиданта после преинкубации клеток с инсулином. Эту величину делили на разницу между значением контрольных проб (100%) и соответствующим значением проб, подвергнутых действию перекиси водорода. Полученный результат умножали на 100. При отсутствии защитного эффекта инсулина числитель равен 0, как и процент клеток, гибель которых была предотвращена инсулином.

Определение влияния инсулина на уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) и апоптоза (расщепленной каспазы-3, соотношение Вах/Bcl-2), на активность протеинкиназы В (Akt), киназы гликогенсинтазы-3бета (GSK-3beta), аденозин монофосфат-активируемой протеинкиназы (АМРК) в нейронах коры мозга методом иммуноблоттинга. Для иммуноблоттинга нейроны коры мозга высевали в 12-луночные планшеты в количестве 1.1×10^6 клеток/лунку в полной ростовой среде. За 12 ч до начала эксперимента нейрональную культуру после 2 кратной промывки DPBS переводили в Нейробазальную среду, содержащую 1% ростовой добавки B-27 без инсулина. На следующий день клетки преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч. Для определения активности протеинкиназы В (Akt), GSK-3beta, АМРК по уровню их фос-

форилованных форм, а также соотношения уровня Вах и Bcl-2 окислительный стресс инициировали 100 мкМ H_2O_2 в течение 6 ч и в ряде случаев в течение более короткого промежутка времени, как это указано на рис. 4 и 5. По окончании воздействия нейроны коры мозга промывали 2 раза охлажденным фосфатным буфером. Клетки лизировали в 60 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис (pH 8.0), 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.25% деоксихолата натрия, 50 мМ NaF, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ пирогосфата натрия, 1 мМ глицерофосфата натрия, 1 мМ фенилметилсульфонил фторида (PMSF) и протеазный ингибиторный коктейль (Roche, Швейцария). Концентрацию белка в пробах определяли по модифицированному методу Лоури [25]. Белки разделяли в 13%-ном полиакриламидном геле, после чего осуществляли перенос на PVDF мембрану с размером пор 0.2 мкм (Bio-Rad, США). Сайты неспецифического связывания мембран блокировали, как описано ранее [26].

О влиянии инсулина на процессы аутофагии и апоптоза судили по уровню экспрессии маркерных белков LC3B-II и SQSTM1/p62, а также накоплению расщепленного фрагмента каспазы-3 (cleaved caspase-3 с молекулярной массой 17-19 kDa) с помощью специфических антител к LC3B-II (1: 1000, Cell Signaling, США), SQSTM1/p62 (1: 1000, ServiceBio, Китай) и к cleaved-Casp-3 (1: 1000, Cell Signaling, США). Для учета вариативности при загрузке проб осуществлялась нормализация с помощью антитела к GAPDH (1: 3000, Affinity Biosciences, Китай), которая выполнялась после стриппинга. Для изучения роли аутофагии и апоптоза в гибели нейронов и при исследовании экспрессии маркерных белков аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) и апоптоза (расщепленная каспаза-3 с молекулярной массой 17–19 kDa) в условиях окислительного стресса использовались ингибиторы аутофагии (3-МА) и апоптоза (z-DEVD-FMK). Действие инсулина блокировалось с помощью ингибитора тирозинкиназного домена рецепторов IGF-1 и инсулина 1 мкМ BMS-754807.

Об активности протеинкиназ судили по количеству их фосфорилированных форм, выявляемых с помощью специфических моноклональных антител. Степень активации протеинкиназы В (Akt) определяли по уровню pAkt (Ser⁴⁷³) (1: 1000, Cell Signalling, США), степень инактивации GSK 3-beta – по количеству pGSK-3beta (Ser⁹) (1: 1000, Cell Signalling, США), степень активации протеинкиназы АМРК – по уровню pАМРК (Thr¹⁷²) (1: 1000, Cell Signalling, США). Уровень проапоптотического белка Вах и антиапоптотического белка Bcl-2 выявляли с помощью антител к данным белкам (1:1000, Cell Signalling, США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга инкубировали с антителами к суммарной форме протеинкиназ Akt, GSK-3beta, АМРК-альфа (1:1000, Cell Signalling,

Таблица 1. Защитный эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-MA) и апоптоза (z-DEVD-FMK) в нейронах коры мозга крыс в условиях окислительного стресса

Протектор		Достоверность защитного эффекта
1 мкМ инсулин	$50.2 \pm 8.0\%$	$p < 0.01$
5 мМ 3-MA	$34.8 \pm 6.3\%$	$p < 0.001$
5 мкМ z-DEVD-FMK	$38.4 \pm 7.5\%$	$p < 0.01$

Примечание. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 6–8 опытов. Нейроны преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч или с 5 мМ 3-MA или с 5 мкМ z-DEVD-FMK в течение 0.5 ч, затем на них воздействовали 50 мкМ перекиси водорода в течение 8 ч. Определение жизнеспособности нейронов проводили, используя МТТ метод. Для определения защитного эффекта вычисляли, гибель какого процента нейронов от токсического действия перекиси водорода удалось предотвратить благодаря применению каждого из протекторов (“rescue rates”).

США). Для нормализации данных по уровню суммарной формы ферментов применяли альфа-тубулин (1: 2000, Cell Signalling, США) или GAPDH. Данные представляли в виде соотношения pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt, pGSK-3beta (Ser⁹)/GSK-3beta, pAMPK-alpha (Thr¹⁷²)/AMPK-alpha, Вах/альфа-тубулин, Bcl-2/альфа-тубулин, которое принимали за 1.0 в контрольных клетках. Также рассчитывали соотношение Вах/Bcl-2, которое в контрольных клетках принималось за 100%.

В качестве вторичных антител использовали антимышинные или антикроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cell Signaling Technology, США). Сигнал пероксидазы хрена усиливали с помощью реагентов Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen, США). Пленки с сигналом хемилюминесценции сканировались на сканере Canon (CanoScan 8800F). Для количественного определения оптической плотности иммунопозитивных полос использовали программу Bio7.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из целей нашего исследования было изучение способности инсулина, с одной стороны, и ингибиторов аутофагии (5 мМ 3-MA) и апоптоза (5 мкМ z-DEVD-FMK), с другой стороны, уменьшать гибель нейронов коры мозга крыс в культуре от токсического действия перекиси водорода. Результаты выражали в “rescue rates”, величинах, по-

казывающих, гибель какой части нейронов от токсического действия перекиси водорода удалось предотвратить тому или иному протектору (табл. 1). Поясним это на основании одного из опытов, в которых мы определяли защитный эффект инсулина. Количество клеток в контроле (и, соответственно, экстинкцию проб) принимали за 100%. При действии на нейроны коры мозга крыс 50 мкМ перекиси водорода живыми в этом опыте оставались 75.3% нейронов (погибали 24.7% нейронов). А после преинкубации клеток с 1 мкМ инсулина при последующем действии той же концентрации перекиси водорода число выживших нейронов составило 88.3% от контроля (погибали 11.7% нейронов). Эти данные показывают, что при преинкубации нейронов с инсулином погибло от действия перекиси водорода на 13% меньше нейронов от их общего числа в контроле ($24.7\% - 11.7\% = 13\%$). При этом их гибель от действия одной перекиси водорода составляет 24.7% от числа клеток в контроле, поэтому “rescue rate” составляет для инсулина в этом опыте $52.6\% [(13.0/24.7) \times 100]$.

При усреднении данных, полученных в 6 опытах, мы получаем величину “rescue rate” для инсулина, равную $50.2 \pm 8.0\%$ (табл. 1). Эти данные показывают, что инсулин спасает от гибели при токсическом действии перекиси водорода на нейроны коры мозга в условиях наших опытов в среднем примерно половину клеток.

Таким же образом, как и для инсулина, нами вычислялись “rescue rates” для 3-MA и для z-DEVD-FMK. Полученные данные показали, что аутофагия и апоптоз являются основными причинами гибели нейронов при действии на них перекиси водорода. Так, ингибитор аутофагии 3-MA при действии на нейроны предохранял от гибели $34.8 \pm 6.3\%$ клеток, что, как мы считаем, отражает, какой процент нейронов коры мозга гибнет от чрезмерной активации аутофагии в условиях окислительного стресса в опытах *in vitro* (табл. 1). Не меньший процент клеток, по-видимому, гибнет от апоптоза. Так, найдено, что ингибитор каспазы-3 z-DEVD-FMK при преинкубации с ним нейронов предохраняет от гибели $38 \pm 7.5\%$ нейронов (табл. 1). Различия в числе клеток, гибнущих от аутофагии и апоптоза, не являются достоверными.

Интересно, что при совместном действии инсулина и ингибитора аутофагии 3-MA защитный эффект (“rescue rates”) был достоверно выше (табл. 2), чем при действии одного ингибитора или одного инсулина ($p < 0.05$ по *t* критерию Стьюдента методом попарных сравнений). Эти данные получены в отдельной серии опытов. В этой серии наблюдались более низкие значения “rescue rates” для инсулина ($27.8 \pm 5.0\%$ при $n = 3$ и $41.0 \pm 5.5\%$ при $n = 4$ по сравнению с $50.2 \pm 5.0\%$ при $n = 6$ в табл. 1). Это свидетельствует о существенном разбросе данных по защитному эффекту инсулина между отдельны-

Таблица 2. Защитный эффект совместного применения инсулина и 3-МА или инсулина и z-DEVD-FMK при окислительном стрессе

Протектор	Rescue rates	Число опытов	Достоверность различий по сравнению с защитным эффектом одного из соединений
1 мкМ инсулин	$32.5 \pm 10.1\%$	$n = 3$	$p < 0.05$ vs эффект 1 мкМ инсулина $p < 0.05$ vs эффект 5 мМ 3-МА
5 мМ 3-МА	$27.8 \pm 5.0\%$	$n = 3$	
1 мкМ инсулин + 5 мМ 3-МА	$57.4 \pm 10.5\%$	$n = 3$	
1 мкМ инсулин	$41.0 \pm 5.5\%$	$n = 4$	$p < 0.05$ vs эффект 1 мкМ инсулина $p < 0.05$ vs эффект 5 мкМ z-DEVD-FMK
5 мкМ z-DEVD-FMK	$38.9 \pm 2.5\%$	$n = 4$	
1 мкМ инсулин + 5 мкМ z-DEVD-FMK	$62.3 \pm 5.9\%$	$n = 4$	

Примечание. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM из 3–4 опытов. Достоверность различий вычисляли, используя метод парных сравнений по *t* критерию Стьюдента. Нейроны преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч или с 5 мМ 3-МА или с 5 мкМ z-DEVD-FMK в течение 0.5 ч или с инсулином и одним из ингибиторов. Остальная информация приведена в примечании к табл. 1.

ми опытами, которые ставились в разные дни, иногда с большим разрывом по срокам их проведения. При этом, если бы в каждой серии опытов было бы проведено по 6 опытов, как в табл. 1, то, по-видимому, различия не были бы столь заметны, как при 3 или 4 опытах. При действии инсулина и z-DEVD-FMK совместная способность этих соединений предотвращать гибель нейронов коры мозга была также выше (табл. 2), чем защитный эффект каждого из этих соединений ($p < 0.05$). Совокупность полученных данных позволяет полагать, что инсулин способен предотвращать как аутофагическую, так и апоптотическую гибель нейронов в условиях окислительного стресса.

Наряду с этим необходимо было также показать способность инсулина нормализовать уровень маркеров аутофагии в нейронах коры мозга крыс в культуре, измененный при активации аутофагии под действием перекиси водорода на эти клетки. Нами было изучено влияние перекиси водорода и преинкубации с инсулином на разных сроках воздействия прооксиданта на уровень двух маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62 в нейронах. Как видно из данных, приведенных на рис. 1а, достоверное увеличение в нейронах уровня такого маркера аутофагии, как LC3B-II, представляющего липидированную форму LC3B (в отличие от растворимой формы LC3B-I), наблюдается через 4 и 6 ч после инициации окислительного стресса, но уже через 1 и 2 ч после начала действия перекиси водорода проявляется тенденция к увеличению в нейронах уровня этого маркера. Хотя инсулин не оказывает воздействия на уровень LC3B-II в контрольных нейронах, но он достоверно снижает экспрессию этого маркера уже через 1 и 2 ч после начала действия перекиси водорода (рис. 1а). Особенно большое и также достоверное снижение содержания этого маркера аутофагии до контрольных величин наблюдается через 4 и 6 ч после начала действия перекиси водорода. Эти данные неопро-

вержимо свидетельствуют о способности инсулина подавлять чрезмерную активацию аутофагии в нейронах коры мозга, подвергнутых действию перекиси водорода, в опытах *in vitro*.

Такого рода данные были подтверждены и при изучении динамики изменения другого маркера аутофагии SQSTM1/p62 (рис. 1б). Содержание убиквитин-связывающего каркасного белка SQSTM1/p62, участвующего в образовании аутофагосом, напротив, имеет обратную корреляцию с активацией аутофагии, так как этот белок подвергается деструкции в лизосомах. Как известно, этот маркер достоверно снижается в клетках или тканях при активации процессов аутофагии и возрастает при ее подавлении. Как видно из данных, представленных на рис. 1б, уровень этого маркера при действии одной перекиси водорода мало меняется по сравнению с контролем через 0.5, 1 и 2 ч от начала действия перекиси водорода на нейроны. При этом через 4 и 6 ч после инициации окислительного стресса происходит значительное, почти двукратное снижение уровня этого маркера в нейронах. Это, как и увеличение уровня LC3B-II, свидетельствует о значительной активации процессов аутофагии в нервных клетках на этих сроках после начала воздействия прооксиданта. Преинкубация с инсулином значительно и достоверно повышает уровень SQSTM1/p62 в нейронах до контрольных величин через 4 и 6 ч после начала действия перекиси водорода. Статистически значимое повышение уровня этого маркера под влиянием инсулина имеет место и через 2 ч после начала действия прооксиданта. Таким образом, данные, полученные при изучении изменения уровня двух маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62), свидетельствуют об ингибировании инсулином чрезмерной активации процессов аутофагии в условиях окислительного стресса, о способности инсулина снижать ее интенсивность практически до уровня контроля.

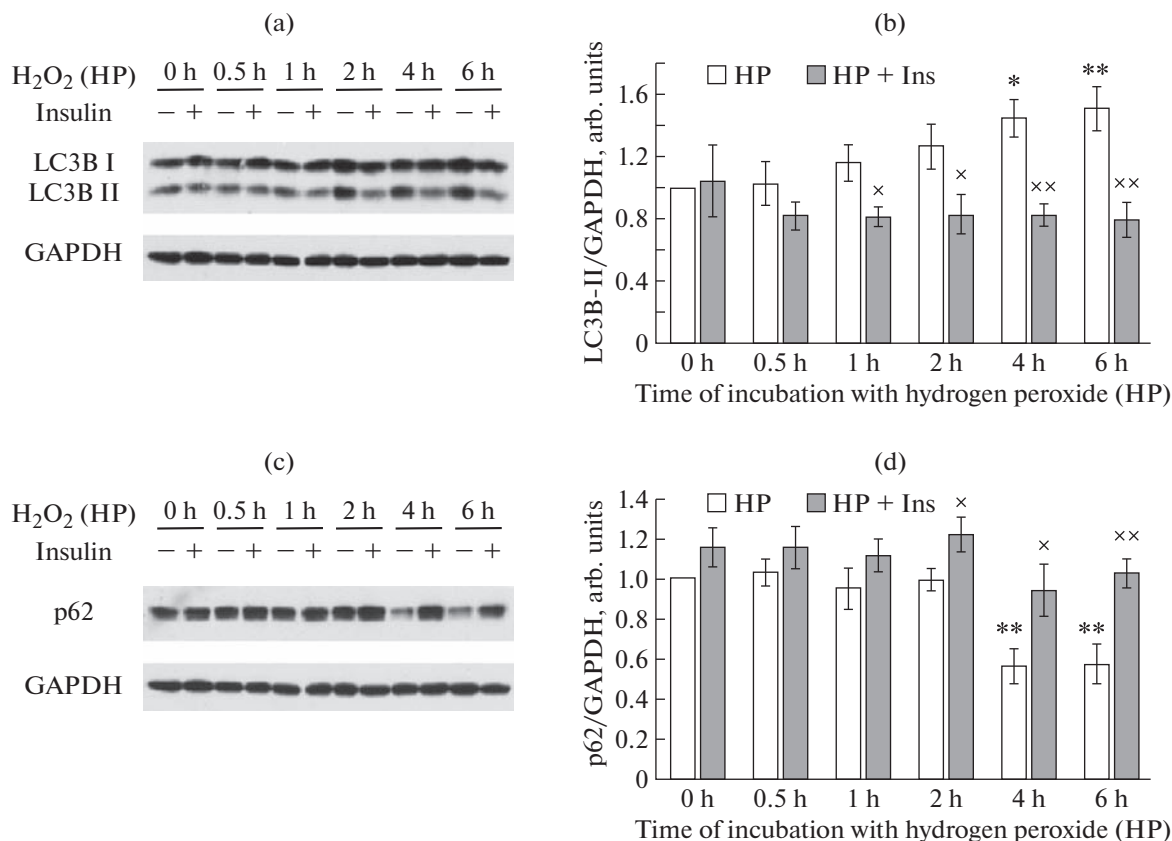


Рис. 1. Эффект инсулина и перекиси водорода на уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) в нейронах коры мозга крыс на разных этапах развития окислительного стресса. (a) и (b) — изменение уровня LC3B-II, (c) и (d) — изменение уровня sqstm1/p62. (a) и (c) — иммуноблоты, (b) и (d) — результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 4-5$) представлены как среднее $\pm$ SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение разного времени. Сокращения на рисунке: HP — перекись водорода, Ins — инсулин. Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.02$, по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x — $p < 0.05$, xx — $p < 0.02$.

Следует отметить, что в присутствии BMS-754807, ингибитора рецепторов инсулина и IGF-1, эффект инсулина на уровень маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62 полностью пропадал (рис. 2b и 2d), в этом случае уровень маркеров аутофагии при действии на нейроны инсулина и перекиси водорода достоверно не отличался от их уровня при действии одного прооксиданта. Эти данные свидетельствуют о том, что нейропротекторное действие инсулина при чрезмерной активации аутофагии в нервных клетках опосредуется через рецепторы самого инсулина и IGF-1.

Изучалось также воздействие ингибиторов аутофагии и апоптоза на уровень маркеров аутофагии в нейронах коры мозга в условиях окислительного стресса. Ингибитор аутофагии (3-MA) достоверно снижал содержание LC3B-II в нейронах, увеличенное под действием перекиси водорода (рис. 2b) до уровня, характерного для контроля. При этом этот ингибитор, напротив, достоверно повышал, практически также до контрольных величин, уровень другого маркера аутофагии —

SQSTM1/p62, который значительно и достоверно снижался в нейронах при действии на них перекиси водорода (рис. 2d). Эти данные показывают, что при действии такого прооксиданта, как перекись водорода, в нейронах коры мозга происходит активация аутофагии, тогда как преинкубация клеток с ингибитором аутофагии, как и следовало ожидать, предотвращает изменения экспрессии характерных для данного процесса маркеров, делая их уровень сходным с уровнем в контроле.

Представляло интерес также проверить, оказывает ли влияние интенсивность апоптотических процессов, развивающихся при действии прооксиданта, на интенсивность аутофагии. Однако нами не выявлено достоверных изменений в уровне обоих изученных маркеров аутофагии под воздействием z-DEVD-FMK, ингибитора каспазы-3 и апоптотических процессов (рис. 2b и 2d). Уровень LC3B-II и SQSTM1/p62 в нейронах коры мозга под воздействием перекиси водорода и z-DEVD-FMK достоверно не отличался от их уровня, наблюдавшегося при действии одной перекиси водорода.

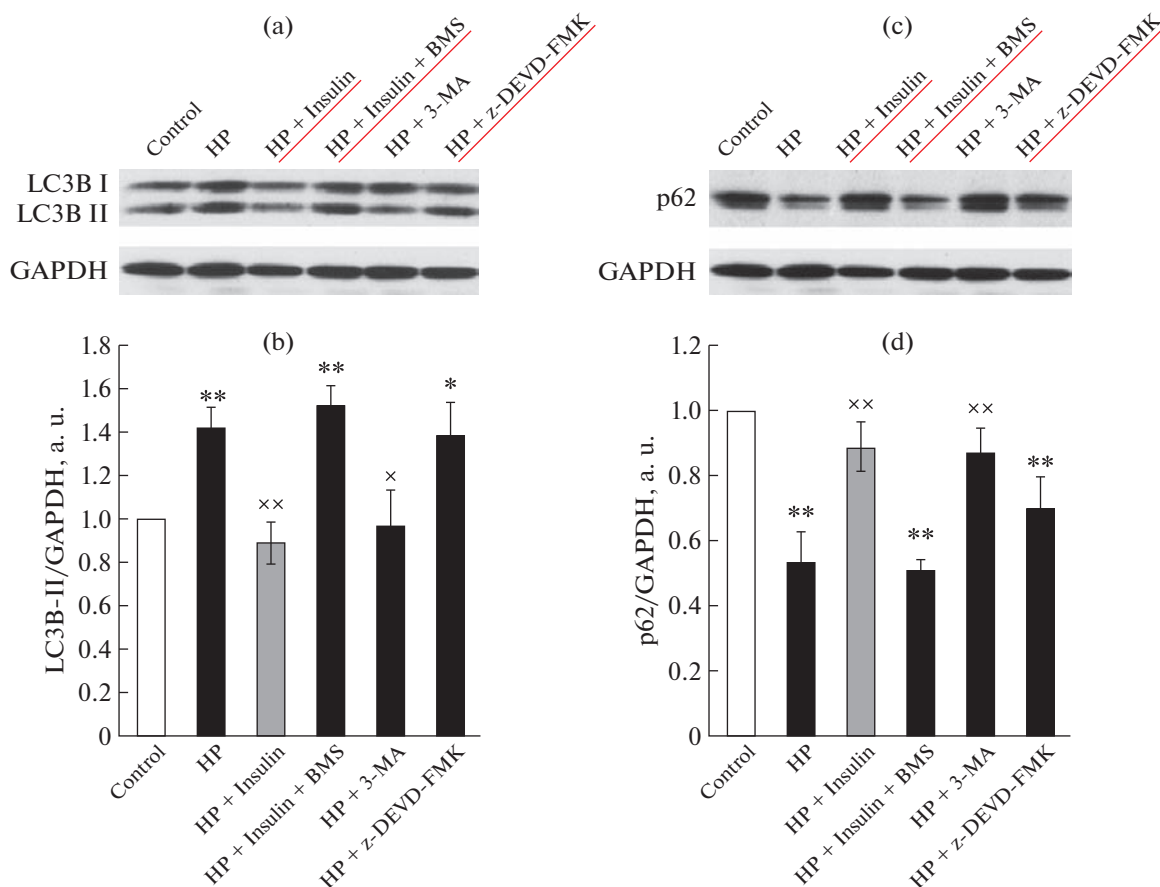


Рис. 2. Эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-MA) и апоптоза (z-DEVD-FMK) на уровень маркеров аутофагии (LC3B-II and SQSTM1/p62) в нейронах коры мозга крыс в культуре, подвергнутых действию перекиси водорода. (a) и (b) — изменение уровня LC3B-II, (c) и (d) — изменение уровня SQSTM1/p62. (a) и (c) — иммуноблоты, (b) и (d) — результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 6$) представлены как среднее $\pm$ SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, либо в течение 30 мин с 5 мМ 3-MA или 5 мкМ z-DEVD-FMK, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение 6 ч. Сокращения на рисунке: HP — перекись водорода, 3-MA — 3-метилладин, BMS — BMS-754807 (ингибитор рецепторов инсулина и IGF-1). Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.02$, по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x — $p < 0.05$, xx — $p < 0.02$.

Перекись водорода достоверно увеличивала (более, чем в 2 раза) активность каспазы-3 (содержание расщепленного фрагмента 17–19 кДа) в нейронах коры мозга ($p < 0.02$) через 6 ч после ее добавления (рис. 3a). Через 4 ч после аппликации прооксиданта активность каспазы-3 возрастала в 1.5 раза, но большой разброс данных делал это увеличение недостоверным. Инсулин достоверно снижал активность каспазы-3, а значит и апоптотическую гибель клеток через 6 ч после аппликации перекиси водорода (рис. 3a). На некоторых более ранних сроках окислительного стресса, например, через 2 ч после начала действия перекиси водорода, наблюдалась тенденция к снижению расщепленной каспазы-3 (17–19 кДа), но различия не были достоверными ($p = 0.06$).

Нами было показано (рис. 3b) увеличение активности каспазы-3 через 6 ч после аппликации перекиси водорода, и снижение активации каспа-

зы-3 под влиянием преинкубации с инсулином на этом сроке воздействия перекиси водорода ($p < 0.02$). Интересно отметить, что в присутствии ингибитора рецепторов инсулина и IGF-1 (BMS-754807) эффект инсулина полностью исчезал (рис. 3d). Это свидетельствует о том, что инсулин осуществляет свое антиапоптотическое действие на нейроны коры мозга в культуре, взаимодействуя со своими рецепторами и рецепторами IGF-1 на этих клетках.

Мы попытались также выявить, используя ингибитор 3-MA, влияние ингибирования аутофагии на интенсивность апоптоза и апоптотической гибели клеток. Однако в условиях окислительного стресса в присутствии ингибитора аутофагии 3-MA накопление расщепленного фрагмента каспазы-3 (17–19 кДа), показывающее степень гибели нейронов от апоптоза, в условиях наших опытов не претерпело достоверных изменений (рис. 3d).

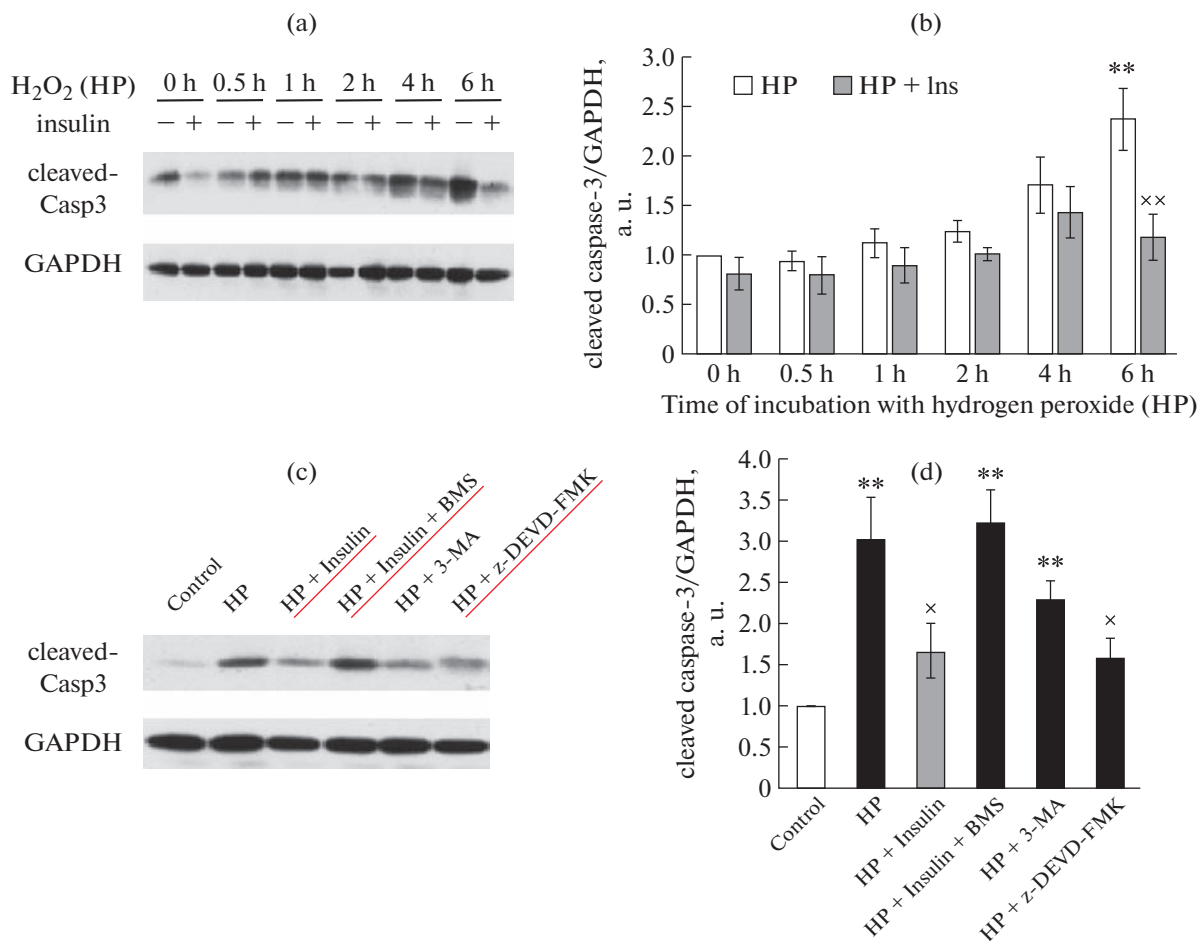


Рис. 3. Эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-MA) и апоптоза (z-DEVD-FMK) на уровень расщепленной каспазы-3 (маркер апоптоза) в нейронах коры мозга крыс в культуре, подвергнутых действию перекиси водорода. (а) и (b) — эффект инсулина и перекиси водорода на уровень расщепленной каспазы-3 (17–19 кДа) в нейронах на разных этапах развития окислительного стресса. (с) и (d) — эффект инсулина, 3-MA и z-DEVD-FMK на уровень расщепленной каспазы-3 (17–19 кДа) в нейронах на позднем этапе действия перекиси водорода (6 ч). (а) и (с) — иммуноблоты, (b) и (d) — результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 4-5$ для В и $n = 6$ для D) представлены как среднее $\pm$ SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина или в течение 30 мин с 3-MA или с z-DEVD-FMK, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение разного времени. Сокращения на рисунке: HP — перекись водорода, Ins — инсулин, 3-MA — 3-метиладенин, BMS — BMS-754807 (ингибитор рецепторов инсулина и IGF-1). Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * и ** — по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x — $p < 0.05$, xx — $p < 0.02$.

Перед нами стояла также задача выявить, влиянием на какие сигнальные пути можно объяснить ингибирование инсулином аутофагии и аутофагической гибели клеток, а также апоптоза и апоптотической гибели клеток. Для этого мы проверили, как влияют в условиях наших опытов перекись водорода и инсулин на активность протеинкиназ Akt, GSK3-beta и AMPK и на соотношение проапоптотического белка Bax и антиапоптотического белка Bcl-2 (Bax/Bcl-2).

Как видно из представленных на рисунке данных, активность протеинкиназы B (Akt) в нейронах коры мозга через 6 ч после аппликации перекиси водорода мало отличается от контрольных величин (рис. 4b). Но, если клетки в культуре преинкуби-

вали с инсулином, то активность Akt остается очень высокой и через 6 ч после воздействия перекиси водорода, при этом она более, чем в 6 раз превышает активность в контроле и при действии одной перекиси водорода (рис. 4а). Активация Akt лежит в основе защитного действия инсулина. Хорошо известно и документировано антиапоптотическое действие инсулина, основанное на активации Akt. В его реализации важную роль играет инактивация при действии Akt протеинкиназы GSK-3beta благодаря ее фосфорилированию по Ser⁹. Как видно из данных, представленных на рисунке, через 6 ч после аппликации перекиси водорода активность этой протеинкиназы в нейронах мало отличается от контрольных величин. Но, если

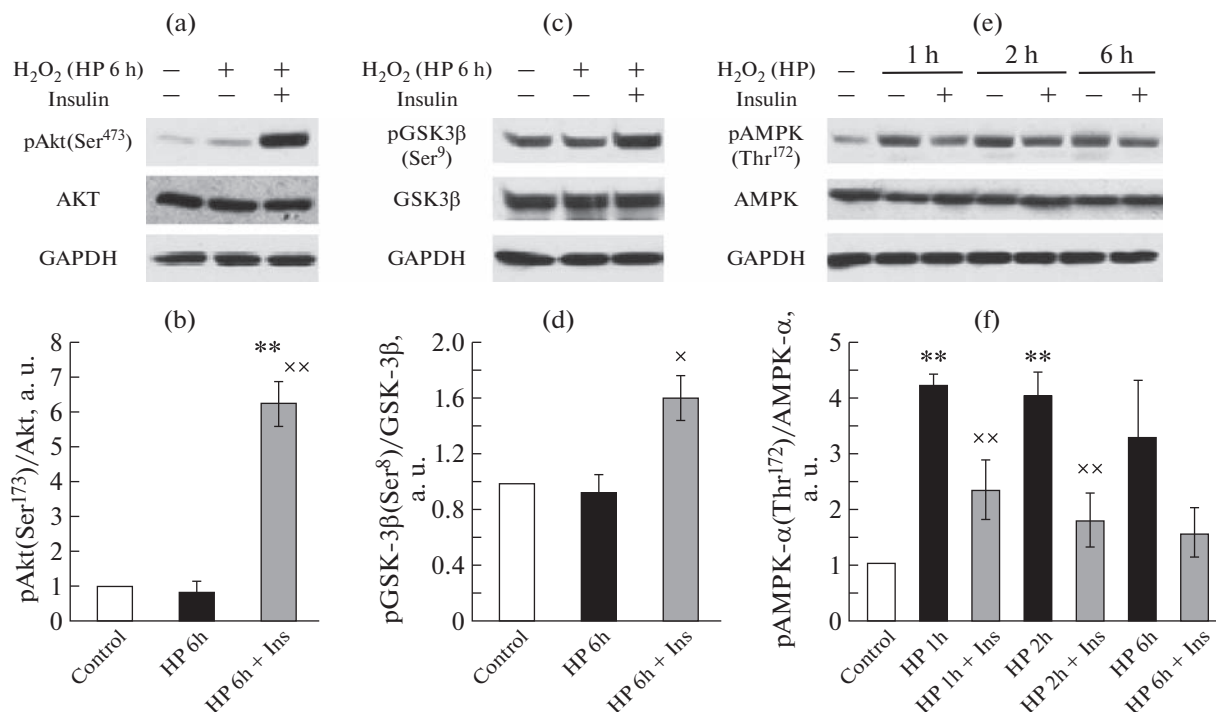


Рис. 4. Влияние перекиси водорода и инсулина на активность протеинкиназы В (Akt), GSK-3β и AMPK в нейронах коры мозга крыс. (a) и (b) – активность протеинкиназы В (Akt) определяли по уровню pAkt (Ser⁴⁷³), (c) и (d) – степень инактивации GSK 3-β – по уровню pGSK-3β (Ser⁹), (e) и (f) – активность протеинкиназы AMPK – по уровню pAMPK (Thr¹⁷²). (a), (c) и (f) – иммуноблоты, (b), (d) и (f) – результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 5-7$) представлены как среднее $\pm$ SEM. Данные выражали в виде соотношения содержания фосфорилированного фермента к его общему содержанию: pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt (a), pGSK-3β (Ser⁹)/GSK-3β (b), pAMPK-α (Thr¹⁷²)/AMPK-α (c). Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение 6 ч. Сокращения на рисунке: HP – перекись водорода, Ins – инсулин. Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: ** – $p < 0.02$ по сравнению с эффектом одной перекиси водорода; x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.01$.

нейроны преинкубировали с инсулином, то на этом сроке действия перекиси водорода в пробах достоверно и довольно значительно повышен уровень этого фермента, фосфорилированного по Ser⁹ (рис. 4b). Это свидетельствует о том, что под влиянием инсулина происходит инактивация GSK-3β, что очень важно для поддержания жизнеспособности нейронов, т.к. при активации этой протеинкиназы нарушаются функции митохондрий этих клеток, что может приводить к их апоптотической гибели.

Нужно также отметить, что активация Akt может приводить к ингибированию аутофагических процессов, к предотвращению чрезмерной активации аутофагии, приводящей к гибели нервных клеток. Так, активация сигнального пути Akt–mTOR, как известно, приводит к ингибированию процессов аутофагии.

Для объяснения механизма защитного эффекта инсулина, связанного с подавлением процессов аутофагии и аутофагической гибели нервных клеток, важно было также изучить влияние инсулина на активность AMPK (рис. 4c). Как известно, активация этой протеинкиназы является триггером

процесса аутофагии. Как видно из данных, представленных на рис. 4c, инсулин достоверно и более чем в 2 раза уменьшает активность AMPK через 1 и 2 ч после начала действия перекиси водорода. Через 6 ч после начала действия перекиси водорода наблюдается тенденция к снижению инсулином активности этой протеинкиназы ($p < 0.1$, но $p > 0.05$), но его эффект становится недостоверным. По-видимому, значительное снижение активности фермента инсулином через 1 ч и 2 ч после начала действия перекиси водорода приводит к уменьшению интенсивности аутофагического процесса не только на этих, но и на последующих временных промежутках.

Нами также показаны значительное увеличение отношения проапоптотического белка Вах к антиапоптотическому белку Bcl-2 (Вах/Bcl-2) под действием на нейроны коры мозга перекиси водорода и нормализация этого отношения под влиянием инсулина (рис. 5b и c).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аутофагия представляет собой “самопоедание”, катаболический путь, с помощью которого долго-

живущие белки, поврежденные клеточные органеллы и неправильно свернутые белки подвергаются деградации и затем вновь используются для поддержания гомеостаза клеток и их нормального функционирования. Для доставки подлежащих утилизации белков или компонентов клетки в лизосомы для их дальнейшего использования природа создала специальные частицы — аутофагосомы. Они представляют собой покрытые двойной оболочкой вакуоли, содержащие цитоплазму клеток с включенными в нее митохондриями или другими органеллами. Долгое время считалось, что аутофагия играет только защитную роль, в том числе и в ЦНС, предохраняя нейроны и другие клетки мозга от пагубного влияния стрессорных воздействий, в том числе от ишемии мозга и его последующей реперфузии. При этом защитный эффект нейропротекторов при разных формах ишемии и реперфузии приписывали преимущественно их способности противостоять апоптотической и некротической гибели нервных клеток. Но в настоящее время представления об исключительно защитном воздействии аутофагии на клетки разных органов пересмотрены. Так, в современной литературе есть многочисленные примеры того, что активация аутофагии может приводить к гибели нейронов при различных поражениях мозга, особенно при сильных воздействиях на него. Так, получены свидетельства того, что защитный эффект многих нейропротекторов при ишемии и реперфузии мозга связан прежде всего с их способностью ингибировать и аутофагические, и апоптотические процессы, предотвращая таким образом гибель нервных клеток мозга. К таким протекторам относятся некоторые флавоноиды, ганглиозид GM1, финголимод (аналог сфингозин-1-фосфата), N-ацетил-серотонин (предшественник мелатонина) и многие другие соединения [13–17, 27, 28].

Настоящая работа посвящена изучению роли антиаутофагического и антиапоптотического эффектов инсулина в его нейропротекторном действии на нейроны коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса. Было найдено, что основными причинами гибели нейронов коры мозга крыс в культуре при токсическом действии на них перекиси водорода являются аутофагия и апоптоз. Показано повышение жизнеспособности нейронов при действии на них ингибитора аутофагии (3-MA) или апоптоза (z-DEVD-FMK). При этом нейропротекторный эффект инсулина более выражен, чем эффект ингибиторов аутофагии или апоптоза по отдельности. Интересно отметить, что при совместном действии на нейроны коры мозга в культуре ингибитора аутофагии и инсулина защитный эффект был достоверно выше, чем при действии одного из этих двух протекторов. А также при совместном действии ингибитора апоптоза и инсулина защитный эффект был выше, чем при действии одного из этих соединений. В совокупности полу-

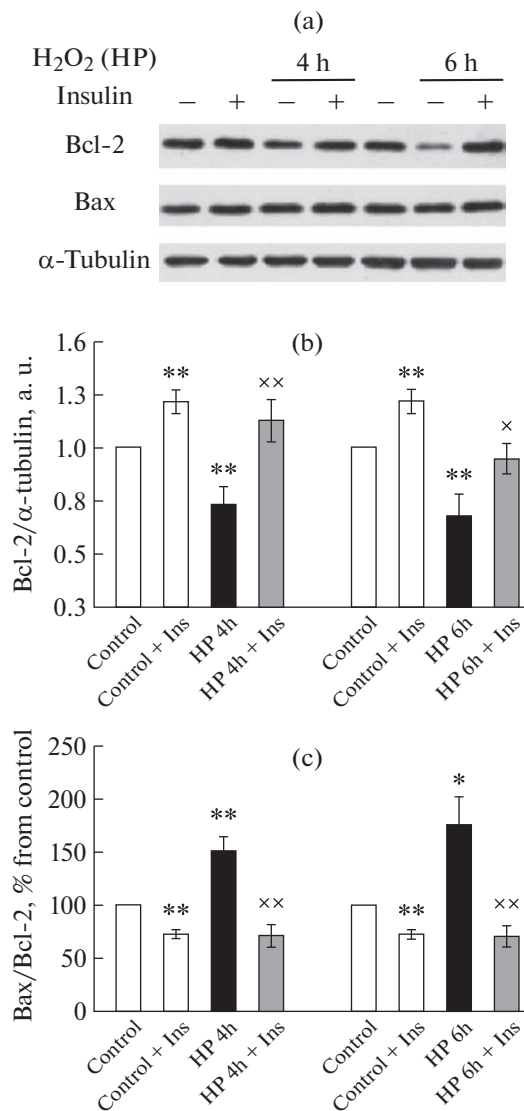


Рис. 5. Влияние инсулина и перекиси водорода на уровень антиапоптотического белка Bcl-2 и отношение Bax/Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс в культуре. (a) и (b) — влияние инсулина и перекиси водорода на уровень Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс. (c) — влияние инсулина и перекиси водорода на отношение Bax/Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс. (a) — иммуноблоты, (b) и (c) — результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 8$) представлены как среднее $\pm$ SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, а затем подвергали воздействию перекиси водорода в течение 6 ч. Сокращения на рисунке: HP — перекись водорода, Ins — инсулин. Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.02$, по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x — $p < 0.05$, xx — $p < 0.02$.

ченные данные позволяют прийти к выводу, что инсулин способен снижать как аутофагическую, так и апоптотическую гибель нейронов коры мозга в опытах *in vitro*.

Способность инсулина ингибировать процессы аутофагии (и, соответственно, аутофагической гибели нейронов при патологических воздействиях, приводящих к чрезмерной активации этого процесса) была подтверждена в опытах по изучению воздействия инсулина на уровень маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62. В настоящей работе найдено, что такой прооксидант, как перекись водорода, достоверно увеличивает в нейронах уровень маркера аутофагии LC3B-II, и, напротив, уменьшает уровень другого маркера SQSTM1/p62, для которого характерно снижение его уровня при активации аутофагии. Впервые показано, что инсулин при этом нормализует уровень маркеров аутофагии в нейронах, изменяя их содержание практически до контрольных значений. Таким образом, впервые показано, что инсулин способен ингибировать процессы аутофагии в нейронах, активированные при неблагоприятном воздействии на эти клетки.

Найдено, что в условиях наших опытов перекись водорода активировала процессы аутофагии и апоптоза, что приводило к гибели нейронов коры мозга. В присутствии ингибиторов аутофагии или апоптоза (3-MA или z-DEVD-FMK, соответственно) гибель нейронов значительно и достоверно снижалась (более чем на 35% в присутствии каждого из ингибиторов). Это свидетельствует о том, что активация каждого из этих процессов приводит к гибели значительной части нейронов. Инсулин же в случае преинкубации с ним нейронов коры мозга в значительно большей мере, чем ингибитор аутофагии или апоптоза, повышал жизнеспособность нейронов коры мозга. При этом он снижал интенсивность аутофагии и апоптоза, нормализуя уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и p62) и апоптоза (расщепленная каспаза-3). Совокупность этих данных позволяет сделать вывод, что инсулин способен достоверно снижать интенсивность аутофагии и апоптоза и в значительной мере предотвращать не только апоптотическую, но и аутофагическую гибель нейронов коры мозга в условиях окислительного стресса в опытах *in vitro*.

Наши данные согласуются с данными других авторов, в литературе есть свидетельства того, что инсулин ингибирует процессы аутофагии в экстрактивных клетках и органах. Так, найдено, что этот протектор ингибирует процессы аутофагии в скелетных мышцах, усиливая фосфорилирование протеинкиназы ULK-1 по Ser⁷⁵⁷ (ингибирующий сайт) [29]. Наряду с этим найдено, что инсулин ингибирует процессы аутофагии в хондроцитах человека [30]. В этих клетках инсулин уменьшает уровень LC3-II и усиливает фосфорилирование Akt и рибосомной S6 киназы, активируя эти протеинкиназы, ингибирующие процессы аутофагии [30].

Получены также данные о том, что инсулин снижает в нейронах уровень одного из маркеров

апоптоза (расщепленной каспазы-3). Эти данные согласуются с аналогичными данными, полученными ранее другими авторами, свидетельствующими о том, что нейропротекторный эффект инсулина в большой мере зависит от его способности ингибировать апоптотические процессы в нервных клетках [31–33].

Среди сигнальных систем, регулирующих процессы аутофагии, важную роль играет протеинкиназа AMPK, способная инициировать процессы аутофагии при накоплении аденозинмонофосфата (AMP), которое может происходить, в частности, при недостатке пищи. Наряду с этим в регуляции процессов аутофагии у млекопитающих активно участвует mTOR комплекс 1 (mTORC1), ингибирующий процессы аутофагии, благодаря в том числе фосфорилированию регуляторно-ассоциированного с mTOR белка Raptor или TSC2. При нормальных условиях существования нервных клеток и достаточном количестве пищи уровень AMP и, соответственно, активность AMPK относительно низки, а комплекс mTORC1 гиперактивирован. Напротив, при различных стрессорных и неблагоприятных воздействиях на мозг, в том числе при ишемии и реперфузии мозга, либо при неблагоприятных воздействиях на нервные клетки в культуре, происходит активация AMPK. К этим стрессорным факторам относятся увеличение уровня AMP, уменьшение уровня АТФ, увеличение образования активных форм кислорода (АФК) и концентрации цитозольного кальция. Все эти факторы способствуют активации протеинкиназы AMPK и ингибированию Akt и mTOR, что запускает аутофагию.

Для выяснения механизма действия инсулина важно было показать, как он влияет на активность протеинкиназ AMPK- α и Akt. Нами найдено, что в условиях наших опытов перекись водорода достоверно активировала, а инсулин ингибировал активность протеинкиназы AMPK- α через 1 и 2 ч после аппликации перекиси водорода (рис. 4с). Через 6 ч после аппликации перекиси водорода наблюдались тенденция к увеличению активности AMPK- α под влиянием перекиси водорода и тенденция к уменьшению активности этого фермента под влиянием инсулина, но различия не были достоверными из-за большого разброса данных, чем на более ранних этапах воздействия прооксиданта. Ранее способность инсулина ингибировать активность AMPK- α была показана *in vivo* в ряде районов гиппокампа при изучении механизмов регуляции пищевого поведения животных [34]. Ингибирование инсулином активности AMPK- α было ранее отмечено также в экстрактивных клетках и органах (см., например, [35]).

Наряду с этим в настоящей работе показано, что инсулин активирует сигнальный путь PI3K-Akt1 (рис. 4а), который активирует комплекс mTORC1,

являющийся действенным ингибитором аутофагии. Нами показано, что в условиях наших опытов через 6 ч после добавления к нейронам коры мозга перекиси водорода ее эффект на активность Akt не выражен. На более ранних этапах своего воздействия перекись водорода способна активировать эту протеинкиназу [36]. Но и при этом относительно длительном сроке воздействия перекиси водорода инсулин многократно активирует эту протеинкиназу. Активация Akt инсулином лежит в основе его защитного эффекта на клетки, подвергнутые действию токсических веществ.

Способность инсулина противостоять апоптотической гибели нейронов в условиях окислительного стресса показана в ряде ранее опубликованных работ [см., например, [31–33]. В настоящей работе нами найдено, что перекись водорода достоверно увеличивает, а инсулин достоверно снижает активность каспазы-3 в нейронах коры мозга через 6 ч после аппликации перекиси водорода (рис. 3а, 3б, 3с, 3д). Что касается механизма антиапоптотического эффекта инсулина, то в основе его, по-видимому, лежит способность активировать Akt (рис. 4а), которая затем фосфорилирует по Ser⁹ и таким образом инактивирует GSK-3 β . Дело в том, что чрезмерная активация этого фермента приводит к нарушению метаболизма и функций митохондрий в клетках, в том числе в нервных [37]. Способность инсулина фосфорилировать по Ser⁹ и таким образом инактивировать GSK-3 β в нейронах была до нас показана и в других работах (см., например, [37, 38]). Нейропротекторный эффект активации Akt инсулином заключается также в способности активированной Akt увеличивать синтез антиапоптотического белка митохондрий Bcl-2 и снижать отношение Bax/Bcl-2 в нейронах. В этом отношении наши данные согласуются с данными Дуарте и соавт. [39].

Таким образом, в основе способности инсулина ингибировать чрезмерную активацию аутофагии и аутофагическую гибель нейронов в условиях окислительного стресса лежит, очевидно, его способность ингибировать активность энергетического сенсора AMPK- α и активировать протеинкиназу Akt, которая, в свою очередь, обладает способностью активировать комплекс mTORC1, ингибирующий процессы аутофагии. Способность же инсулина противостоять апоптотической гибели нейронов при окислительном стрессе определяется, очевидно, прежде всего его способностью активировать протеинкиназу Akt которая, фосфорилируя протеинкиназу GSK-3 β по Ser⁹, приводит к ее инактивации и таким образом предотвращает нарушение функций митохондрий. Активация Akt также способствует увеличению синтеза антиапоптотического белка Bcl-2.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол этического комитета ИЭФБ РАН № 1-11/2022, от 27.01.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fan LW, Carter K, Beatt A, Pang Y* (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
2. *Tashima T* (2020) Shortcut approaches to substance delivery into the brain based on intranasal administration using nanodelivery strategies for insulin. *Molecules* 25 (21): 5188. <https://doi.org/10.3390/molecules25215188>
3. *Farzampour S, Majdi A, Sadigh-Eteghad S* (2016) Intranasal insulin treatment improves memory and learning in a rat amyloid-beta model of Alzheimer's disease. *Physiol Int* 103 (3): 344–353. <https://doi.org/10.1556/2060.103.2016.3.7>
4. *Guo Z, Chen Y, Mao YF, Zheng T, Jiang Y, Yan Y, Yin X, Zhang B* (2017) Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Sci Rep* 7: 45971. <https://doi.org/10.1038/srep45971>
5. *Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, Donohue MC, Brewer JB, Jenkins C, Harless K, Gessert D, Aisen PS* (2020) Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia. *JAMA Neurol* 77 (9): 1099–1109. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1840>
6. *Hallschmid M* (2021) Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* 35 (1): 21–37. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00781-x>
7. *Woodfield A, Gonzales T, Helmerhorst E, Laws S, News-holme P, Porter T, Verdile G* (2022) Current Insights on the Use of Insulin and the Potential Use of Insulin Mi-

- metics in Targeting Insulin Signalling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 23 (24):15811.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415811>
8. Russo V, Candeloro P, Malara N, Perozziello G, Iannone M, Scicchitano M, Mollace R, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C (2019) Key role of cytochrome C for apoptosis detection using Raman microimaging in an animal model of brain ischemia with insulin treatment. *Appl Spectrosc* 73 (10): 1208–1217.
<https://doi.org/10.1177/0003702819858671>
 9. Rizk NN, Rafols JA, Dunbar JC (2006) Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. *Brain Res* 1096 (1): 204–212.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.060>
 10. Sanderson TH, Kumar R, Murariu-Dobrin AC, Page AB, Krause GS, Sullivan JM (2009) Insulin activates the PI3K-Akt survival pathway in vulnerable neurons following global brain ischemia. *Neurol Res* 31 (9): 947–958.
<https://doi.org/10.1179/174313209X382449>
 11. Zorina II, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova NF (2018) Insulin administration prevents accumulation of conjugated dienes and trienes and inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat cerebral cortex during two-vessel forebrain ischemia and reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 54 (3): 246–250.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018030109>
 12. Zorina II, Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2019) Features of the changes in lipid peroxidation and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain of the aged rats in the conditions of two-vessel cerebral ischemia/reperfusion. *Adv Gerontol* 32 (6): 941–947.
 13. Huang SM, Tsai SY, Lin JA, Wu CH, Yen GC (2012) Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid β -induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. *Mol Nutr Food Res* 5: 601–609.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201100682>
 14. Wang M, Li YJ, Ding Y, Zhang HN, Sun T, Zhang K, Yang L, Guo YY, Liu SB, Zhao MG, Qu YM (2016) Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 53: 932–943.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-9062-5>
 15. Li L, Tian J, Long MK-W, Chen Y, Lu J, Zhou C, Wang T (2016) Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy. *PLoS One* 11: e0144219.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144219>
 16. Hu Y, Zhou H, Zhang H, Sui Y, Zhang Z, Zou Y, Li K, Zhao Y, Xie J, Zhang L (2022) The neuroprotective effect of dexmedetomidine and its mechanism. *Front Pharmacol* 13: 965661. eCollection 2022.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965661>
 17. Zhang H, Wang X, Chen W, Yang Y, Wang Y, Wan H, Zhu Z (2023) Danhong injection alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy through miRNA-132-3p/ATG12 signal axis. *J Ethnopharmacol* 300: 115724.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115724>
 18. Nabavi SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima DK, Ahmed T, Shahid M (2019) Novel therapeutic strategies for stroke: the role of autophagy. *Critical Rev Clin Lab Sci* 56 (3): 182–199.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1575333>
 19. Campbell BCV, Khatri P (2020) Stroke. *Lancet* 396 (10244): 149–142.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31179-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31179-X)
 20. He C, Xu Y, Sun J, Li L, Zhang JH, Wang Y (2023) Autophagy and apoptosis in acute brain injuries: From mechanism to treatment. *Antioxid Redox Signal* 38 (1–3): 234–257.
<https://doi.org/10.1089/ars.2021.0094>
 21. Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova DK, Ilyasov IO, Avrova NF (2023) Intranasal insulin decreases autophagic and apoptotic death of neurons in the rat hippocampal C1 region and frontal cortex under forebrain ischemia–reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 59 (1): 45–57.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010040>
 22. Dichter MA (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res* 149: 279–293.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90476-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90476-6)
 23. Mironova EV, Evstratova AA, Antonov SM (2007) A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J Neurosci Methods* 163 (1): 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.010>
 24. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Immunol Methods* 119 (2): 203–210.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9)
 25. Zakharova O, Sokolova TV, Bayunova LV, Vlasova YA, Rychkova MP, Avrova NF (2012) α -Tocopherol in nanomolar concentrations protects PC12 cells from hydrogen peroxide-induced death and modulates protein kinase activities. *Int J Mol Sci* 13: 11543–11668.
<https://doi.org/10.3390/ijms130911543>
 26. Zakharova IO, Sokolova TV, Zorina II, Bayunova LV, Rychkova MP, Avrova NF (2018) Protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on modulation of protein kinase B (Akt) activity. *J Evol Biochem Physiol* 54 (3): 192–205.
<https://doi.org/10.134/S0022093018030043>
 27. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X (2014) N-acetylserotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci* 34: 2967–2978.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1948-13.2014>
 28. Li X, Wang M, Qin C, Fan WH, Tian DS, Liu JL (2017) Fingolimod suppresses neuronal autophagy through the mTOR/p70S6K pathway and alleviates ischemic brain damage in mice. *PLoS One* 12: e0188748.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188748>
 29. Moller AB, Voss TS, Vendelbo MH, Pedersen SB, Moller N, Jessen N (2018) Insulin inhibits autophagy signaling independent of counter-regulatory hormone levels, but does not affect the effects of exercise. *J Appl Physiol* 125: 1204–1209.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00490.2018>

30. *Ribeiro M, Lopes de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Carames B* (2016) Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* 24 (4): 731–739.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.017>
31. *Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW* (2001) Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 276 (35): 32814–32821.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M104738200>
32. *Yu XR, Jia GR, Gao GD, Wang SH, Han Y, Cao W.* (2006) Neuroprotection of insulin against oxidative stress-induced apoptosis in cultured retinal neurons: involvement of phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38 (4): 241–248.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00152.x>
33. *Liu Q, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y* (2023) Insulin ameliorates dim blue light at night-induced apoptosis in hippocampal neurons via the IR/IRS1/AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 250: 114488.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114488>
34. *Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foufelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck B.J, Kahn BB* (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569–574.
<https://doi.org/10.1038/nature02440>
35. *Valentine RJ, Coughlan KA, Ruderman NB, Saha AK* (2014) Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 562: 62–69.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.013>
36. *Zakharova IO, Sokolova TV, Bayunova LV, Zorina II, Rychkova MP, Shpakov AO, Avrova NF* (2019) The protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on the modulation of Akt, GSK-3 β , ERK1/2, and AMPK Activities. *Int J Mol Sci* 20 (15): 3702.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153702>
37. *Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasinelli C, Thiemermann C, Boccuzzi G, Fantozzi R* (2009) Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3 β . *Diabetes* 58 (1): 235–242.
<https://doi.org/10.2337/db08-0691>
38. *Kim B, Sullivan KA, Backus C, Feldman EL* (2011) Cortical neurons develop insulin resistance and blunted Akt signaling. A potential mechanism contributing to enhanced ischemic injury in diabetes. *Antioxid Redox Sign* 14: 1829–1839.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.381632>
39. *Duarte AI, Santos P, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC* (2008) Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 signaling pathways and changes in protein expression. *Biochim Biophys Acta* 1783: 994–1002.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.016>

THE INHIBITION OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS BY INSULIN AS A BASIS OF ITS NEUROPROTECTIVE ACTION ON RAT BRAIN CORTICAL NEURONS UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS IN VITRO

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

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: avrova@iephb.ru*

Insulin is one of the most promising neuroprotectors. A significant gap in understanding the mechanism of its action is the lack of data on whether it is able to prevent autophagic neuronal death. The aim of our work was to evaluate the contribution of autophagy and apoptosis to the death of rat cerebral cortex neurons in culture under oxidative stress and to study the ability of insulin to prevent this death and inhibit autophagy and apoptosis in neurons. The influence of hydrogen peroxide and insulin on the level of two main autophagy markers (LC3B-II and SQSTM1/p62) and apoptosis marker (cleaved caspase-3) was studied. To assess the viability of neurons, the MTT test was used, and Western blotting was applied to measure the level of marker proteins. It was found that oxidative stress caused the activation of autophagy and apoptosis in neurons. This is manifested in a significant increase of the autophagy marker LC3B-II and apoptosis marker (cleaved caspase-3) and in a decrease in the SQSTM1/p62 protein level. The content of SQSTM1/p62, which is involved in the formation of autophagosomes, decreases with the activation of autophagy, as this protein is degraded in lysosomes. Hydrogen peroxide causes autophagic and apoptotic death of neurons, as the inhibitors of autophagy (3-methyl adenine) and apoptosis (z-DEVD-FMK) were shown to increase the viability of neurons in conditions of oxidative stress. Insulin, in its turn, prevents the death of neurons and hinders autophagy, causing a decrease of the level of lipidated form LC3B-II and the increase of the SQSTM1/p62 protein level, it hinders apoptosis as well decreasing the level of cleaved caspase-3. The protective effect of insulin is mediated by the activation of specific signaling pathways associated with receptors of insulin and IGF-1, as the inhibitor of these receptors BMS-754807 completely blocks the neuroprotective effect of insulin. Thus, the pronounced activation of autophagy under oxidative stress is one of the causes of neuron death, and the protection of neurons by insulin is associated with the suppression of not only apoptotic, but also autophagic cell death.

Keywords: brain cortical neurons, oxidative stress, insulin, autophagy, apoptosis