

## ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И ГАНГЛИОЗИДОВ НА ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ СИГНАЛИНГ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

© 2022 г. И. О. Захарова<sup>1,\*</sup>, Л. В. Баюнова<sup>1</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>,  
И. О. Илясов<sup>1</sup>, И. Ю. Морина<sup>1</sup>, А. О. Шпаков<sup>1</sup>, Н. Ф. Аврова<sup>1</sup>

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

\*e-mail: zakhar@iephb.ru

Поступила в редакцию 09.08.2022 г.

После доработки 15.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

Инсулиновая сигнальная система в гипоталамических нейронах играет важную роль в центральной регуляции метаболизма глюкозы, пищевого поведения и чувствительности тканей к инсулину. Снижение содержания инсулина в мозге при метаболических расстройствах, в том числе при диабете, является причиной низкой активности ключевых протеинкиназ, регулируемых через инсулиновую систему. Недостаток гормона в мозге может быть компенсирован за счет интраназально вводимого инсулина, который доставляется непосредственно в мозг. Его эффективность может быть повышена посредством совместного использования с веществами, усиливающими действие инсулина в мозге, к числу которых принадлежат сложные гликофинголипиды ганглиозиды. Целью работы было изучить влияние раздельного и совместного интраназального введения инсулина (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ганглиозидов (6 мг/кг/сутки) крысам линии Wistar с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа (СД2) на активность ключевых компонентов инсулинового сигналинга (Akt, GSK-3 $\beta$ , ERK1/2, p70S6K и AMPK) в гипоталамусе, а также на экспрессию генов (*GLUT2*, *FASN*, *PCK*, *G6PC* и *FBP*), ответственных за метаболизм глюкозы в печени. Впервые установлено, что совместные интраназальные введения инсулина и ганглиозидов крысам с СД2 приводят к восстановлению толерантности к глюкозе, улучшению чувствительности тканей к инсулину, усилению обменных процессов и подавлению глюконеогенеза в гепатоцитах печени. Это происходит во многом благодаря центральному синхронизированному влиянию инсулина и ганглиозидов на функциональную активность ключевых белков инсулинового сигналинга (GSK3 $\beta$ , p70S6K, ERK1/2, AMPK) в гипоталамусе, а также вследствие восстановления экспрессии BDNF и снижения мРНК воспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в гипоталамических нейронах. Таким образом, совместное интраназальное введение инсулина и ганглиозидов крысам с СД2 в значительной степени восстанавливает у них инсулиновый сигналинг в гипоталамусе и контроль глюконеогенеза в печени, нарушенные в условиях диабетической патологии.

**Ключевые слова:** инсулин, ганглиозиды, интраназальное введение, гипоталамус, сигнальные пути, сахарный диабет 2-го типа

**DOI:** 10.31857/S0044452922060122

Островки поджелудочной железы (островки Лангерганса), играют важную роль в метаболизме углеводов, поскольку в ответ на повышение уровня глюкозы в крови в постпрандиальный период секретируют инсулин, что приводит к снижению концентрации глюкозы вследствие инсулин-индуцируемой ее утилизации периферическими тканями и подавления ее синтеза гепатоцитами [1]. В условиях недостатка питательных веществ и умеренно низкого уровня глюкозы в крови в клетках поджелудочной железы активированы пути, подавляющие выделение инсулина и предотвращающие на-

растание гипогликемии. Долгое время патогенез сахарного диабета связывали почти исключительно с нарушением синтеза и секреции инсулина, а также с развитием резистентности к инсулину периферических тканей, что и предопределяло возможные пути лечения этого заболевания [2]. Несмотря на то что ряд исследователей указывали на участие мозга в регуляции метаболизма глюкозы, но до недавнего времени мозг рассматривался как орган, выполняющий в регуляции глюкозного гомеостаза вспомогательную роль. И только в последние годы появилось достаточно доказательств

в пользу исключительной важности взаимодействия между различными отделами мозга и островками поджелудочной железы в регуляции эффективности поглощения глюкозы периферическими органами и тканями [3–5]. Это во многом обусловлено тем, что мозг является одной из ключевых мишеней инсулина, поскольку этот гормон проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер посредством рецептор-опосредованного транспорта и в дальнейшем воздействует на его структуры [6–8]. Определяющую роль в этом процессе играют специализированные клетки танициты, выстилающие дно третьего желудочка [9]. Кроме того, во всех структурах мозга имеются все основные компоненты инсулинового сигналинга, включая инсулиновые рецепторы, белки-субстраты инсулинового рецептора (IRS) и нижележащие эффекторные звенья, включая фосфатидилинозитол-3-киназу, Akt-киназу, протеинфосфотирозинфосфатазу 1В (PTP1B), компоненты каскада митогенактивируемых протеинкиназ. Инсулиновые рецепторы присутствуют во всех отделах мозга, но наиболее высокий уровень их экспрессии выявлен в гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, коре и мозжечке [10–12]. Именно в этих структурах мозга профиль экспрессии генов инсулинового рецептора в наибольшей мере меняется при повышении уровня инсулина в кровотоке [13]. Для мышей, нокаутных по инсулиновому рецептору в мозге, характерны ожирение, дислипидемия, инсулиновая резистентность на фоне высокого содержания инсулина в крови, что свидетельствует о важности инсулиновой сигнальной системы мозга в регуляции обмена веществ [14]. В гипоталамусе наибольшее значение для поддержания гомеостаза глюкозы имеют нейроны аркуатного, вентромедиального и паравентрикулярного ядер, поскольку при инъекциях инсулина или глюкозы в данные области наблюдается одновременное снижение содержания глюкозы в крови и повышение чувствительности гепатоцитов к инсулину [15, 16]. Напротив, подавление экспрессии инсулинового рецептора в гипоталамических нейронах вызывает нарушение толерантности к глюкозе [17].

У людей без признаков гиперинсулинемии и инсулиновой резистентности содержание инсулина в спинномозговой жидкости (СМЖ) положительно коррелирует с уровнем инсулина в крови [18]. Однако при метаболических расстройствах, сопровождающихся ожирением и гиперинсулинемией, отношение уровней инсулина в СМЖ и в крови существенно снижается, причем это определяется выраженностью метаболических нарушений и связано с ослаблением рецептор-опосредованного транспорта гормона из крови в мозг вследствие развития инсулиновой резистентности [19–22]. Показано, что следствием сниженного содержания гормона в гипоталамусе является низкая ак-

тивность эффекторных протеинкиназ, как это продемонстрировано у животных с ожирением, вызванным высокожировой диетой (ВЖД), а также с экспериментальными моделями сахарного диабета 2-го типа (СД2) [23–26]. Недостаток инсулина в мозге, вызывающий нарушения в работе ключевых сигнальных систем, может быть компенсирован за счет интраназальных введений гормона, обеспечивающих его доставку непосредственно в мозг, в том числе к гипоталамическим нейронам, которые имеют высокую плотность инсулиновых рецепторов [27]. Длительные интраназальные введения инсулина (ИВИ) способствуют частичной нормализации метаболических показателей и восстановлению функциональной активности сигнальных систем как в мозге, так и на периферии при сахарном диабете и метаболическом синдроме [28, 29]. Эндогенный синтез глюкозы в печени и, как следствие, ее концентрация в крови, также снижаются после интраназального введения инсулина здоровым людям [30]. Однако этот эффект ослабевает при метаболических расстройствах, в том числе при сильно выраженном ожирении, что связывают с метаболическими и гормональными нарушениями [31]. Определенную роль в этом играет развитие центральной инсулиновой резистентности, ослабляющей эффекты ИВИ на структуры мозга, ответственные на контроль глюконеогенеза, и периферической инсулиновой резистентности, препятствующей влиянию циркулирующего в крови инсулина на продукцию глюкозы гепатоцитами. Перспективным подходом для усиления восстанавливающего эффекта ИВИ на синтез глюкозы гепатоцитами может быть повышение чувствительности мозга и периферических тканей к инсулину с помощью метформина, тиазолидиндионов (более известных как глитазоны), миметиков глюкагоноподобного пептида-1, ингибиторов PTP1B [32, 33]. Однако применение этих препаратов требует системного введения и не гарантирует улучшения действия ИВИ в центральной нервной системе (ЦНС).

Ранее нами было впервые показано, что сложные гликофинголипиды ганглиозиды, выделенные из мозга теленка, способны увеличивать регуляторные эффекты ИВИ при их совместном введении крысам с экспериментальным диабетом [34]. Эндогенные ганглиозиды являются важнейшими функциональными компонентами плазматических мембран нервных клеток у позвоночных и вовлечены в регуляцию процессов роста, дифференцировки, межклеточного взаимодействия, синаптогенеза и нейротрансмиссии [35, 36]. Они обладают нейротрофическими и нейротрофическими свойствами, что позволяет использовать их для лечения нейродегенеративных заболеваний [37]. Ганглиозиды участвуют и в регуляции энергетического обмена, что обусловлено их взаимодей-

ствием с лептиновыми и инсулиновыми рецепторами в гипоталамических нейронах [38]. Поскольку гликофинголипиды хорошо растворимы в воде и не вызывают раздражения слизистой оболочки носа, то интраназальные введения ганглиозидов (ИВГ) также могут быть использованы для их доставки в мозг, хотя ранее такой способ введения этих соединений не использовался. В этой связи следует отметить, что в случае инсулина его интраназальное введение является наиболее адекватным и легко воспроизводимым способом его доставки в мозг по сравнению с системным или интрацеребровентрикулярным введениями. Внедрение ИВИ и ИВГ, в том числе при совместном их применении, открывает возможности для изучения исключительно центральных эффектов используемых соединений и возможных механизмов их функционального взаимодействия на уровне ЦНС.

Цель наших исследований состояла в изучении отдельного и совместного влияния интраназальных введений инсулина и ганглиозидов крысам линии Wistar с экспериментальным СД2 на активность ключевых компонентов инсулинового сигналинга в гипоталамусе, а также на экспрессию генов, ответственных за метаболизм глюкозы в печени животных.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Подготовка препаратов для интраназальных инъекций.** Метод Фолча использовался для экстракции суммарных ганглиозидов из мозга телят по протоколу, подробно описанному нами ранее [39]. Полученный препарат суммарных ганглиозидов дополнительно очищали на колонке Sephadex G-25 “Fine” (“Pharmacia”, Швеция) [40]. Количество ганглиозидов оценивали по продуктам реакции силовых кислот с резорциновым реагентом. Для интраназальных введений инсулин (#15500, “Sigma”, США) растворяли в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5) до концентрации 0.5 МЕ/20 мкл, а ганглиозиды разводили в физиологическом растворе до концентрации 1 мг/10 мкл. Совместное интраназальное введение инсулина и ганглиозидов проводили с интервалом 10 мин.

**Экспериментальная модель диабета.** Для моделирования СД2 использовали самцов крыс Wistar, возраст которых на начало эксперимента составил 2 мес. СД2 индуцировали с помощью ВЖД, состав которой описан нами ранее [41], и однократной инъекции низкой дозы токсина стрептозотоцина (СТЗ) (20 мг/кг), который вводили в/б в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5) через 11 нед после начала ВЖД. В среднем СД2 развивался у 60–80% животных, вследствие чего на начальном этапе количество животных брали с необходимым запасом. Так, изначально для индукции СД2 были взяты 54 крысы, из которых для дальнейших экспери-

ментов на основании результатов орального глюкозотолерантного теста (оГТТ) были отобраны 36 животных. оГТТ проводили через 4 нед после введения СТЗ, и отбирали животных с нарушенной толерантностью к глюкозе, характеризуя ее как среднетяжелую форму СД2 (уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки не менее 8 мМ). Животные контрольных групп получали стандартный корм и однократную инъекцию 0.1 М натрий-цитратного буфера (рН 4.5) вместо СТЗ. Из пула крыс с подтвержденным развившимся СД2 рандомно формировали 4 диабетические группы по 9 животных в каждой. В течение последующих четырех недель проводили ежедневные интраназальные введения следующих препаратов: Группа 1 (Контроль, группа К) – физиологический раствор (интраназально), Группа 2 (Контроль + ИВГ + ИВИ, группа КГИ) – ганглиозиды (6 мг/кг/сутки, интраназально) и инсулин (0.5 МЕ/крысу/сутки, интраназально), Группа 3 (Диабет, Д) – физиологический раствор (интраназально), Группа 4 (Диабет + ИВИ, ДИ) – инсулин (0.5 МЕ/крысу/сутки, интраназально), Группа 5 (Диабет + ИВГ, ДГ) – ганглиозиды (6 мг/кг/сутки, интраназально), Группа 6 (Диабет + ИВГ + ИВИ, ДГИ) – ганглиозиды (6 мг/кг/сутки, интраназально) и инсулин (0.5 МЕ/крысу/сутки, интраназально). По истечении четырехнедельного лечения крыс наркотизировали с помощью хлоралгидрата (400 мг/кг, “Sigma”, США), проводили декапитацию, оценивали массу абдоминального и эпидидимального жира. Образцы цельного гипоталамуса без разделения на ядра и печени замораживали на сухом льду сразу же после извлечения и хранили в холодильной камере при –80°C для последующей оценки в них содержания исследуемых белков и их фосфорилированных форм методом Вестерн-блоттинга и изучения экспрессии целевых генов методом ПЦР в реальном времени.

**Оральный глюкозотолерантный тест.** За два дня до окончания лечения посредством ИВИ и ИВГ чувствительность к глюкозе оценивали с помощью оГТТ, для чего крысам перорально через зонд вводили глюкозу (2 г/кг), уровень которой в крови измеряли до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки глюкозой с помощью глюкометра и тест-полосок “One Touch Ultra” (США).

**Иммуноферментный анализ.** Уровень инсулина в плазме крови крыс оценивали до и через 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки, используя набор “Rat Insulin ELISA kit” (“Mercodia”, Швеция) в соответствии с инструкцией производителя. Объем забираемой из хвостовой вены крови для определения инсулина в каждой точке составил 100 мкл, для определения уровня гормона с помощью ИФА на каждую пробу использовали по 10 мкл полученной плазмы. Расчет индекса инсулиновой резистентности (homeostatic model assess-

ment of insulin resistance, НОМА-IR)) производился по формуле: НОМА-IR = уровень глюкозы натощак (мМ) × уровень инсулина натощак (нг/мл).

**Вестерн-блоттинг.** Образцы тканей гомогенизировали в соотношении 1:20 в лизисном буфере, состоящем из 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мМ EGTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% дезоксихолата натрия, 10 мМ пиродифосфата натрия, 15 мМ NaF, 10 мМ глицерофосфата натрия, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF), 0.02% NaN<sub>3</sub> и протеазного ингибиторного коктейля (“Roche”, США). Неразрушенные клетки и крупные клеточные фрагменты осаждали центрифугированием 500 g × 10 мин (4°C). Концентрацию белка в пробах измеряли по модифицированному методу Лоури. Для вертикального электрофореза в камерах “Mini-Protean” (“Bio-Rad”, США) на 9–14% акриламидные гели загружали пробы, содержащие 25–30 мкг белка. В качестве стандарта молекулярного веса использовали окрашенные маркеры “Spectra Multicolour Broad Range Protein Ladder (10–260 kDa)” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкМ, “Amersham”, Великобритания) методом мокрого переноса осуществлялся в минитрансблоттере (“Bio-Rad”, США) в буфере, содержащем 25 мМ Tris, 192 мМ глицин и 20% (v/v) этанола, при постоянном напряжении 100 В. Для блокировки неспецифического связывания мембраны инкубировались 30 мин при комнатной температуре в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 5% обезжиренного молока (“Europek”, Россия), 0.1% Tween 20. Для взаимодействия перенесенных белков с растворами первичных антител мембраны оставляли при +4°C на шейкере MR-1 (“Biosan”, Латвия) на 12–14 ч. Первичные антитела разводили в 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 5% БСА-фракция V (“Amresco”, США), 0.1% Tween 20 в соотношении (1: 1000). Антитела для ph-Akt(Ser<sup>473</sup>) (#4058), Akt (#9272), ph-AMPKα(Thr<sup>172</sup>) (#2535), AMPKα (#2793), ph-GSK3β(Ser<sup>9</sup>) (#9322), GSK3β (#9315), ph-p70S6K(Thr<sup>389</sup>) (#9205), p70S6K (#9202), total ERK1/2 (#9102) были приобретены у компании “Cell Signaling Technology” (США), anti-ph-ERK1(pThr<sup>202</sup>/pTyr<sup>204</sup>)&ERK2(pThr<sup>186</sup>/pTyr<sup>187</sup>) (#E7028) – у компании “Sigma” (США), SOCS3 (#ab16030) – у компании “Abcam” (Великобритания), РТР1В (#610139) – у компании “BD Transduction Laboratories” (США), GFAP (#NBP1-05197), GAPDH (#NB600-502) – у компании “Novus Biologicals” (США). После 3-х кратной промывки буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, мембраны обрабатывали раствором вторичных антител, приготовленным на 5% обезжиренном молоке в том же буфере, и проводили одночасовую инкубацию при комнатной темпера-

туре. В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи (#7074) или анти-мышинные (#7076) IgG (“Cell Signaling Technology”, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), либо биотинилированные IgG(H+L) (#14708) и (#14709). Сигнал HRP усиливали коммерческим ECL (“Novex”, США) или аналогом ECL, приготовленным в лабораторных условиях (люминол – пара-кумаровая кислота – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Хемилюминесцентное свечение фиксировали на голубой фотопленке “Phenix” (“Research Products”, США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга инкубировали с антителами к внутреннему стандарту GAPDH. Проявленные фотопленки визуализировали на сканере “Canon” (“CanoScan 8800F”, США). Денситометрическая обработка данных проводилась с помощью программы Bio7.

**ПЦР в реальном времени.** Тотальную РНК экстрагировали реактивом “RNA Extract” (“Евроген”, Россия). Кодировочную ДНК синтезировали с помощью набора “MMLV RT Kit” того же производителя. Амплификацию проводили в смеси, содержащей 10 нг обратно транскрибированного продукта, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, реакционную смесь набора “qPCRmix-HS SYBR+LowROX” (“Евроген”, Россия) с использованием прибора “500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Экспрессию генов, кодирующих инсулиновый рецептор (InsR), G-6-Pase catalytic subunit 1 (G6pc1), PEPCK1, Fbp1, fatty acid synthase (FASN), Glut2(Slc2a2), Il-1β, Actb и 18S, определяли с помощью следующих праймеров: *InsR* – CTG-GAGAAGTCTCGGTCATT (For) и GGC-CATAGACACGGAAAAGAAG (Rev), *G6pc* – GAAGGCCAAGAGATGGTGTGA (For) и TG-CAGCTCTTGCGGTACATG (Rev), *Pck1* – CCCAGGAAGTGAGGAAGTTTGT (For) и GGAG-CCGTCGCAGATGTG (Rev), *Fbp1* – CCATCATA-ATAGAGCCCGAGAAGA (For) и CTTTCTC-CGAAGCCTCATTAGC (Rev), *FASN* – GCATTC-CACAACCCCAACC (For) и AACGAGTTGATGCCACGAT (Rev), *Glut2* – GTTTTCTGCAGAGCCAAGTCC (For) и GTCCTATGCAGCACCCTGA (Rev), *IL1β* – GACTTCACCATGGAACCCCGT (For) и GGAGACTGCCCATTTCTCGAC (Rev), *Actb* – GC-GAGTACAACCTTCTTGAG (For) и CTGAC-CCATACCCACCATCAC (Rev), *18S* – CTG-GAGAAGTCTCGGTCATT (For) и GGC-CATAGACACGGAAAAGAAG (Rev). Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения 7500 Software v 2.0.6. и ExpressionSuite Software v1.0.3. Для нормализации данных использовали показатель ΔCt, равный разности среднего геометрического Ct референсных генов (18S и актина В) и значения Ct для исследуемого транскрипта. Для оценки степени экспрессии изучаемых генов проводили сравнение с контрольными

образцами путем вычисления значения  $\Delta\Delta\text{St}$ , равного разности  $\Delta\text{St}$  контроля из  $\Delta\text{St}$  образца.

**Иммуногистохимия.** Для иммуногистохимических исследований мозг фиксировали 6 дней в 4%-ном растворе пара-формальдегида в 0.2 М  $\text{Na}^+$ -фосфатном буфере (4°C), промывали с помощью 0.02 М фосфатного буфера, содержащего 0.9% NaCl (PBS, pH 7.4), и после 7-дневной криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, растворенной в PBS, замораживали. Из области гипоталамуса получали чередующиеся серии фронтальных срезов (16 мкм) с помощью криостата ("Leika", Германия). Каждый десятый срез монтировали на стекла "SuperFrost/plus" ("Menzel", Германия). Для иммуногистохимических исследований отбирали срезы, включающие вентромедиальное ядро гипоталамуса. Стекла кипятили 5 мин в цитратном буфере (pH 6.0) для демаскировки антигена, промывали в PBS, в целях блокировки эндогенной пероксидазы в течение 30 мин обрабатывали 0.3%-ным раствором перекиси водорода, разведенной в PBS. После промывки в PBS, содержащем 0.1% Triton X-100 (PBST), срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в блокирующем растворе (2% сыворотки быка и 2% сыворотки козы в PBST) для предотвращения неспецифического связывания. Затем срезы инкубировали 12 ч при комнатной температуре с первичными антителами анти-BDNF (#DF6387, "Affinity Biosciences") в разведении 1:100. После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами козы против кролика, конъюгированными с биотином ("VectorLabs", Великобритания), разведенные 1:600 в PBST. Стекла тщательно промывали и наносили комплекс стрептовидин-пероксидаза ("Sigma", США) в разведении 1:700 в PBS. Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина ("Sigma", США) и 0.015%-ного раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали. Изображения получали с помощью микроскопа "Carl Zeiss Axio A1" ("Zeiss", Германия) со встроенной телевизионной камерой "AxioCam 712 color" ("Zeiss", Германия) и программы ZEN 3.4 (Zen pro). С помощью программы Image J (США) измеряли оптическую плотность иммунопозитивных структур и представляли в условных единицах.

**Статистическая обработка.** Полученные данные анализировали в программе "Prism". Данные представляли как среднее значение  $\pm$  SEM. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Продолжительная ВЖД в совокупности с однократной инъекцией низкой дозы СТЗ (20 мг/кг, в/б) приводила к нарушению метаболических показателей у крыс. Спустя 5 мес после перевода на ВЖД у животных диабетической группы (Д) наблюдали повышенное содержание глюкозы и инсулина в крови натощак, а также после нагрузки глюкозой (табл. 1), что является проявлением нарушенной толерантности к глюкозе и инсулиновой резистентности (ИР). Наиболее распространенный метод оценки резистентности к инсулину, состоящий в расчете индекса ИР, как произведения базальных (натощак) уровней глюкозы и инсулина, показал, что у диабетических животных индекс ИР возрастает до  $4.22 \pm 0.20$  отн.ед. ( $p < 0.001$ ) по сравнению с  $2.50 \pm 0.19$  отн.ед. у контрольных крыс. Гипергликемия, гиперинсулинемия и дислипидемия были ассоциированы с увеличением массы тела и жировой ткани у диабетических крыс. Хотя повышение массы тела в группе Д в сравнении с контролем составило 11%, но различия были статистически значимыми ( $p < 0.05$ ). Различия в массе жировой ткани были выше. В группе Д масса эпидидимального жира была выше на 78% ( $p < 0.001$ ), а абдоминального жира – на 72% ( $p < 0.001$ ) (табл. 1).

Для коррекции метаболических нарушений и восстановления толерантности к глюкозе использовали интраназальные введения инсулина (ИВИ, 0.5 МЕ/крысу/сутки) и суммарных ганглиозидов мозга телят (ИВГ, 6 мг/крысу/сутки). Лечение диабетических крыс с помощью ИВИ и ИВГ проводили в течение 4 нед, начиная его через 4 мес после перевода животных на ВЖД. В результате масса тела у диабетических животных групп ДИ (диабет + ИВИ), ДГ (диабет + ИВГ) и ДГИ (диабет + ИВГ + ИВИ) достоверно не отличалась от крыс контрольной группы (К), но и различия с диабетической группой без лечения также не были статистически значимыми. Инсулин при действии на гипоталамические структуры мозга способен оказывать анорексигенный эффект, тогда как ганглиозиды, модулирующие активность инсулиновых и лептиновых сигнальных путей, могли бы этот эффект усилить. В ходе проведенных исследований было установлено, что только в группе ДГ содержание жира снижалось на 45% по сравнению с нелеченой диабетической группой ( $p < 0.05$  по сравнению с группой Д). В наибольшей степени в группе ДГ снижалось содержание эпидидимального жира (на 58%,  $p < 0.01$  по сравнению с группой Д), в то время как содержание абдоминального жира только на 33% ( $p > 0.05$ ). Введение ИВИ приводило к достоверному снижению количества эпидидимального жира по сравнению с группой Д ( $p < 0.05$ ). Установлено также, что при совместном

**Таблица 1.** Влияние интраназальных введений ганглиозидов (6 мг/кг/сутки) и инсулина (0.5 МЕ/крысу/сутки) на метаболические показатели у самцов крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина

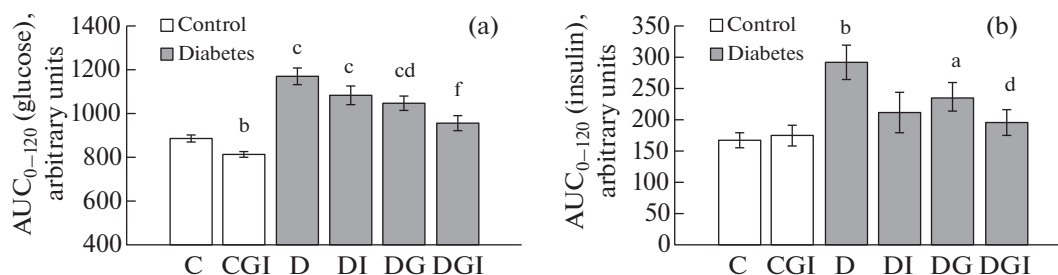
Показатель	К, <i>n</i> = 9	КГИ, <i>n</i> = 9	Д, <i>n</i> = 9	ДИ, <i>n</i> = 9	ДГ, <i>n</i> = 9	ДГИ, <i>n</i> = 9
Масса тела, г	385.3 ± 14.8	382.2 ± 12.2	427.4 ± 9.6*	416.8 ± 15.9	400.5 ± 14.3	411.7 ± 8.3
Масса жира, г	11.01 ± 0.63	9.28 ± 1.32	19.31 ± 1.14***	16.31 ± 1.00**	14.29 ± 1.88#	16.69 ± 1.42**
Масса абдоминального жира, г	5.62 ± 0.54	4.44 ± 0.80	9.68 ± 0.72***	8.42 ± 0.58**	7.82 ± 1.14	8.66 ± 0.86**
Масса эпидидимального жира, г	5.39 ± 0.26	4.84 ± 0.54	9.63 ± 0.45***	7.88 ± 0.51** #	6.46 ± 0.83##	8.03 ± 0.65**
Глюкоза натощак, мМ	4.66 ± 0.13	5.43 ± 0.11**	5.59 ± 0.13***	4.92 ± 0.17#	5.42 ± 0.15**	5.12 ± 0.16##
Глюкоза (ГТТ, 120 мин), мМ <sup>а</sup>	6.40 ± 0.28	5.48 ± 0.28*	9.28 ± 0.36***	7.56 ± 0.40**	7.22 ± 0.32##	7.02 ± 0.17###
Инсулин натощак, нг/мл	0.56 ± 0.04	0.54 ± 0.05	0.76 ± 0.04**	0.57 ± 0.04#	0.67 ± 0.11	0.53 ± 0.05#
Инсулин (ГТТ, 120 мин), нг/мл <sup>а</sup>	1.01 ± 0.09	0.82 ± 0.09	2.38 ± 0.20***	1.41 ± 0.21##	1.71 ± 0.18** #	1.48 ± 0.21#
Индекс инсулинорезистентности (Homa-IR), отн.ед.	2.50 ± 0.19	2.92 ± 0.29	4.22 ± 0.20***	2.84 ± 0.28##	3.69 ± 0.70	2.78 ± 0.30##

*Примечание.* <sup>а</sup> – Уровни глюкозы и инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки при проведении оГТТ. Данные представлены как среднее ± SEM. Различия статистически значимы по сравнению с группой К при: \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ . Различия статистически значимы по сравнению с группой Д при: # –  $p < 0.05$ ; ## –  $p < 0.01$ ; ### –  $p < 0.001$ .

введении ИВИ и ИВГ эффекты препаратов на адипозность не усиливались (табл. 1). Таким образом, ИВИ и ИВГ восстанавливали обмен липидов, причем в большей степени в эпидидимальных адипоцитах в сравнении с адипоцитами абдоминального жира.

Введение инсулина как отдельно, так и совместно с ганглиозидами позволило значительно снизить ИР, что подтверждается расчетами индекса ИР (НОМА-IR). Благодаря лечению ИВИ и ИВГ как у контрольных крыс (КГИ), так и у диабетических (ДГ и ДГИ) повышалась скорость утилизации

глюкозы, на что указывают рассчитанные значения  $AUC_{0-120}$  (интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы (мМ)–время (мин)” для глюкозных кривых в интервале времени от 0 до 120 мин в оГТТ (рис. 1а). Эти данные свидетельствуют о повышении чувствительности тканей к инсулину. Это подтверждается снижением в сравнении с группой Д значений  $AUC_{0-120}$  (интегрированная площадь под кривой “концентрация инсулина (нг/мл) – время (мин)” во временном промежутке от 0 до 120 мин после глюкозной нагрузки (рис. 1б).



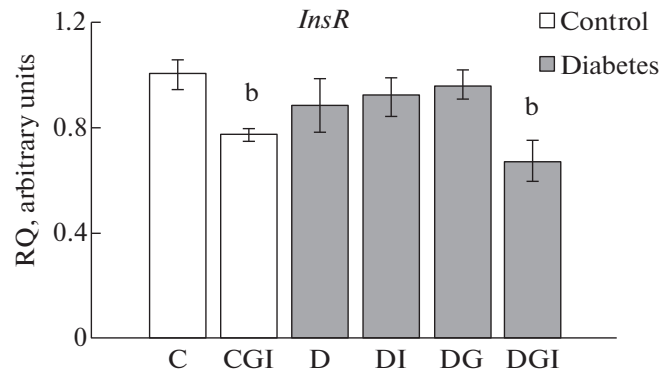
**Рис. 1.** Оценка влияния ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на чувствительность к глюкозе и инсулину у крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, при проведении орального глюкозотолерантного теста. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ).

(а) –  $AUC_{0-120}$ , интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы (мМ)–время (мин)” для глюкозных кривых в течение 120 мин после нагрузки глюкозой. Данные представлены как среднее ± SEM ( $n = 9$ ). (б) –  $AUC_{0-120}$ , интегрированная площадь под кривой “концентрация инсулина (нг/мл)–время (мин)” для инсулиновых концентрационных кривых в течение 120 мин после нагрузки глюкозой. Данные представлены как среднее ± SEM ( $n = 5$ ). Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: а –  $p < 0.05$ ; б –  $p < 0.01$ ; с –  $p < 0.001$ . Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) при: d –  $p < 0.05$ ; e –  $p < 0.01$ ; f –  $p < 0.001$ .

Эффективность инсулинового сигналинга в мозге зависит прежде всего от инсулиновых рецепторов как первичного звена, опосредующего действие гормона. В целях изучения влияния ИВИ и ИВГ на состояние этих рецепторов определяли экспрессию мРНК инсулинового рецептора (*InsR*) в гипоталамусе контрольных и диабетических групп. При отдельных ИВИ и ИВГ количество мРНК *InsR* в группах ДИ и ДГ не отличалось от группы К (рис. 2). После совместных ИВИ и ИВГ уровень экспрессии снижался как в контрольной группе КГИ до  $0.77 \pm 0.03$  отн.ед., так и в группе с СД2 (ДГИ) до  $0.67 \pm 0.08$  отн.ед. по сравнению с  $1.00 \pm 0.05$  в контрольной группе К ( $p < 0.01$ ). Таким образом, чувствительность тканей к инсулину не имеет прямой корреляции с экспрессией мРНК *InsR* в гипоталамусе крыс при совместных интраназальных введениях инсулина и ганглиозидов.

Поскольку длительность активации инсулиновых рецепторов и нижележащих сигнальных путей зависит от негативных регуляторов инсулинового сигналинга, в лизатах гипоталамуса было проведено измерение содержания белков РТР1В и супрессора цитокинового сигналинга SOCS3 для выявления влияния ИВИ и ИВГ на экспрессию этих белков в гипоталамусе крыс с СД2. При СД2 в гипоталамусе крыс количество иммунореактивного белка РТР1В не менялось в сравнении с контролем как у нелеченых животных, так и в условиях их лечения ИВИ и ИВГ (рис. 3а). В отличие от РТР1В экспрессия SOCS3, связанного в большей мере с лептиновой сигнальной системой, у диабетических крыс снижалась до следовых количеств ( $0.028 \pm 0.006$  отн.ед. в группе Д против  $0.499 \pm 0.151$  отн.ед. в контроле,  $p < 0.01$ ). При лечении ИВИ содержание SOCS3 возрастало, но различия с группой Д не были значимыми (рис. 3б). В то же время лечение ИВГ и комбинацией ИВГ+ИВИ содержание SOCS3 достигало контрольных значений и значимо отличалось от такового в группе Д ( $p < 0.001$ ). Следует отметить, выявленные изменения в экспрессии белка SOCS3 в гипоталамусе леченых ИВГ диабетических крыс могут быть компенсаторными, направленными на усиление инсулиновой сигнальной системы путем повышения активности лептиновой системы.

Для изучения влияния ИВИ и ИВГ на активность эффекторных протеинкиназ, связанных с инсулиновым рецептором, в гипоталамусе крыс с СД2 с помощью Вестерн-блоттинга определяли уровень фосфорилирования серин/треониновой протеинкиназы Akt. В активированной инсулином форме Akt-киназа фосфорилирована по остаткам Ser<sup>473</sup> (основной сайт фосфорилирования) и(или) Thr<sup>308</sup>. У животных с СД2 после введений ИВИ и ИВГ не было выявлено значимых различий в значениях фосфо-Akt(Ser<sup>473</sup>)/tAkt как по отношению к

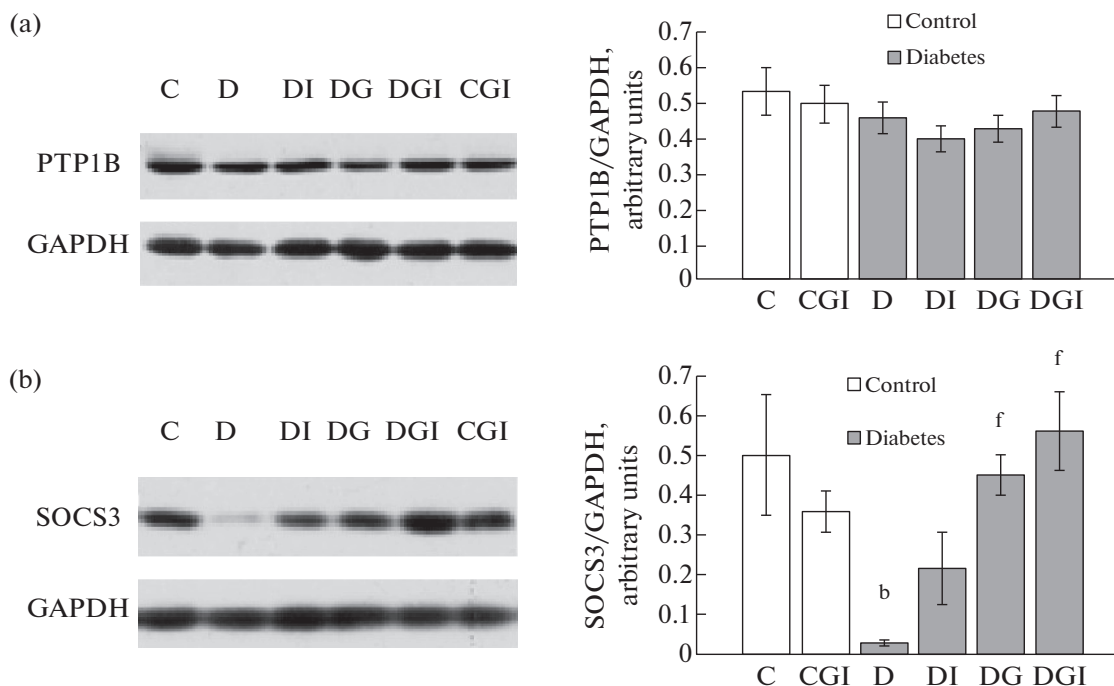


**Рис. 2.** Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на экспрессию гена инсулинового рецептора (*InsR*) в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Обозначения групп на графике: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). Уровень экспрессии гена *InsR* нормировали по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Различия статистически значимы: b –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем (С).

контрольной (К), так и к диабетической (Д) группам (рис. 4а).

Используемый для анализа лизат ткани представляет сложную смесь, состоящую из лизатов как нейронов, так и глиальных клеток. Инсулиновые рецепторы и функционально связанные с ними протеинкиназы локализованы также в астроцитах, которые, подобно нейронам, могут участвовать в центральной регуляции гомеостаза глюкозы. Основной маркерный белок астроцитов GFAP позволяет оценить их количество в общем лизате. На фоне СД2 в гипоталамусе экспрессия белка GFAP снижалась на 50% ( $p < 0.05$ ), тогда как при лечении ИВИ и ИВГ она восстанавливалась до контрольных значений (рис. 4б). Таким образом, нейронно-глиальные взаимодействия также меняются при СД2 и могут стать причиной нарушений центральной регуляции метаболизма глюкозы.

Akt-киназа фосфорилирует множество мишеней в клетке, среди которых киназа гликогенсинтазы-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). В отличие от печени, где GSK3 $\beta$  прежде всего влияет на депонирование глюкозы в виде гликогена, в мозге она участвует во множестве процессов. GSK3 $\beta$  является эффекторной протеинкиназой в патогенезе неврологических и психических нарушений, поскольку одной из ее мишеней является белок Тау, который она гиперфосфорилирует, вызывая накопление нейрофибрилярных клубков и усиливая, тем самым, продукцию провоспалительных цитокинов [42, 43]. Однако при СД2 в гипоталамусе нами не было



**Рис. 3.** Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на содержание белка PTP1B и SOCS3 в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотосина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). (а) – изменение экспрессии PTP1B, (б) – изменение экспрессии SOCS3. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: b –  $p < 0.01$ . Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (D) при: f –  $p < 0.001$ .

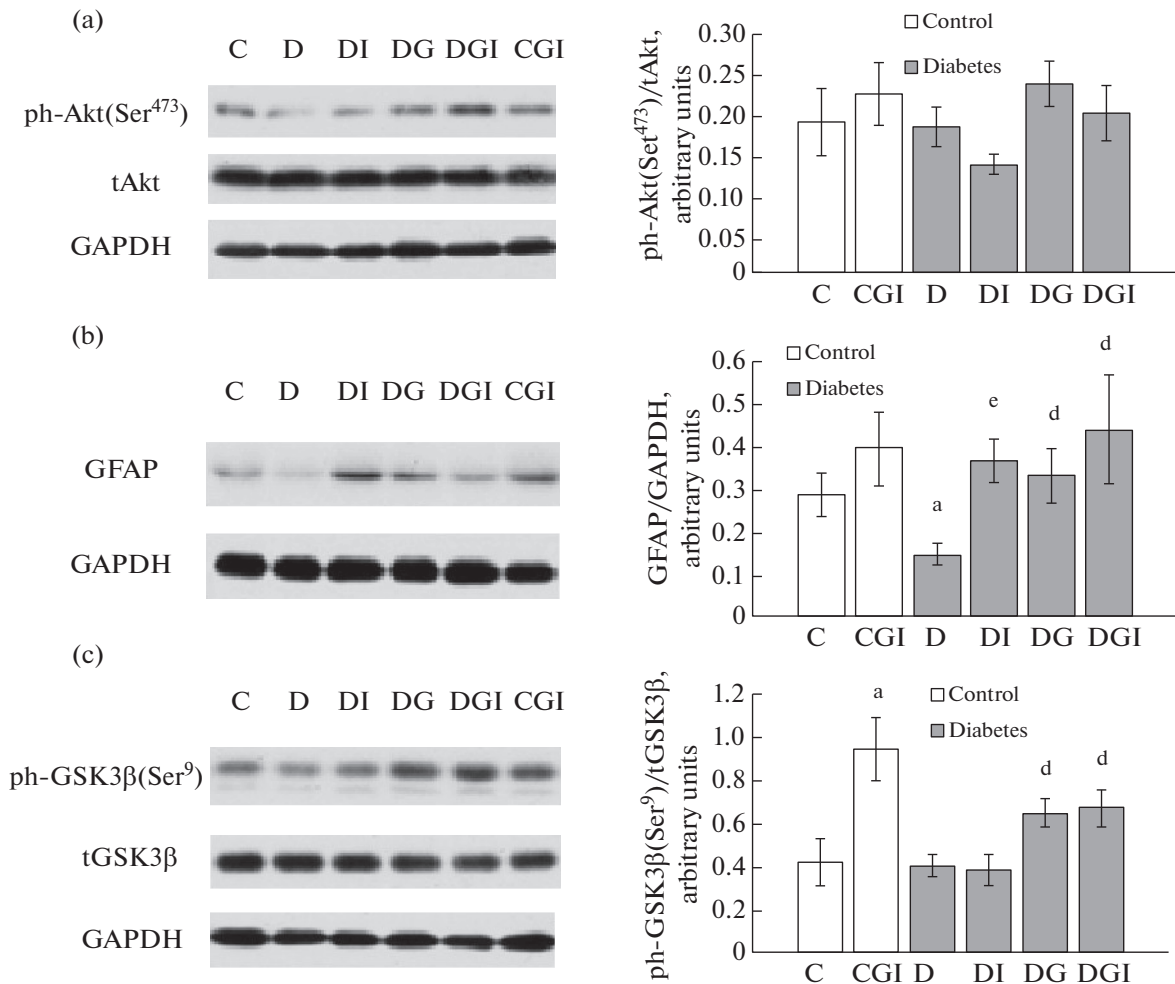
выявлено различий в количестве неактивной формы фермента – фосфо-GSK3 $\beta$ (Ser<sup>9</sup>) между группами К и Д (рис. 4с). Значительно менялся уровень фосфорилирования по Ser<sup>9</sup> лишь при введении ИВГ. При совместном введении ИВГ и ИВИ контрольным крысам количество фосфо-GSK3 $\beta$ (Ser<sup>9</sup>) увеличивалось в 2 раза по сравнению с интактным контролем ( $p < 0.05$ ). В диабетических группах ДГ и ДГИ оно повышалось в среднем на 60% по сравнению с группой Д ( $p < 0.05$ ). Интраназальное введение инсулина (ИВИ) диабетическим крысам существенно не влияло на фосфорилирование GSK3 $\beta$  по Ser<sup>9</sup> (рис. 4с).

Протеинкиназа p70S6K в комплексе с mTOR рассматривается в качестве интегрирующего звена, реагирующего на изменения содержания как гормональных факторов, так и глюкозы. Как было установлено, p70S6K, локализованная в проопиомеланокортин-экспрессирующих нейронах гипоталамуса, оказывает влияние на синтез глюкозы в печени, метаболизм липидов на периферии, модулирует возбудимость нейронов [44]. Анализ лизатов гипоталамуса в группе Д показал, что уровень фосфорилирования p70S6K по Thr<sup>389</sup> увеличивает-

ся в 2.3 раза по сравнению с контролем ( $p < 0.01$ ) (рис. 5а). Сходные изменения отмечали при совместных введениях инсулина и ганглиозидов контрольным (КГИ) и диабетическим крысам (ДГИ) ( $p < 0.01$ ). В группах ДИ и ДГ при отдельном введении препаратов отношение ph-p70S6K(Thr<sup>389</sup>)/p70S6K снижалось по сравнению с группой Д ( $p < 0.05$ ). Для групп ДИ и ДГ содержание фосфорилированной формы p70S6K не отличалось от контроля. Таким образом, СД2 влияет на активность p70S6K в гипоталамусе, причем ИВИ и ИВГ оказывают на этот фермент модулирующее воздействие.

Протеинкиназа ERK1/2, регулируемая внеклеточными сигналами, активируется инсулином и другими ростовыми факторами, что важно в периоды ремиссии при диабете [45]. В группе Д не было выявлено различий в степени фосфорилирования этого фермента в сравнении с контролем (рис. 5б). В то же время при введении ИВГ и комбинации ИВГ + ИВИ количество фосфорилированной формы ERK1/2 увеличивалось в среднем на 40%, хотя различия с группой Д не были значимыми. Активность АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), основного энергетического сенсора клетки, увеличивается при фосфорилировании





**Рис. 4.** Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на уровень фосфорилирования протеинкиназ Akt, GSK3 $\beta$  и экспрессию GFAP в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). (a) – фосфорилирование Akt-киназы по Ser<sup>473</sup>, (b) – экспрессия GFAP, (c) – фосфорилирование киназы GSK3 $\beta$  по Ser<sup>9</sup>. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: a –  $p < 0.05$ . Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) при: d –  $p < 0.05$ ; e –  $p < 0.01$ .

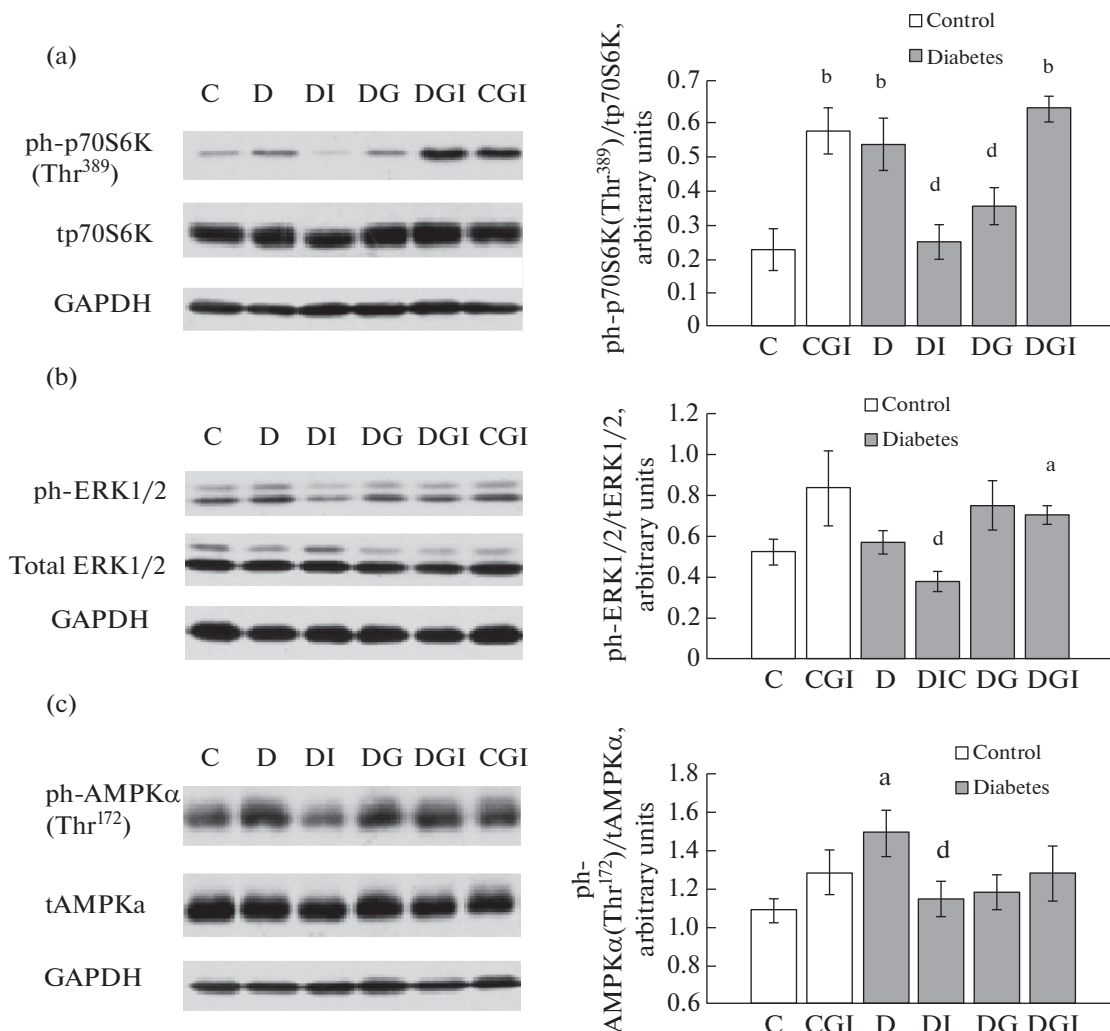
$\alpha$ -субъединицы по остатку Thr<sup>172</sup>. Показано, что в гипоталамусе крыс группы Д содержание фосфорной формы этого фермента было повышено ( $1.486 \pm 0.120$  в сравнении с контролем ( $1.083 \pm 0.065$  усл.ед.) ( $p < 0.05$ ) (рис. 5с). Хотя уровень фосфорилирования Thr<sup>172</sup> снижился при всех типах лечения, но значимыми различия были только после лечения ИВИ (рис. 5с).

Изменения активности ключевых протеинкиназ и экспрессии белков, связанных с инсулиновой сигнальной системой в гипоталамусе, взаимосвязаны с регуляцией метаболизма глюкозы на периферии, прежде всего в печени. Для изучения центрального влияния ИВИ и ИВГ на процессы обмена

на глюкозы в печени определяли экспрессию основного транспортера глюкозы *Glut2*, а также генов глюконеогенеза (*Pck1*, *G6pc*, *Fbp1*) и липогенеза (*Fasn*).

Хотя основной локализованный в печени транспортер глюкозы *Glut2* не является инсулин-зависимым, но при совместном введении ИВИ и ИВГ экспрессия гена *Glut2* в группе КГИ достоверно повышалась по сравнению с группой К и в группе ДГИ по сравнению с группой Д ( $p < 0.05$ ) (рис. 6а). Это может способствовать повышению эффективности утилизации глюкозы гепатоцитами печени.

В печени синтезируется 90% всей глюкозы, поступающей в кровоток. Нарушение центральной

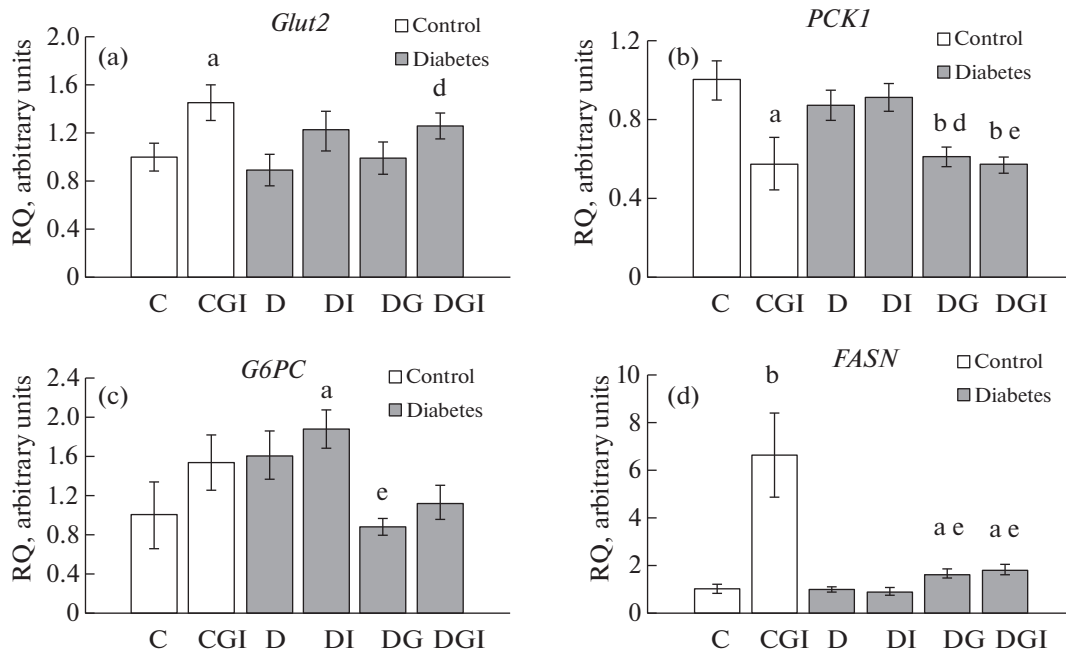


**Рис. 5.** Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на уровень фосфорилирования протеинкиназ p70S6K, ERK1/2 и AMPK в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). (а) – фосфорилирование p70S6K-киназы по Thr<sup>389</sup>, (б) – фосфорилирование ERK1/2 киназы по Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> и Thr<sup>186</sup>/Tyr<sup>187</sup>, (с) – фосфорилирование киназы AMPK по Thr<sup>172</sup>. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Различия значимы по сравнению с группой К при: а –  $p < 0.05$ ; б –  $p < 0.01$ . Различия значимы по сравнению с группой Д при: d –  $p < 0.05$ .

регуляция глюконеогенеза является одной из первопричин гипергликемии при СД2. Для оценки влияния ИВИ и ИВГ на глюконеогенез в печени оценивали уровень мРНК для ключевых ферментов глюконеогенеза: фосфоенолпируваткарбоксикиназы PEPCK (ген *PEPCK*), глюкозо-6-фосфатазы (*G6PC*) и фруктозо-бис-фосфатазы (*FBP*). Для PEPCK, катализирующего превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват, одну из начальных стадий синтеза глюкозы *de novo* из лактата и пирувата, не наблюдалось увеличения экспрессии в группе Д по сравнению с контролем. Тем не менее

монотерапия ИВГ и совместное использование ИВИ и ИВГ способствовали снижению содержания мРНК *PEPCK* по сравнению с группой Д с  $0.87 \pm 0.08$  отн.ед. до  $0.61 \pm 0.05$  отн.ед. в группе ДГ ( $p < 0.05$ ) и  $0.57 \pm 0.04$  отн.ед. в группе ДГИ ( $p < 0.01$ ) (рис. 6b). ИВИ и ИВГ также подавляли экспрессию *PEPCK* в группе КГИ ( $p < 0.05$ ). В случае фермента *FBP*, катализирующего отщепление фосфогруппы от фруктозо-1,6-бисфосфата, уровень мРНК гена *FBP* не менялся ни в одной из изученных групп. Для гена *G6PC*, кодирующего конечный фермент в цепи глюконеогенеза, содержание



**Рис. 6.** Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на экспрессию генов метаболизма глюкозы в печени крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ).

(a) – экспрессия гена транспортера глюкозы *Glut2*. (b) – экспрессия гена фосфоенолпируваткарбоксикиназы (*Pck1*). (c) – экспрессия гена субъединицы 1 глюкозо-6-фосфатазы (*G6pc*). (d) – экспрессия гена синтазы жирных кислот (*FASN*). Уровень экспрессии генов нормирован по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). Различия значимы по сравнению с группой К при: a –  $p < 0.05$ ; b –  $p < 0.01$ . Различия значимы по сравнению с группой Д при: d –  $p < 0.05$ ; e –  $p < 0.01$ .

мРНК уменьшалось у диабетических крыс после введения ИВГ и ИВИ+ИВГ, хотя по сравнению с группой Д различия были значимы только для группы ДГ (рис. 6с).

Депонирование глюкозы осуществляется за счет интенсивного синтеза гликогена и жирных кислот. В печени крыс группы КГИ отмечали значительный рост экспрессии синтазы жирных кислот *FASN*, что указывает на доминирование процесса липогенеза (рис. 6d). Следует отметить, что центральное влияние ганглиозидов по сравнению с инсулином является преобладающим, так как эффект, хоть и в меньшей мере, сохранялся при СД2 в группах ДГ и ДГИ (рис. 6d).

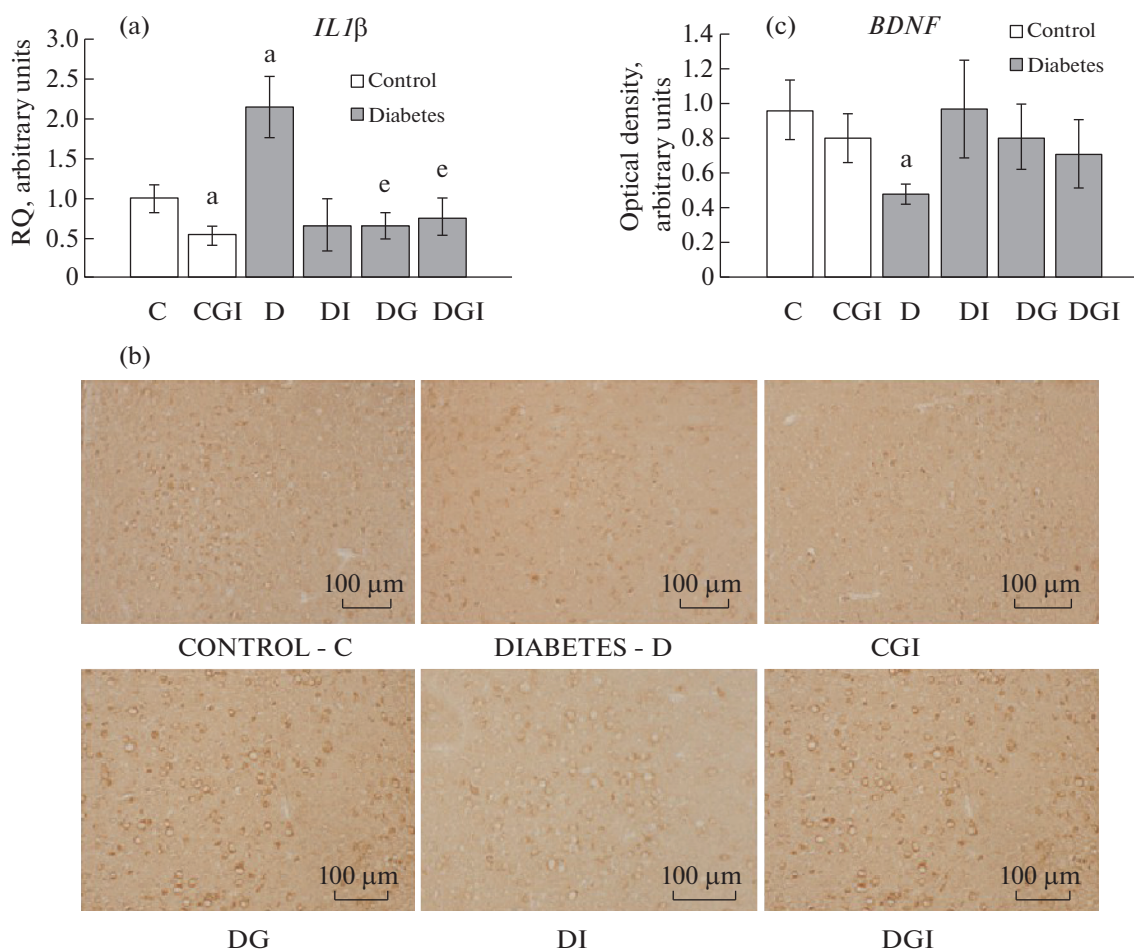
Толерантность к глюкозе нарушается также вследствие усиления воспалительных процессов в ЦНС. В гипоталамусе крыс с СД2 наблюдалось двукратное увеличение экспрессии мРНК провоспалительного цитокина *IL1 $\beta$*  ( $p < 0.05$ ), тогда как ганглиозиды при раздельном введении, а также в комплексе с инсулином полностью предотвращали его накопление (рис. 7а).

Совместное введение ИВГ и ИВИ значимо ( $p < 0.05$ ) снижало базальный уровень мРНК *IL1 $\beta$*

в гипоталамусе здоровых животных группы КГИ, что свидетельствует о возможности использования такой комбинации в качестве противовоспалительных препаратов при нейродегенеративных заболеваниях. Параллельно с воспалением снижался защитный потенциал ЦНС. С помощью иммуногистохимии было установлено, что в вентромедиальном ядре гипоталамуса оптическая плотность иммунопозитивных на важнейший трофический фактор BDNF структур при СД2 уменьшается в 2 раза – с  $0.96 \pm 0.17$  в контроле (К) до  $0.47 \pm 0.06$  при СД2 (Д) ( $p < 0.05$ ) (рис. 7b, 7c). ИВИ и ИВГ, подавляя воспалительные процессы в ЦНС при СД2, способствовали восстановлению количества BDNF до его уровня в контрольной группе.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наряду с инсулиновой системой мозга другие сигнальные системы, в том числе лептиновая, меланокортиновая, дофаминовая, серотониновая, играют ключевую роль в регуляции метаболизма глюкозы, пищевого поведения и энергетического обмена. Даже незначительный дисбаланс в их работе может стать причиной, приводящей к разви-



**Рис. 7.** Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на экспрессию цитокина IL1 $\beta$  и BDNF в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (C) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ).

(a) – экспрессия гена IL1 $\beta$  в гипоталамусе, определяемая по количеству мРНК с помощью ПЦР-РВ. Уровень экспрессии гена IL1 $\beta$  нормирован по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). (b) – экспрессия BDNF, выявляемая по иммуногистохимической реакции со специфическим антителом. (c) – количественная оценка экспрессии нейротрофического фактора BDNF. Различия значимы по сравнению с группой К при: а –  $p < 0.05$ . Различия значимы по сравнению с группой Д при: е –  $p < 0.01$ .

тию ожирения, метаболического синдрома и СД2 [22, 46–49]. Благодаря выявлению этого дисбаланса на ранних стадиях и его своевременной коррекции возможно предотвратить нарушения метаболизма в нервной, сердечно-сосудистой и других системах организма.

Лептин и активируемая им сигнальная система в мозге участвуют как в регуляции гомеостаза глюкозы, так и повышают чувствительность нейронов и периферических тканей к инсулину [50–52]. Введение лептина интрацеребровентрикулярно или непосредственно в гипоталамическую область приводит к нормализации уровня глюкозы в крови

животных с различными формами диабета [52–55], и это ассоциировано с активацией автономной нервной системы, иннервирующей печень [56]. Инсулин и лептин, как было показано, оказывают свое действие через одни и те же сигнальные пути в гипоталамических нейронах [47, 57, 58]. Развитие ИР в мозге связывают с увеличением экспрессии и активности фосфатазы РТР1В [59, 60]. Однако в настоящем исследовании нами не было выявлено значимых изменений в содержании РТР1В в гипоталамусе при СД2 (рис. 3а). Это может быть обусловлено снижением уровня инсулина в гипоталамусе и других отделах мозга, как показано нами ра-

нее в условиях ИР [22, 61]. Косвенно в пользу этого свидетельствует довольно неожиданное и сильно выраженное снижение в гипоталамусе диабетических крыс экспрессии белка SOCS3, негативного регулятора лептинового сигналинга (рис. 3б). Такое снижение может способствовать усилению лептиновой, а опосредованно и инсулиновой сигнальных систем в условиях дефицита инсулина и лептина в ЦНС. Эти результаты позволяют понять, почему при совместном использовании лептина и инсулина для нормализации уровня глюкозы у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, доза инсулина может быть значительно снижена по сравнению с пациентами, не получающими лептин [62].

Активность как лептиновой, так и инсулиновой сигнальных систем в нейронах гипоталамуса нередко модулируется одними и теми же факторами, к числу которых принадлежат и гликофинголипиды ганглиозиды. Они осуществляют свое действие через мембранные микродомены и липидные рафты, в которых локализованы рецепторы инсулина и лептина [38, 63, 64]. На основании этого мы предположили, что совместное интраназальное введение ганглиозидов и инсулина может способствовать улучшению инсулинового сигналинга при СД2, а также, с учетом взаимосвязи инсулиновых и лептиновых путей, повысить чувствительность гипоталамических нейронов к лептину.

Имеются многочисленные свидетельства, включая наши исследования, что ганглиозиды оказывают выраженное нейропротекторное действие на структуры мозга, что показано как на моделях *in vitro*, так и *in vivo* [36, 65–70]. Если *in vitro* ганглиозиды активны в широком диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ, то до настоящего времени *in vivo* животным вводят от 30 до 100 мг/кг/сутки внутримышечно, интраперитонеально или в виде подкожных инъекций, а также 5 мг/кг/сутки – интрацеребровентрикулярно [36]. Тем не менее, как было установлено, общее количество экзогенных ганглиозидов, проникающих в мозг, не превышает 1% и может достигать от 0.3 до 1 мг, что соответствует микромолярным концентрациям. Защитные свойства ганглиозидов, особенно *in vivo*, обусловлены их воздействием не только на нейроны, но и на клетки микроглии, что приводит к подавлению воспалительных процессов [71]. В пользу этого свидетельствует результат ИВГ, нормализующих повышенное при СД2 содержание мРНК для провоспалительного интерлейкина IL-1 $\beta$  в гипоталамусе (рис. 7а). Тем самым, апробированный нами интраназальный способ введения ганглиозидов показал свою эффективность при СД2, что обусловлено способностью ганглиозидов при такой разновидности доставки легко достигать различных структур мозга. На это указывают и результаты недавно проведенного исследования, авторы кото-

рого показали, что ежедневные интраназальные введения ганглиозидов GM1 мышам, нокаутным по GM2-синтазе, у которых отсутствует эндогенный GM1, в количестве 0.5 и 5 мг/кг/сутки приводят к его накоплению в коре, среднем мозге, обонятельных луковицах, субвентрикулярной зоне, гиппокампе и мозжечке, хотя и не достигают уровня экспрессии, характерного для нормальных животных [72]. Способность ганглиозидов эффективно проникать в мозг при интраназальном способе введения обуславливает и обнаруженный ранее положительный эффект ИВГ (6 мг/кг/сутки) на когнитивный дефицит у крыс с неонатальной моделью СД2 [34]. Увеличение дозы ганглиозидов до 6 мг/кг связано с тем, что мы применяли суммарный препарат, а не фракцию GM1, как описано в работе [72]. Следует отметить, что наблюдаемая нами нормализация метаболических показателей у крыс с СД2 при их лечении ИВИ и ИВГ, как отдельно, так и совместно (табл. 2), является следствием восстановления центральной регуляции метаболизма глюкозы путем подавления нейровоспаления, а также в результате улучшения чувствительности тканей к инсулину. Используя в качестве критерия уровень экспрессии SOCS3 в гипоталамусе, можно предположить, что при лечении ИВИ и ИВГ инсулиновый сигналинг восстанавливается, что делает излишним снижение содержания SOCS3 для компенсации нарушений инсулиновой и лептиновой сигнальных систем.

Для выявления возможных мишеней действия инсулина и ганглиозидов в гипоталамусе мы оценивали экспрессию инсулинового рецептора (*InsR*) по уровню мРНК и связывали ее с метаболическими показателями. Сопоставляя результаты оГТТ и измерения экспрессии *InsR*, можно прийти к заключению, что нарушение метаболических показателей не коррелирует с экспрессией *InsR* в гипоталамусе, что вызвано, как можно полагать, отсутствием взаимосвязи между уровнем инсулина в мозге и в крови при СД2 и дефицитом инсулина и лептина в ЦНС, как следствие нарушения его рецептор-опосредованного транспорта через гематоэнцефалический барьер. Так, содержание мРНК *InsR* достоверно снижалось по сравнению с группой К при совместных введениях инсулина и ганглиозидов диабетическим (ДГИ) и контрольным животным (КГИ), что может быть вызвано гиперактивацией инсулинового рецептора интраназально вводимым гормоном. Кроме того, необходимо принимать во внимание тот факт, что инсулиновый рецептор является сложной динамичной макромолекулой, которая после связывания с агонистом и последующей активации за счет эндоцитоза перемещается в ранние эндосомы [73, 74]. Следовательно, после совместного воздействия ИВГ и

ИВИ значительно больше рецепторов может возвращаться в плазматическую мембрану, а не претерпевать деградацию в поздних эндосомах, что и снижает необходимость в высоком содержании мРНК *InsR*.

Активируемый через инсулиновый и лептиновый рецепторы фосфатидилинозитол-3-киназа/Akt-киназа-сигнальный путь в гипоталамических нейронах является важнейшим эффекторным звеном, ответственным как за метаболизм глюкозы, так и за регуляцию пищевого поведения [75]. При СД2 и метаболических расстройствах в гипоталамусе наблюдается снижение активности Akt-киназы, ассоциированное с уменьшением уровня фосфорилирования по одному из ключевых сайтов фермента [23–26]. Отсутствие значимых изменений фосфорилирования Akt-киназы в наших экспериментах может быть обусловлено продолжительностью эксперимента. Моделирование метаболических расстройств *in vitro* показало, что при воздействии пальмитата в культуре нейронов гипоталамуса уровень фосфорилирования Akt-киназы на начальном этапе увеличивается и только на поздних этапах снижается [76], что в опытах *in vivo* возможно происходит в сроки более 5 мес после перевода животных на ВЖД. Наряду с этим наблюдаемый нами уровень фосфорформы Akt-киназы является усредненным совокупным показателем по нейрональным и глиальным клеткам. Инсулиновый сигналинг также активен в астроцитах и рассматривается как корегулятор сенсорной системы гипоталамуса, контролирующей уровень глюкозы и ее системный метаболизм [77]. Учитывая, что экспрессия маркерного белка астроцитов GFAP снижается при СД2 (рис. 4b), можно ожидать, что СД2 влияет на нейронально-глиальные взаимодействия и, как следствие, на активность Akt-киназы в различных популяциях клеток. Изучение характера этих изменений при СД2 по отдельности в гипоталамических нейронах и в глиальных клетках требует более детальных исследований. Благодаря применению ИВГ, как отдельно, так и совместно с инсулином, в гипоталамусе повышается уровень ингибирующего фосфорилирования GSK3 $\beta$  по Ser<sup>9</sup> (рис. 4c), что может иметь большое практическое значение. К числу субстратов GSK3 $\beta$  в мозге принадлежат инсулиновый рецептор, IRS, tau-белок, при фосфорилировании которых нарушается инсулиновый сигналинг и метаболизм  $\beta$ -амилоидного пептида [78, 79]. Таким образом, интраназальное введение ганглиозидов могут оказывать эффективными не только при болезни Паркинсона [72], но и при болезни Альцгеймера. Следует отметить, что ИВГ оказывают помимо локального влияния на активность GSK3 $\beta$  и системное действие, поскольку аналогичный эффект наблюдается на периферии в ткани

печени, что было показано нами ранее [80]. Изменение уровня фосфорилирования GSK3 $\beta$  по Ser<sup>9</sup> в гипоталамусе и печени может использоваться в дальнейшем для апробации различных доз ганглиозидов.

Комплекс mTOR(the mammalian target of rapamycin)/p70S6K в гипоталамических нейронах интегрирует сигнальные пути, активируемые как гормонами (инсулином, лептином), так и нутриентами, среди которых глюкоза и аминокислоты [44, 81–83]. Для p70S6K характерны высокая концентрация в ЦНС и участие в процессах биогенеза рибосом, контроле транскрипции генов и размера клеток, а также в регуляции инсулинового сигналинга [84, 85]. Несмотря на то что данные о роли p70S6K в развитии метаболических патологий противоречивы, общепризнанным является факт влияния p70S6K на метаболизм глюкозы, пищевое поведение и энергетический обмен [44, 82, 83, 86]. В наших экспериментах наибольший уровень фосфорилирования p70S6K по Thr<sup>389</sup> наблюдался при одновременном введении ИВИ и ИВГ контрольным и диабетическим животным (КГИ и ДГИ), а также в гипоталамусе диабетических крыс без лечения (Д) (рис. 5a). Поскольку на фоне персистентной активации p70S6K в отдельных районах гипоталамуса при трансфекции каталитически активной формы фермента у животных наблюдаются снижение массы тела и повышение чувствительности тканей к инсулину [83], то совместное введение ИВИ и ИВГ, по-видимому, обеспечивает максимальную эффективность в передаче сигнала на периферию для контроля метаболизма, тогда как у крыс группы Д такая взаимосвязь отсутствует. Комплекс mTOR/p70S6K способен фосфорилировать IRS по остаткам Ser, подавляя инсулиновый сигналинг по механизму отрицательной обратной связи [87]. Способность ИВИ и ИВГ предотвращать ингибирующее фосфорилирование IRS-белков по остаткам Ser в гипоталамусе при СД2, требует дальнейших исследований.

Активацию киназы, регулируемой внеклеточными сигналами, ERK1/2 при совместных ИВИ и ИВГ диабетическим животным (рис. 5b) также можно рассматривать как позитивный эффект, поскольку каскад митогенактивируемых протеинкиназ, включающий ERK1/2, играет важную роль в процессе ремиссии при метаболических расстройствах и вовлечен в нормализацию глюкозного гомеостаза [45].

Несмотря на выраженную гипергликемию на периферии, в гипоталамусе при СД2 наблюдается состояние энергетического дефицита, что и является причиной активации энергетического сенсора АМПК (рис. 5c). Гипогликемия в мозге развивается при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, называемую также диабетом

3-го типа [79, 88]. Возникновение центральной гипогликемии связывают с изменением экспрессии транспортеров глюкозы GLUT-1 и GLUT-3, внутриклеточными метаболическими дисфункциями, нарушениями метаболизма тиамина, модификацией церебральных сенсоров, таких как глюкокиназа. Проведенные нами иммуногистохимические исследования показали снижение экспрессии GLUT-3 в вентромедиальном ядре гипоталамуса у крыс с СД2, причем совместное введение ИВИ и ИВГ ее восстанавливало (данные не представлены). Поскольку основная часть глюкозы поступает в мозг через астроциты и транспортер GLUT-1, то нельзя исключить, что ИВИ и ИВГ способствуют восстановлению взаимодействий между нейронами и глияй, что косвенно подтверждают наши данные по экспрессии маркерного белка глиальных клеток GFAP (рис. 4b).

Нарушение центральной регуляции метаболизма глюкозы является одной из причин повышения ее уровня натощак при СД2 [1, 4, 5, 89]. Гипергликемия возникает не только вследствие сниженной скорости поглощения глюкозы тканями, но и в результате усиления глюконеогенеза в печени [90]. В то же время изучение экспрессии ключевых генов глюконеогенеза (*PCK*, *G6PC* и *FBP*) в печени крыс с СД2 не выявило значимых их изменений по сравнению с контрольными животными (рис. 6b,c). Однако лечение ИВГ+ИВИ снижало экспрессию *PERPCK* (ген *PCK*) как у контрольных (КГИ), так и у диабетических крыс (ДГИ). Фермент *PERPCK* катализирует одну из начальных стадий глюконеогенеза, поэтому изменение экспрессии его гена может в большей мере влиять на скорость синтеза глюкозы по сравнению с другими изученными генами глюконеогенеза (*G6PC*, *FBP*). Вариации в экспрессии гена *G6PC* могут приводить к более сложному паттерну изменений продукции глюкозы, поскольку кодируемая им глюкоза-6-фосфатаза не только участвует в синтезе глюкозы *de novo*, но и определяет ее локализацию [90]. Так как глюкоза удерживается в клетке только в фосфорилированном состоянии, то активность глюкоза-6-фосфатазы и экспрессия ее гена *G6PC* должны рассматриваться в совокупности с активностью киназ, катализирующих фосфорилирование глюкозы, например, глюкокиназы. Тем не менее наблюдаемое нами снижение экспрессии гена *G6PC* в печени диабетических животных как при лечении ИВГ, так и при совместном лечении ИВГ и ИВИ свидетельствует о том, что подавляется не только глюконеогенез, но и вероятность перехода глюкозы из фосфорформы в свободную, нефосфорилированную форму и ее дальнейшая диффузия из клетки. Благодаря лечению ИВГ+ИВИ увеличивается содержание мРНК основного транспортера глюкозы в печени *GLUT2*

и синтазы жирных кислот *FASN* (рис. 6a,d). Таким образом, совместное использование инсулина и ганглиозидов через посредство ЦНС усиливает обменные процессы глюкозы в печени.

Инсулин и ганглиозиды способны восстанавливать содержание важнейшего ростового и трофического фактора BDNF в гипоталамусе, сниженную при СД2 (рис. 7b,c). BDNF, как известно, за счет усиления локального белкового синтеза оказывает влияние на синаптическую пластичность [91]. Это может лежать в основе мощного нейропротекторного эффекта ИВГ, ИВИ и их комбинации, и хорошо согласуется с данными о восстановлении этими препаратами когнитивных функций, нарушенных при неонатальной модели СД2 у крыс [34].

Подводя итоги, следует отметить, что совместные интраназальные введения инсулина и ганглиозидов крысам с СД2 позволяют добиться восстановления толерантности к глюкозе, улучшения чувствительности тканей к инсулину, а также усиления обменных процессов и подавления глюконеогенеза в печени, влияя на экспрессию ключевых генов глюконеогенеза в гепатоцитах. Это происходит во многом благодаря центральному синхронизированному влиянию инсулина и ганглиозидов на функциональную активность ключевых белков инсулинового сигналинга (*GSK3β*, *p70S6K*, *ERK1/2*, *AMPK*) в гипоталамусе, а также восстановлению экспрессии BDNF в гипоталамических нейронах.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ ИЭФБ РАН (№ 075-0152-22-00).

#### 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., К.В.Д., Л.В.Б.), сбор данных (И.О.З., Л.В.Б., К.В.Д., И.О.И., И.Ю.М.), обработка данных (И.О.З., Л.В.Б., К.В.Д., И.О.И.), написание и редактирование манускрипта (И.О.З., А.О.Ш., Л.В.Б., Н.Ф.А.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Petersen MC, Shulman GI* (2018) Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98: 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

2. *Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S* (2014) Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 383: 1068–1083. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
3. *Schwartz MW, Seeley RJ, Tschöp MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, D'Alessio D* (2013) Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature* 503: 59–66. <https://doi.org/10.1038/nature12709>
4. *Alonge KM, D'Alessio DA, Schwartz MW* (2021) Brain control of blood glucose levels: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia* 64: 5–14. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05293-3>
5. *Myers MG Jr, Affinati AH, Richardson N, Schwartz MW* (2021) Central nervous system regulation of organismal energy and glucose homeostasis. *Nat Metab* 3: 737–750. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00408-5>
6. *Banks WA, Jaspán JB, Kastin AJ* (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18: 1257–1262. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(97\)00198-8](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(97)00198-8)
7. *Banks WA* (2004) The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 490: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.040>
8. *Rhea EM, Banks WA* (2021) A historical perspective on the interactions of insulin at the blood-brain barrier. *J Neuroendocrinol* 33: e12929. <https://doi.org/10.1111/jne.12929>
9. *Kumar MP, Cremer AL, Klemm P, Steuernagel L, Sundaram S, Jais A, Hausen AC, Tao J, Secher A, Pedersen TÅ, Schwaninger M, Wunderlich FT, Lowell BB, Backes H, Brüning JC* (2021) Insulin signalling in tanycytes gates hypothalamic insulin uptake and regulation of AgRP neuron activity. *Nat Metab* 3: 1662–1679. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00499-0>
10. *Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, Mendelsohn FA* (1987) Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121: 1562–1570. <https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1562>
11. *Unger JW, Betz M* (1998) Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: a review on morphological findings and functional implications. *Histol Histopathol* 13: 1215–1224. <https://doi.org/10.14670/HH-13.1215>
12. *Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB* (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 855–872. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00040-3](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00040-3)
13. *Cai W, Zhang X, Batista TM, García-Martín R, Softic S, Wang G, Ramirez AK, Konishi M, O'Neill BT, Kim JH, Kim JK, Kahn CR* (2021) Peripheral Insulin Regulates a Broad Network of Gene Expression in Hypothalamus, Hippocampus, and Nucleus Accumbens. *Diabetes* 70: 1857–1873. <https://doi.org/10.2337/db20-1119>
14. *Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR* (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122–2125. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2122>
15. *Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L* (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376–1382. <https://doi.org/10.1038/nm1202-798>
16. *Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Rossetti L* (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309: 943–947. <https://doi.org/10.1126/science.1112085>
17. *Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, Cho YR, Chuang JC, Xu Y, Choi M, Lauzon D, Lee CE, Coppari R, Richardson JA, Zigman JM, Chua S, Scherer PE, Lowell BB, Brüning JC, Elmquist JK* (2010) Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab* 11: 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>
18. *Wallum BJ, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D* (1987) Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 190–194. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-190>
19. *Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW* (2000) Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49: 1525–1533. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1525>
20. *Kern W, Benedict C, Schultes B, Plohr F, Moser A, Born J, Fehm HL, Hallschmid M* (2006) Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia* 49: 2790–2792. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0409-y>
21. *Heni M, Schöpfer P, Peter A, Sartorius T, Fritsche A, Synofzik M, Häring HU, Maetzel W, Hennige AM* (2014) Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetol* 51: 679–681. <https://doi.org/10.1007/s00592-013-0546-y>
22. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. *Neurochem Res* 43: 821–837. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
23. *Papazoglou I, Berthou F, Vicaire N, Rouch C, Markaki EM, Bailbe D, Portha B, Taouis M, Gerozissis K* (2012) Hypothalamic serotonin-insulin signaling cross-talk and alterations in a type 2 diabetic model. *Mol Cell Endocrinol* 350: 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.007>
24. *Yang Y, Ma D, Wang Y, Jiang T, Hu S, Zhang M, Yu X, Gong CX* (2013) Intranasal insulin ameliorates tau hyperphosphorylation in a rat model of type 2 diabetes. *J Alzheimers Dis* 33: 329–338. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121294>



25. *Derkach KV, Perminova AA, Buzanakov DM, Shpakov AO* (2019) Intranasal Administration of Proinsulin C-Peptide Enhances the Stimulating Effect of Insulin on Insulin System Activity in the Hypothalamus of Diabetic Rats. *Bull Exp Biol Med* 167: 351–355. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04525-w>
26. *He Y, Zhang C, Luo Y, Chen J, Yang M, Li L, Gu HF, Yang G, Zhang X* (2021) Hypothalamic BMP9 suppresses glucose production by central PI3K/Akt/mTOR pathway. *J Endocrinol* 248: 221–235. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0591>
27. *Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL* (2002) Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5: 514–516. <https://doi.org/10.1038/nn849>
28. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47: 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
29. *Derkach KV, Bondareva VM, Perminova AA, Shpakov AO* (2019) C-peptide and insulin during combined intranasal administration improve the metabolic parameters and activity of the adenylate cyclase system in the hypothalamus, myocardium, and epididymal fat of rats with type 2 diabetes. *Cell Tissue Biol* 13: 228–236. <https://doi.org/10.1134/S1990519X19030039>
30. *Dash S, Xiao C, Morgantini C, Koulajian K, Lewis GF* (2015) Intranasal insulin suppresses endogenous glucose production in humans compared with placebo in the presence of similar venous insulin concentrations. *Diabetes* 64: 766–774. <https://doi.org/10.2337/db14-0685>
31. *Xiao C, Dash S, Stahel P, Lewis GF* (2018) Effects of intranasal insulin on endogenous glucose production in insulin-resistant men. *Diabetes Obes Metab* 20: 1751–1754. <https://doi.org/10.1111/dom.13289>
32. *Mastrototaro L, Roden M* (2021) Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism* 125: 154892. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154892>
33. *Yaribeygi H, Sathyapalan T, Jamialahmadi T, Sahebkar A* (2021) Natural Insulin Sensitizers for the Management of Diabetes Mellitus: A Review of Possible Molecular Mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1328: 401–410. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-73234-9\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-030-73234-9_26)
34. *Sukhov IB, Lebedeva MF, Zakharova IO, Derkach KV, Bayunova LV, Zorina II, Avrova NF, Shpakov AO* (2020) Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* 168: 317–320. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04699-8>
35. *Schnaar RL* (2016) Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol* 428:3325–3336. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.020>
36. *Sipione S, Monyor J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V* (2020) Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci* 14: 572965. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>
37. *Magistretti PJ, Geisler FH, Schneider JS, Li PA, Fiumelli H, Sipione S* (2019) Gangliosides: Treatment Avenues in Neurodegenerative Disease. *Front Neurol* 10: 859. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00859>
38. *Inamori KI, Inokuchi JI* (2020) Roles of Gangliosides in Hypothalamic Control of Energy Balance: New Insights. *Int J Mol Sci* 21: 5349. <https://doi.org/10.3390/ijms21155349>
39. *Zakharova IO, Avrova NF* (2001) The effect of cold stress on ganglioside fatty acid composition and ganglioside-bound sialic acid content of rat brain subcellular fractions. *J Therm Biol* 26: 215–222. [https://doi.org/10.1016/s0306-4565\(00\)00045-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4565(00)00045-0)
40. *Vanier MT, Holm M, Ohman R, Svennerholm L* (1971) Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *J Neurochem* 18: 81–592. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb11988.x>
41. *Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Effect of Long-Term Intranasal Serotonin Treatment on Metabolic Parameters and Hormonal Signaling in Rats with High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol* 2015: 245459. <https://doi.org/10.1155/2015/245459>
42. *Lovestone S, Davis DR, Webster MT, Kaech S, Brion JP, Matus A, Anderton BH* (1999) Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry* 45: 995–1003. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00183-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00183-8)
43. *Noori T, Dehpour AR, Sureda A, Fakhri S, Sobarzo-Sanchez E, Farzaei MH, Küpeli Akkol E, Khodarahmi Z, Hosseini SZ, Alavi SD, Shirooie S* (2020) The role of glycogen synthase kinase 3 beta in multiple sclerosis. *Biomed Pharmacother* 132: 110874. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110874>
44. *Smith MA, Katsouri L, Irvine EE, Hankir MK, Pedroni SM, Voshol PJ, Gordon MW, Choudhury AI, Woods A, Vidal-Puig A, Carling D, Withers DJ* (2015) Ribosomal S6K1 in POMC and AgRP Neurons Regulates Glucose Homeostasis but Not Feeding Behavior in Mice. *Cell Rep* 11: 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.029>
45. *Brown JM, Bentsen MA, Rausch DM, Phan BA, Wieck D, Wasanwala H, Matsen ME, Acharya N, Richardson NE, Zhao X, Zhai P, Secher A, Morton GJ, Pers TH, Schwartz MW, Scarlett JM* (2021) Role of hypothalamic MAPK/ERK signaling and central action of FGF1 in diabetes remission. *iScience* 24: 102944. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102944>
46. *Shimizu H, Inoue K, Mori M* (2007) The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol* 193: 1–9. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0144>
47. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1: FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>

48. Agrawal R, Reno CM, Sharma S, Christensen C, Huang Y, Fisher SJ (2021) Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 321: E156–E163. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2020>
49. Tavares G, Marques D, Barra C, Rosendo-Silva D, Costa A, Rodrigues T, Gasparini P, Melo BF, Sacramento JF, Seica R, Conde SV, Matafome P (2021) Dopamine D2 receptor agonist, bromocriptine, remodels adipose tissue dopaminergic signalling and upregulates catabolic pathways, improving metabolic profile in type 2 diabetes. *Mol Metab* 51: 101241. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101241>
50. Morton GJ, Schwartz MW (2011) Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* 91: 389–411. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2010>
51. Coppari R, Bjorbaek C (2012) Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 11: 692–708. <https://doi.org/10.1038/nrd3757>
52. Fujikawa T (2021) Central regulation of glucose metabolism in an insulin-dependent and -independent manner. *J Neuroendocrinol* 33: e12941. <https://doi.org/10.1111/jne.12941>
53. German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh-I S, Sarruf DA, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ Jr, Schwartz MW, Morton GJ (2011) Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 152: 394–404. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0890>
54. Li X, Wu X, Camacho R, Schwartz GJ, LeRoith D (2011) Intracerebroventricular leptin infusion improves glucose homeostasis in lean type 2 diabetic MKR mice via hepatic vagal and non-vagal mechanisms. *PLoS One* 6: e17058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017058>
55. Fan S, Xu Y, Lu Y, Jiang Z, Li H, Morrill JC, Cai J, Wu Q, Xu Y, Xue M, Arenkiel BR, Huang C, Tong Q (2021) A neural basis for brain leptin action on reducing type 1 diabetic hyperglycemia. *Nat Commun* 12: 2662. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22940-4>
56. Tanida M, Yamamoto N, Morgan DA, Kurata Y, Shibamoto T, Rahmouni K (2015) Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 35: 474–484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-14.2015>
57. Varela L, Horvath TL (2012) Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 13: 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
58. Huang Y, He Z, Gao Y, Lieu L, Yao T, Sun J, Liu T, Javadi C, Box M, Afrin S, Guo H, Williams KW (2018) Phosphoinositide 3-Kinase Is Integral for the Acute Activity of Leptin and Insulin in Male Arcuate NPY/AgRP Neurons. *J Endocr Soc* 2: 518–532. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00061>
59. Zhang ZY, Dodd GT, Tiganis T (2015) Protein Tyrosine Phosphatases in Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling. *Trends Pharmacol Sci* 36: 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.003>
60. Ono H (2019) Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 20: 1317. <https://doi.org/10.3390/ijms20061317>
61. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14: e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
62. Vasandani C, Clark GO, Adams-Huet B, Quittner C, Garg A (2017) Efficacy and Safety of Metreleptin Therapy in Patients With Type 1 Diabetes: A Pilot Study. *Diabetes Care* 40: 694–697. <https://doi.org/10.2337/dc16-1553>
63. Simons K, Gerl MJ (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977>
64. Komura N, Suzuki KG, Ando H, Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol* 12: 402–410. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2059>
65. Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmaschuk EV, Tyurina YY, Gonchar VS (1998) Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23: 945–952. <https://doi.org/10.1023/a:1021076220411>
66. Sokolova TV, Zakharova IO, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2007) Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochem Res* 32: 1302–1313. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9304-2>
67. Schneider JS, Gollomp SM, Sendek S, Colcher A, Cambi F, Du W (2013) A randomized, controlled, delayed start trial of GM1 ganglioside in treated Parkinson's disease patients. *J Neurol Sci* 324: 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.10.024>
68. Zakharova IO, Sokolova TV, Vlasova YA, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2014) GM1 ganglioside activates ERK1/2 and Akt downstream of Trk tyrosine kinase and protects PC12 cells against hydrogen peroxide toxicity. *Neurochem Res* 39: 2262–2275. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1428-6>
69. Fazzari M, Lunghi G, Chiricozzi E, Mauri L, Sonnino S (2022) Gangliosides and the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Long Italian Tradition. *Biomedicines* 10: 363. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020363>

70. Wang X, Li B, Yu X, Zhou Y, Gao Y (2022) The Neuroprotective Effect of GM-1 Ganglioside on the Amyloid- $\beta$ -Induced Oxidative Stress in PC-12 Cells Mediated by Nrf-2/ARE Signaling Pathway. *Neurochem Res* 47: 2405–2415.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-022-03635-8>
71. Galleguillos D, Wang Q, Steinberg N, Zaidi A, Shrivastava G, Dhami K, Daskhan GC, Schmidt EN, Dworsky-Fried Z, Giuliani F, Churchward M, Power C, Todd K, Taylor A, Macauley MS, Sipione S (2022) Anti-inflammatory role of GM1 and other gangliosides on microglia. *J Neuroinflammation* 19: 9.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02374-x>
72. Itokazu Y, Fuchigami T, Morgan JC, Yu RK (2021) Intranasal infusion of GD3 and GM1 gangliosides downregulates alpha-synuclein and controls tyrosine hydroxylase gene in a PD model mouse. *Mol Ther* 29: 3059–3071.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.06.005>
73. Knutson VP (1991) Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 5: 2130–2138.  
<https://doi.org/10.1096/fasebj.5.8.2022311>
74. Chen Y, Huang L, Qi X, Chen C (2019) Insulin Receptor Trafficking: Consequences for Insulin Sensitivity and Diabetes. *Int J Mol Sci* 20: 5007.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20205007>
75. Al-Qassab H, Smith MA, Irvine EE, Guillermet-Guibert J, Claret M, Choudhury AI, Selman C, Piipari K, Clements M, Lingard S, Chandarana K, Bell JD, Barsh GS, Smith AJ, Batterham RL, Ashford ML, Vanhaesebroeck B, Withers DJ (2009) Dominant role of the p110beta isoform of PI3K over p110alpha in energy homeostasis regulation by POMC and AgRP neurons. *Cell Metab* 10: 343–354.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.008>
76. Benzler M, Benzler J, Stoehr S, Hempp C, Rizwan MZ, Heyward P, Tups A (2019) “Insulin-like” effects of palmitate compromise insulin signalling in hypothalamic neurons. *J Comp Physiol B* 189: 413–424.  
<https://doi.org/d10.1007/s00360-019-01220-0>
77. García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi CX, Le Thuc O, Szigei-Buck K, Cai W, Meyer CW, Pfluger PT, Fernandez AM, Luquet S, Woods SC, Torres-Alemán I, Kahn CR, Götz M, Horvath TL, Tschöp MH (2016) Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166: 867–880.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>
78. Avila J, Wandosell F, Hernández F (2010) Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer’s disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurother* 10: 703–710.  
<https://doi.org/10.1586/ern.10.40>
79. Blázquez E, Hurtado-Carneiro V, LeBaut-Ayuso Y, Velázquez E, García-García L, Gómez-Oliver F, Ruiz-Albusac JM, Avila J, Pozo MÁ (2022) Significance of Brain Glucose Hypometabolism, Altered Insulin Signal Transduction, and Insulin Resistance in Several Neurological Diseases. *Front Endocrinol* 13: 873301.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873301>
80. Zakharova IO, Bayunova LV, Derkach KV, Ilyasov IO, Shpakov AO, Avrova NF (2022) Effects of intranasally administered insulin and gangliosides on metabolic parameters and activity of the hepatic insulin system in rats with type 2 Diabetes Mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 58: 380–394.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093022020077>
81. Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25: 6361–632.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209882>
82. Ono H, Pocaí A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, Schwartz GJ, Rossetti L (2008) Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 118: 2959–2968.  
<https://doi.org/10.1172/JCI34277>
83. Blouet C, Ono H, Schwartz GJ (2008) Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab* 8: 459–467.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.004>
84. Asaki C, Usuda N, Nakazawa A, Kametani K, Suzuki T (2003) Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. *Brain Res* 972: 168–176.  
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02523-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02523-x)
85. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 441: 1–21.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20110892>
86. Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ (2008) The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 28: 7202–7208.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1389-08.2008>
87. Um SH, D’Alessio D, Thomas G (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 3: 393–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.003>
88. Tolomeo D, Micotti E, Serra SC, Chappell M, Snellman A, Forloni G (2018) Chemical exchange saturation transfer MRI shows low cerebral 2-deoxy-D-glucose uptake in a model of Alzheimer’s Disease. *Sci Rep* 8: 9576.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27839-7>
89. Ruud J, Steculorum SM, Brüning JC (2017) Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nat Commun* 8: 15259.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms15259>
90. Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P (2018) Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1411: 21–35.  
<https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
91. Leal G, Comprido D, Duarte CB (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 (Pt C): 639–656.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>

## Effects of Intranasally Administered Insulin and Gangliosides on Hypothalamic Signaling and Expression of Hepatic Gluconeogenesis Genes in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

I. O. Zakharova<sup>a,#</sup>, L. V. Bayunova<sup>a</sup>, K. V. Derkach<sup>a</sup>, I. O. Ilyasov<sup>a</sup>,  
I. Yu. Morina<sup>a</sup>, A. O. Shpakov<sup>a</sup> and , and N. F. Avrova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: zakhar@iephb.ru*

The insulin signaling system in hypothalamic neurons plays an important role in the central regulation of glucose metabolism, feeding behavior, and tissue sensitivity to insulin. A decrease in the brain insulin level in metabolic disorders, including diabetes, is the cause of low activities of the key protein kinases regulated through the insulin signaling system. Insulin deficiency in the brain can be compensated by intranasal insulin administration, which allows a direct hormone delivery to the brain. The efficacy of this method can be increased by insulin co-administration with substances enhancing its effects in the brain, such as complex glycosphingolipids and gangliosides. This work was aimed to study the effects of individual versus cooperative intranasal administration of insulin (0.5 IU/rat/day) and gangliosides (6 mg/kg/day) to Wistar rats with experimental type 2 diabetes mellitus (DM2) on the activity of key components of insulin signaling in the hypothalamus (Akt, GSK-3 $\beta$ , ERK1/2, p70S6K, AMPK), as well as on the expression of genes responsible for glucose metabolism in the liver (*GLUT2*, *FASN*, *PCK*, *G6PC*, *FBP*). It was found that intranasal co-administration of insulin and gangliosides to rats with DM2 restores glucose tolerance, improves tissue insulin sensitivity, enhances metabolic processes, and inhibits gluconeogenesis in hepatocytes. This occurs largely due to the central synchronized effect of insulin and gangliosides on the functional activity of key insulin signaling proteins in the hypothalamus (GSK3 $\beta$ , p70S6K, ERK1/2, AMPK), as well as BDNF expression recovery and a decrease in mRNA levels of the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in hypothalamic neurons. Thus, intranasal co-administration of insulin and gangliosides to rats with DM2 restores to a large extent hypothalamic insulin signaling and the control of hepatic gluconeogenesis, impaired under conditions of diabetic pathology.

**Keywords:** insulin, gangliosides, intranasal administration, hypothalamus, signaling pathways, type 2 diabetes mellitus