

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.577+57.026

**ВЛИЯНИЕ ПИНЕАЛОНА НА ОБУЧЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ
СУБЪЕДИНИЦ НМДА-РЕЦЕПТОРОВ В ГИППОКАМПе У КРЫС
В МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИАБЕТА**

© 2020 г. Г. В. Карантыш¹ *, М. П. Фоменко¹, А. М. Менджерицкий^{1,3},
В. Н. Прокофьев¹, Г. А. Рыжак², Е. В. Бутенко¹

¹ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

³ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону, Россия

Поступила в редакцию 03.07.2019 г.

После доработки 13.10.2019 г.

Принята к публикации 06.11.2019 г.

Проведено исследование влияния пептидного препарата пинеалона (Glu-Asp-Arg) в дозировках 50, 100 и 200 нг/кг на обучение крыс в лабиринте Морриса и сохранность выработанного навыка после развития экспериментального диабета, а также на изменения в субъединичном составе НМДА-рецепторов в гиппокампе в данных экспериментальных моделях. В лабиринте Морриса в течение 3 дней проводили оценку пространственного обучения, пинеалон вводили в течение 5 дней после обучения животных. После обучения животным однократно вводили стрептозотозин в дозе 50 мг/кг массы тела крыс. Сохранность выработанного навыка и молекулярные исследования (с использованием метода ПЦР в реальном времени) проведены на 21 день после моделирования экспериментального диабета. Показано, что пинеалон оказывает дозозависимое влияние на исследованные показатели: наиболее благоприятное влияние на сохранность выработанного навыка установлено при введении пинеалона в дозе 100 нг/кг на фоне развития стрептозотозинового диабета. В данной модели обнаружены наименее выраженные изменения уровня экспрессии генов *Grin1*, *Grin2b* и *Grin2d* относительно контрольных значений, а также повышенные значения *Grin2a/Grin2b* по сравнению с группами животных в моделях введения пинеалона в дозировках 50 или 200 нг/кг на фоне экспериментального диабета.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, пространственное обучение, НМДА-рецепторы, ПЦР в реальном времени, гиппокамп, пинеалон

DOI: 10.31857/S1027813320030061

Сахарный диабет является одним из социально значимых заболеваний, распространенность которого продолжает расти, особенно, в развитых странах [1]. Механизмы, лежащие в основе сахарного диабета и роли инсулина в его развитии, широко описаны в литературе.

Большинство работ, посвященных инсулину, направлены на изучение его периферических функций. Однако, в последние годы активно исследуют механизмы, связанные с ролью инсулина в центральной нервной системе, в первую очередь, с нейрональной пластичностью. Установлено, что инсулин способен влиять на интенсивность свободнорадикальных процессов, на разные типы глутаматных рецепторов, апоптоз, активность проапоптотических протеаз и т.д. [2].

Традиционно считали, что инсулин не способен проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), а продуцируется *in situ* в ряде областей мозга [3], в том числе, в гипофизе [4]; установлено, что в ядрах гипоталамуса, миндалинах, гиппокампе и неокортексе экспрессируются инсулиновые рецепторы и субстратные рецепторы инсулина-1 [5]. Тем не менее, уже получены доказательства рецепторопосредованного эндоцитоза проникновения инсулина через ГЭБ [6]. В экспериментальных моделях и при развитии патологических процессов происходит усиление поступления через ГЭБ как экзогенных, так и эндогенных веществ [7], что, очевидно, характерно и при развитии сахарного диабета. При этом как изменяются процессы, лежащие в основе нейрональной пластичности в условиях развития сахарного диабета, на сегодняшний день остается мало исследованным. В том числе, вызывает интерес влияет ли развитие сахарного диабета на субъединичный состав НМДА-рецепторов.

* Адресат для корреспонденции: 344006 Россия, Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42; e-mail: karantyshgv@mail.ru.

Таблица 1. Дизайн эксперимента: последовательность выработки и оценки сохранности пространственного обучения (ПО), моделирования стрептозотоцинового диабета (СД) и введения пинеалона (П)

Дни эксперимента	Группы							
	1	2	3			4		
	К	СД	П ₅₀	П ₁₀₀	П ₂₀₀	СД + П ₅₀	СД + П ₁₀₀	СД + П ₂₀₀
1–3 (ПО)	+	+	+	+	+	+	+	+
4		СД	П ₅₀	П ₁₀₀	П ₂₀₀	СД + П ₅₀	СД + П ₁₀₀	СД + П ₂₀₀
5–8			П ₅₀	П ₁₀₀	П ₂₀₀	П ₅₀	П ₁₀₀	П ₂₀₀
9–23								
24 (ПО)	+	+	+	+	+	+	+	+

Роль глутамата и его рецепторов в нейропластических процессах заключается в его влиянии на синаптическую пластичность, долгосрочную потенциацию, а также на эксайтотоксичность, уровень которой снижается в результате передачи сигналов через инсулиновые рецепторы [8–13]. На клеточных линиях подтвержден антиапоптотический эффект инсулина в мозге [14]. В мозге и в периферических тканях экспрессируются две изоформы инсулиновых рецепторов (А и В); нейроны экспрессируют исключительно А-изоформу инсулиновых рецепторов, которая проявляет высокую аффинность связывания и активируется в условиях низких концентраций инсулиноподобного фактора роста-2 (IGF-2), регулятора нейрональной пластичности. Нарушение регуляции IGF-2 связано с нейропатологическими процессами. Низкая активация инсулиновых рецепторов и доступность инсулина могут привести к нарушению опосредованных с инсулиновыми рецепторами функций и, как следствие, к широкому спектру нарушений функций головного мозга: развитию новообразований, нейродегенеративных заболеваний и депрессии [15]. Инсулиновые рецепторы включены в опосредованную передачу сигналов, влияющих на модуляцию долгосрочной потенциации (LTP), развитие депрессии (LTD), на обучение, память [16, 17], изменение энергетического баланса, аппетита и питания [18, 19]. Таким образом, к настоящему времени доказана взаимосвязь глутаматэргической и инсулиновой систем в регуляции пластических процессов, что определяет вероятность их вовлечения в изменение поведенческих реакций при развитии сахарного диабета. В этом плане является перспективным исследование механизмов действия фармакологических средств, способных оказывать влияние на экспрессию генов, продукты которых включены в регуляцию поведенческих реакций в условиях развития сахарного диабета.

Целью данного исследования явилось изучение влияния пептидного препарата пинеалона (Glu-Asp-Arg) на пространственное обучение и

его сохранность после развития стрептозотоцинового диабета, а также на экспрессию генов субъединиц НМДА-рецепторов в мозге у крыс в данной экспериментальной модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на беспородных белых крысах-самцах весом 200–250 г, которые были разделены на следующие группы (табл. 1):

1 – контрольная группа ($n = 16$), в которой изучали пространственное обучение, сохранность выработанного навыка оценивали на 24 день эксперимента;

2 – группа животных ($n = 16$), у которых моделировали стрептозотоциновый диабет (СД): перед моделированием СД проводили изучение пространственного обучения у животных, сохранность выработанного навыка оценивали на 24 день эксперимента (далее, СД);

3 – группа животных ($n = 48$), которым моделировали СД и вводили пинеалон в трех разных дозировках 50, 100 или 200 нг/кг веса, соответственно, в течение 5-ти дней; перед введением препарата проводили изучение пространственного обучения, сохранность выработанного навыка оценивали на 24 день эксперимента (далее, П₅₀, П₁₀₀, П₂₀₀);

4 – группа животных ($n = 48$), которым моделировали СД и вводили пинеалон в трех разных дозировках 50, 100 или 200 нг/кг веса, соответственно, в течение 5-ти дней; перед введением препарата и моделированием СД проводили изучение пространственного обучения, сохранность выработанного навыка оценивали на 24 день эксперимента (далее, СД + П₅₀, СД + П₁₀₀, СД + П₂₀₀).

Для изучения пространственного обучения экспериментальных животных использовали водный лабиринт Морриса [20], представляющий собой бассейн диаметром 120 см и высотой бортика – 30 см. На время обучения в центр бассейна помещали платформу размером 10 × 10 × 21 см,

Таблица 2. Последовательности праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	$T_{пл}$, °C
<i>Grin1</i>	gca-ggt-gga-gtt-gag-tac-cat-gta-c	cag-ctt-gtt-gtc-ccg-cac-a	60
<i>Grin2a</i>	cct-cga-acc-ctt-cag-tgc-ct	aat-ggc-tga-gac-gat-gag-cag	60
<i>Grin2b</i>	tct-gcc-ttc-tta-gag-cca-ttc-ag	aga-cag-cca-ccg-cag-aaa-c	60
<i>Grin2c</i>	ccc-cct-cag-ctt-ttc-tgg-a	gat-ggc-aac-cac-cgt-gag-a	60
<i>Grin2d</i>	cga-gcc-cta-cag-ccc-tgc	gga-ctg-agg-tac-tca-aag-atg-aaa-act	60
<i>HPRT1</i>	tcc-tcc-tca-gac-cgc-ttt-tc	atc-act-aat-cac-gac-gct-ggg	60

которая была на 0.5 см погружена под воду (воду подкрашивали с помощью нетоксичной водорастворимой краски). С одной стороны бассейна помещали лампу для подсветки. Положение платформы и окружающая среда вокруг бассейна во время обучения были постоянными. Перед тестированием проводили обучение: помещали животное в лабиринт Морриса на время не более 120 с, после чего если животное самостоятельно не находило платформу, принудительно его туда помещали. Обучение проводили 3 дня подряд по 3 попытки каждый день (интервал между попытками – 10 мин). Оценивали время нахождения платформы на 3-й день обучения (усредненное значение за 3 попытки). Сохранность выработанного навыка оценивали на 24 день эксперимента: брали усредненный показатель времени трех повторов тестирования в водном лабиринте Морриса.

Статистическую обработку результатов исследования пространственного обучения проводили с использованием метода ANOVA и программы Statistica 10.0. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Экспериментальный диабет вызывали (на 4-й день эксперимента) путем однократного введения крысам раствора стрептозотоцина (Sigma) в 0.4 мл цитратного буфера в дозе 50 мг/кг массы тела после 18-часового голодания [21]. На 21 сутки после введения стрептозотоцина проводили декапитацию и в крови определяли уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1) с использованием анализатора DS5 Glycomat (Великобритания).

Относительный уровень транскриптов изучаемых генов исследовали с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) после обратной транскрипции. Образцы тканей гиппокампа крыс мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Для избегания деградации образцы размораживали однократно. Тотальную РНК из тканей гиппокампа выделяли при помощи набора Augum Total RNA fatty and fibrous tissue kit (BioRad). Количество и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer (Implen). OD260/280 образцов РНК колебалось от

1.80 до 2.00. Тотальную РНК (0.5 мкг) подвергали обратной транскрипции в кДНК, в объеме смеси 25 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием реагентов фирмы Евроген (Россия), в соответствии с инструкцией производителя при 40°C в течение 40 мин, после чего инактивировали при 92°C в течение 10 мин. Дизайн прямых и обратных праймеров фирмы Синтол (Россия) для проведения ПЦР-РВ проводили в программе Primer3 с последующей проверкой в IDT. Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

ПЦР-РВ была проведена на амплификаторе CFX-96 фирмы Bio-Rad с использованием готовой реакционной смеси iQ BioRad в объеме 25 мкл, включая по 50 пмоль прямого и обратного праймеров и 1 мкл кДНК. Условия для проведения ПЦР: первичную денатурацию проводили при 95°C 3 мин. Проводили 35 циклов амплификации: 20 с при 95°C , 10 с при 60°C , 20 с при 72°C . Для проверки специфичности после окончания циклов амплификации строили кривую плавления от 65 до 95°C с шагом 0.5°C . В качестве красителя использовали SYBR Green I. Реакцию амплификации для каждого исследуемого гена проводили отдельно в дубликатах. В качестве референсного гена был использован ген *HPRT1*, кодирующий фермент гипоксантин фосфорибозилтрансферазу 1.

Расчет относительной экспрессии проводили, оценивая величины C_t (Threshold cycle), получаемые в ходе проведения ПЦР-РВ. Далее сравнивали уровни экспрессии исследуемых генов в опытных и контрольных образцах с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [22].

Статистическую обработку результатов исследования экспрессии генов проводили в программе Statistica 10.0 с использованием критериев Колмагорова-Смирнова и Ливиня, а также однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Таблица 3. Уровень HbA1 в крови крыс в модели стрептозотоцинового диабета и при введении пинеалона в разных дозировках

Группы		HbA1
1	Контроль	7.13 ± 0.31
2	СД	19.47 ± 1.42*
4	СД + П ₅₀	7.05 ± 0.27#
	СД + П ₁₀₀	7.25 ± 0.36#
	СД + П ₂₀₀	7.32 ± 0.34#

* Статистически значимые отличия уровня HbA1 относительно показателей у животных контрольной группы (при $p < 0.05$), # статистически значимые отличия уровня HbA1 у животных 4-й группы относительно показателей у крыс 2-й группы (при $p < 0.05$).

Таблица 4. Время выхода на платформу (с) у крыс в разных экспериментальных моделях

Группы		Дни эксперимента	
		3	24
1	К	6.64 ± 0.31	8.02 ± 0.16
2	СД	8.78 ± 0.39#	11.61 ± 0.33#
3	П ₅₀	5.72 ± 0.23	10.44 ± 0.31#
	П ₁₀₀	5.21 ± 0.20	7.21 ± 0.28
	П ₂₀₀	7.86 ± 0.34	9.28 ± 0.37
4	СД + П ₅₀	12.43 ± 0.61#§	11.47 ± 0.51#
	СД + П ₁₀₀	6.88 ± 0.31	8.46 ± 0.24§
	СД + П ₂₀₀	14.82 ± 0.71#§	11.29 ± 0.42#

Статистически значимые отличия показателей у животных 4-й группы относительно контрольных значений (при $p < 0.05$); § статистически значимые отличия показателей у животных 4-й группы относительно значений у животных 2-й группы (при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении уровня HbA1 в крови экспериментальных животных в модели стрептозотоцинового диабета было показано, что данный показатель повышался в группе крыс СД ($p < 0.05$), а при введении пинеалона в разных дозировках у животных в модели СД уровень HbA1 в крови крыс соответствовал контрольным значениям (табл. 3).

Среднее время выхода на платформу всех экспериментальных животных к 3-му дню эксперимента снизилось ($p < 0.05$) по сравнению с 1-м днем выработки условного навыка в лабиринте Морриса (в среднем – 27.35 ± 1.68 с). Наиболее выраженные изменения данного показателя установлены в

контрольной группе животных и у крыс при введении пинеалона в дозировке 100 нг/кг и моделировании СД (СД + П₁₀₀). При введении пинеалона в дозировках 50 нг/кг и 200 нг/кг в модели стрептозотоцинового диабета время поиска скрытой платформы на 3-й день тестирования было выше уровня группы животных в модели СД, соответственно, на 42% ($p < 0.05$) и 69% ($p < 0.05$).

На 24-й день эксперимента анализировали показатель сохранности выработанного навыка у крыс. В контрольной группе и группе крыс в модели стрептозотоцинового диабета время выхода на платформу не изменилось относительно показателя на 3-й день выработки условного навыка. При введении пинеалона в дозировках 50 и 200 нг/кг и моделировании СД значения времени выхода на платформу были выше, а в модели СД + П₁₀₀ ниже, чем в контрольной группе (табл. 4).

Ранее было показано, что введение пинеалона в дозировке 100 нг/кг перед моделированием стресса предотвращает чрезмерную интенсификацию свободнорадикальных процессов и повышение активности каспазы-3 в крови и в мозге [23, 24], а также улучшает способность к воспроизведению приобретенного навыка у экспериментальных животных. Поскольку введение данного пептидного препарата в дозировках 50 нг/кг и 200 нг/кг в модели СД не приводило к снижению времени выхода на платформу относительно группы крыс при моделировании СД без введения пинеалона, можно предполагать, что его воздействие на обучение и сохранность ранее выработанного навыка носит дозозависимый характер.

Анализ экспрессии генов субъединиц глутаматных НМДА-рецепторов в гиппокампе показал, что на 24 день эксперимента уровень транскриптов гена *Grin1* снижался ($p < 0.05$) в группе крыс в модели СД ($p < 0.05$), тогда как при введении пинеалона в дозировках 50 и 200 нг/кг и моделировании СД, напротив, возрастал ($p < 0.05$) относительно контроля.

Снижение ($p < 0.05$) уровня транскриптов гена *Grin2a* относительно контроля было установлено в группах животных, которым моделировали СД и вводили пинеалон в дозировках 50 и 200 нг/кг, а также у животных, которым моделировали СД без введения препарата (рис. 1, 2). Противоположные изменения транскриптов генов *Grin1* и *Grin2a* в данных группах животных относительно контроля позволяют сделать предположение о том, что в результате данных воздействий происходит изменение доли GluN1- и GluN2a-содержащих НМДА-рецепторов в сторону возрастания 1-го и снижения 2-го типов рецепторов.

Уровень экспрессии транскрипта гена *Grin2b* в модели СД снижался ($p < 0.05$), а в группе крыс, которым вводили пинеалон в дозировке 200 нг/кг

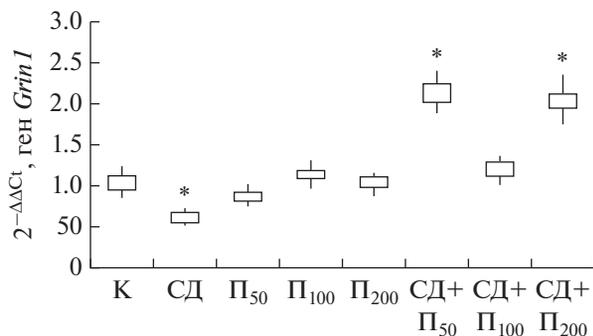


Рис. 1. Относительная экспрессия гена *Grin1* у контрольной группы крыс (К) и экспериментальных животных в условиях введения пинеалона в разных дозировках и моделирования стрептозотоцинового диабета. * Статистически значимые отличия показателей относительно контрольных значений (при $p < 0.05$) (рис. 1–5).

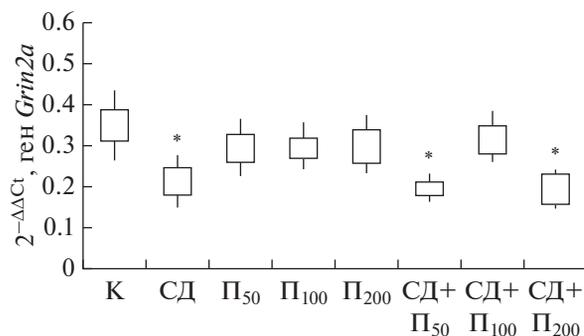


Рис. 2. Относительная экспрессия гена *Grin2a* у контрольной группы крыс (К) и экспериментальных животных в условиях введения пинеалона в разных дозировках и моделирования стрептозотоцинового диабета.

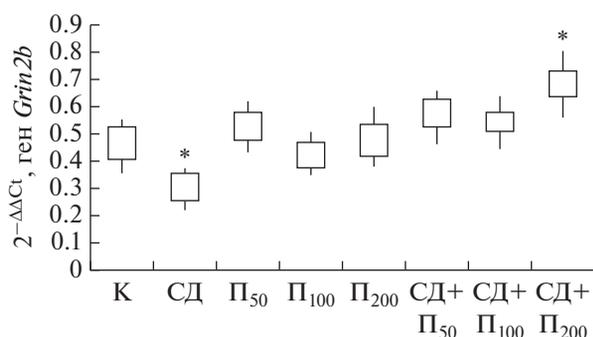


Рис. 3. Относительная экспрессия гена *Grin2b* у контрольной группы крыс (К) и экспериментальных животных в условиях введения пинеалона в разных дозировках и моделирования стрептозотоцинового диабета.

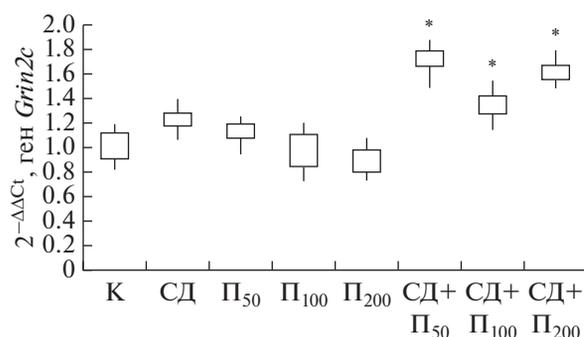


Рис. 4. Относительная экспрессия гена *Grin2c* у контрольной группы крыс (К) и экспериментальных животных в условиях введения пинеалона в разных дозировках и моделирования стрептозотоцинового диабета.

и моделировали СД, возрастал ($p < 0.05$). В исследовании [25] показано влияние снижения GluN2B на уменьшение количества клеток гипоталамуса, синтезирующих агути-подобный белок, что приводит к понижению массы тела, жировой ткани и потребления пищи. Изменение транскрипта гена *Grin2b* в остальных группах не выявлено (рис. 3).

В экспериментальных группах животных, которым вводили пинеалон и моделировали СД, наблюдали возрастание ($p < 0.05$) экспрессии транскриптов гена *Grin2c* относительно контроля и 2-й и 3-й групп (рис. 4). Как известно, НМДА-рецепторы являются динамичными образованиями, изменение субъединичного состава которых способствует синаптическому созреванию [26]. В исследовании [27] было установлено роль сигнального пути NIPK2-JNK-c-Jun в подавлении транскрипции генов *Grin2a* и *Grin2c*, кодирующих GluN2A- и GluN2C-субъединицы НМДА-

рецепторов, соответственно, в раннем постнатальном периоде развития мозга у мышей. Гомеодоменирующая протеинкиназа 2 (NIPK2) является онкосупрессором, индуцирующим клеточную гибель в условиях недостатка глюкозы. При этом снижение NIPK2 приводит к уменьшению влияния сигнального пути JNK-c-Jun, увеличению мРНК *Grin2a* и *Grin2c* из-за снижения влияния c-Jun и к повышению уровня белков GluN2A и GluN2C в дофаминергических нейронах черной субстанции и нейронах коры головного мозга и, как предполагают, в гиппокампе.

При изучении показателей экспрессии гена *Grin2d* в гиппокампе у экспериментальных животных было установлено, что во 2-й и особенно 4-й группах крыс (введение пинеалона в дозировках 50 и 200 нг/кг) экспрессия этого гена была выше ($p < 0.05$) контрольных значений (рис. 5).

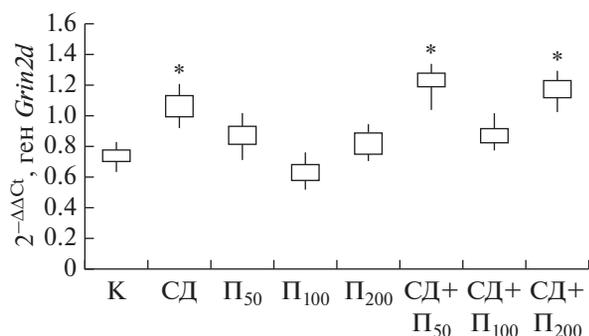


Рис. 5. Относительная экспрессия гена *Grin2d* у контрольной группы крыс (К) и экспериментальных животных в условиях введения пинеалона в разных дозировках и моделирования стрептозотоцинового диабета.

Роль данного гена значительно меньше изучена по сравнению с генами, экспрессирующими GluN2A и GluN2C: уровень экспрессии GluN2D значительно ниже и подавляется уже на первых неделях постнатального периода, после чего, как предполагают, только интернейроны продолжают экспрессировать GluN2D. Показано, что экспрессия GluN2D происходит в шипиковом аппарате гиппокампа и аксо-аксональных синапсах [28]. Следовательно, экспрессия как *Grin2c*, так и *Grin2d* в норме снижается уже в начале постнатального периода, тогда как в условиях СД и введения пинеалона в дозировках 50 и 200 нг/кг уровень их экспрессии повышен ($p < 0.05$) относительно контрольных значений.

Таким образом, в данной работе впервые было установлено изменение экспрессии генов субъединиц НМДА-рецепторов (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c* и *Grin2d*) в гиппокампе у крыс в модели стрептозотоцинового диабета, а также влияние введения пинеалона в разных дозировках на эти показатели. Кроме того, исследовано, как влияет изменение субъединичного состава НМДА-рецепторов на сохранность условного навыка (навигационного обучения в водном лабиринте Морриса) при развитии СД.

Трипептид пинеалон (Glu-Asp-Arg) обладает способностью стимулировать функциональную активность основных клеточных элементов ткани мозга, снижать уровень спонтанной гибели клеток, усиливать регенераторноадаптационные процессы в клетках [24]).

Очевидно, пинеалон, введенный в разных дозировках, по-разному действует на сохранность ранее выработанного навыка, причиной чему, является дозозависимое влияние пинеалона на экспрессию субъединиц НМДА-рецепторов. Известно, что в гиппокампе GluN2A и GluN2B являются основными регуляторными субъединицами этих рецепторов: их экспрессия динамично и строго регулируется. В том числе, доказано, что после

определенного воздействия наблюдается быстрое увеличение GluN2A в постсинапсах в составе НМДА-рецептора, обусловленное мобилизацией латеральных рецепторов из соседних мест. Позднее НМДА-рецепторы мобилизуются из других пулов, и происходит синтез de novo в нейронной соме. Изменения уровня GluN1 или НМДАR, связанные с синаптической пластичностью и формированием пространственной памяти, по-видимому, определяются процессами, связанными с их транспортом, экспрессией или деградацией [9].

В различных экспериментальных моделях наблюдали возрастание уровней субъединиц НМДА-рецепторов. В том числе, это показано в эксперименте с выработкой пространственного обучения у крыс с использованием метода лабиринта Морриса [29]: установлено, что уровень экспрессии мРНК GluN1 снижался через 1 ч после четырех последовательных тренировочных сессий, тогда как уровень экспрессии мРНК GluN2A не отличался от контроля. В тоже время, при сохранении долговременной памяти в CA1 у крыс повышен уровень GluN1 [30]. Поэтому предполагают, что увеличение экспрессии GluN1 в CA1, а также в зубчатой извилине может быть вовлечено в формирование пространственной долговременной памяти. Однако, в большинстве работ указывается, что максимум повышения уровня экспрессии этих генов достигает примерно через 1.0–1.5 ч после воздействия, после чего наступает спад уровня их экспрессии [31, 32].

Об изменениях экспрессии субъединиц НМДА-рецепторов также описано в другой работе при предъявлении иных пространственных задач [33]. В том числе было установлено, что в синаптосомальной фракции, извлеченной через 6 ч после тренировки крыс в радиальном лабиринте в течение 10 дней подряд, происходит повышение уровня GluN1 и GluN2B в гиппокампе и увеличение GluN1 и GluN2A в префронтальной коре, а в синаптосомальной фракции дорсального гиппокампа выявлено увеличение GluN1 и GluN2A.

Таким образом, до сих пор не было установлено длительных изменений уровня экспрессии субъединичного состава НМДА-рецепторов после выработки навыка, как это было показано в данной работе. С одной стороны, это может быть результатом того, что на 24-й день эксперимента (когда проводили оценку сохранности ранее выработанного навыка) тестирование проводили трижды, т.е. последнее тестирование приходилось на время не менее 180 мин после начала 1-го тестирования. При этом значительного разброса значений времени выхода на платформу при 1–2–3 тестированиях не установлено. Можно также предполагать, что фармакологическое воздействие пептидных препаратов (в данном случае, – пинеалона)

может оказывать отставленное во времени действие на облегчение синаптической передачи. Это, предположительно, и является результатом влияния пинеалона на соотношение уровней экспрессии генов *Grin2a/Grin2b*, которое в модели введения трипептида в дозировке 100 нг/кг на фоне моделирования СД оставалось на уровне контрольных значений на 24 день эксперимента, тогда как при введении пинеалона в дозировках 50 или 200 нг/кг на фоне СД это соотношение значительно снижалось по сравнению с контролем. Известно, что повышение уровня GluN2B приводит к гибели клеток *in vitro* и *in vivo*, тогда возрастание уровня GluN2A предотвращает гибель нейронов [34, 35]. Также вызывает интерес полученные результаты повышенных уровней экспрессии генов *Grin2c* и *Grin2d* у животных, которым вводили пинеалон в дозировках 50 и 200 нг/кг на фоне СД, а также в модели СД без введения препарата.

Следовательно, в условиях развития стрептозотоцинового диабета и введения пинеалона в разных дозировках наблюдается изменение субъединичного состава НМДА-рецепторов, что отражается на сохранности выработанного ранее навыка (пространственного обучения). Более высокое по значению отношение уровня экспрессии генов *Grin2a/Grin2b* характерно для группы животных, у которых наблюдали наименьшие значения времени выхода на платформу при оценке сохранности ранее выработанного навыка в водном лабиринте Морриса. Это согласуется с данными других авторов [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что трипептид оказывает дозозависимые эффекты на сохранность ранее приобретенного навыка в лабиринте Морриса, а также экспрессию разных субъединиц НМДА-рецепторов в гиппокампе крыс в модели СД. Наиболее благоприятное влияние на сохранность приобретенного навыка пинеалон в модели СД оказывает в дозировке 100 нг/кг, что можно объяснить характером перераспределения уровня экспрессии генов *Grin2a* и *Grin2b* в данной модели по сравнению с другими экспериментальными моделями (введения препарата в дозировках 50 или 200 нг/кг на фоне СД). Не до конца ясна связь изменения уровня экспрессии других исследованных генов субъединичного состава НМДА-рецепторов с сохранностью выработанного навыка. Чтобы понять механизм действия данного пептидного препарата на процесс обучения и его сохранность, необходимо проведение последовательного изучения экспрессии генов не только НМДА-рецепторов, но и других генов, связанных с обучением и адаптацией к стрессорному фактору (в данном случае, к стрептозотоциновому диабету) в динамике повреждающего его воздействия.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Эксперименты на животных выполнены с соблюдением принципов Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Вукулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А. // Сахарный диабет. 2018. Т. 21. № 3. С. 144–159.
2. Nampoothiri M., Reddy N.D., John J. // Behavioural Neurology. 2014. V. 2014. Article ID 674164. 8 p. <https://doi.org/10.1155/2014/674164>
3. Devaskar S.U., Giddings S.J., Rajakumar P.A., Carnaghi L.R., Menon R.K., Zahm D.S. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 8445–8454.
4. Caruso MA, Sheridan MA. // Gen. Comp. Endocrinol. 2011. V. 173. P. 227–247.
5. Baskin D.G., Schwartz M.W., Sipols A.J., D'Alessio D.A., Goldstein B.J., White M.F. // Endocrinology. 1994. V. 34. P. 1952–1955.
6. Baura G.D., Foster D.M., Kaiyala K., Porte D.Jr., Kahn S.E., Schwartz M.W. // Diabetes. 1996. V. 45. P. 86–90.
7. Блинов Д.В. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2014. Т. 6. № 1. С. 70–84.
8. Wu L.-J., Xu H., Ren M. // Molecular Pain. 2007. V. 3. P. 11.
9. Baez M.V., Cercato M.C., Jerusalinsky D.A. // Neural Plasticity. V. 2018. Article ID 5093048. 11 p.
10. Cercato M.C., Vázquez C.A., Kornisiuk E. // Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2017. V. 10. P. 242.
11. Shohami E., Biegon A. // CNS and Neurological Disorders – Drug Targets. 2014. V. 13. № 4. P. 567–573.
12. Bannerman D.M., Niewoehner B., Lyon L. // J. Neuroscience. 2008. V. 28. № 14. P. 3623–3630.
13. Tse Y.C., Bagot R.C., Hutter J.A., Wong A.S., Wong T.P. // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. e27215.
14. Nampoothiri Lai T.W., Zhang S., Wang Y.T. // Progress in Neurobiology. 2014. V. 115. P. 157–188.
15. Pomytkin I., Costa-Nunes J.P., Kasatkin V. // CNS Neuroscience & Therapeutics. 2018. V. 24. Is. 9. <https://doi.org/10.1111/cns.12866>
16. McNay E.C., Recknagel A.K. // Neurobiol. Learn. Mem. 2011. V. 96. P. 432–342.
17. Kullmann S., Heni M., Hallschmid M. // Physiol Rev. 2016. V. 96. P. 1169–1209.
18. Qiu J., Zhang C., Borgquist A. // Cell Metab. 2014. V. 19. P. 682–693.
19. Chen W., Balland E., Cowley M.A. // Neuroendocrinology. 2017. V. 104. P. 364–381.

20. *Morris R.G.* // *J. Neurosci. Meth.* 1984. V. 11. P. 47–60.
21. *Szkudelski T.* // *Ibid.* 2001. V. 50(6). P. 536–546.
22. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* // *Methods.* 2001. V. 25. P. 402–408.
23. Карантыш Г.В., Абрамчук В.А., Рыжак Г.А., Менджеричкий А.М. // *Фундаментальные исследования.* 2013. № 6. С. 1406–1410.
24. Менджеричкий А.М., Карантыш Г.В., Рыжак Г.А., Демьяненко С.В. // *Успехи геронтологии.* 2014. Т. 27. № 1. С. 94–97.
25. *Aykut Ü., Gonçalves G.H.M., Li W.* // *Molecular Metabolism.* 2015. V. 4(10). P. 678–691.
26. *Paoletti P., Bellone C., Zhou Q.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. V. 14. P. 383–400.
27. *Shang Y., Zhang J., Huang E.J.* // *J. Neurosci.* 2018 V. 38(16). P. 4006–4019.
28. *von Engelhardt J., Bocklisch C., Tönges L. et al.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 95.
29. *Cavallaro S., D'Agata V., Manickam P., Dufour F., Alkon D.L.* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001. V. 99. № 25. P. 16279–16284.
30. *Zhang L., Yu W., Han T.-Z., Xie W., Luo Y.* // *Sheng Li Xue Bao.* 2006. V. 58. № 5. P. 442–448.
31. *Baez M.V., Oberholzer M.V., Cercato M.C., Snitcofsky M., Aguirre A.I., Jerusalinsky D.A.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. e55244.
32. *Hepp Y., Salles A., Carbo-Tano M., Pedreira M.E., Freundenthal R.* // *Learning and Memory.* 2016. V. 23. № 8. P. 427–434.
33. *Shanmugasundaram B., Sase A., Miklosi A.G.* // *Behavioural Brain Research.* 2015. V. 289. P. 157–168.
34. *Liu Y., Wong T.P., Aarts M.* // *J. Neuroscience.* 2007. V. 27. № 11. P. 2846–2857.
35. *Taghibiglou C., Martin H.G.S., Lai T.W.* // *Nature Medicine.* 2009. V. 15. № 12. P. 1399–1406.

Effect of Pinealon on Learning and Expression of Genes of NMDA Receptor Subunits in the Hippocampus of Rats with Experimental Diabetes

G. V. Karantysh^a, M. P. Fomenko^a, A. M. Mendzheritskii^{a, c},
V. N. Prokofiev^a, G. A. Ryzhak^b, and E. V. Butenko^a

^a*Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

^b*St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia*

^c*Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia*

We studied the effect of the peptide drug pinealon (Glu-Asp-Arg) at doses of 50, 100, and 200 ng/kg on the training of rats in the Morris maze and the maintenance of the acquired skill after the development of experimental diabetes, as well as on changes in the subunit composition of NMDA receptors in the hippocampus in these experimental models. In Morris water maze, spatial learning was evaluated for 3 days, pinealon was administered for 5 days after animal training. After training, animals were once injected with streptozotocin at a dose of 50 mg/kg of rat body weight. The maintenance of the acquired skill and molecular studies (using the real-time PCR method) were performed on day 21 after modeling of experimental diabetes. It was shown that pinealon has a dose-dependent effect on the studied parameters: the most positive effect on the maintenance of the developed skill during streptozotocin-induced diabetes was observed after pinealon administration at a dose of 100 ng/kg. In this model, we observed the smallest changes in the expression level of the *Grin1*, *Grin2b*, and *Grin2d* genes relative to the control values, as well as increased values of *Grin2a/Grin2b* ratio compared to diabetic groups treated with pinealon at dosages of 50 or 200 ng/kg.

Keywords: experimental diabetes, spatial learning, NMDA receptors, real-time PCR, hippocampus, pinealon