



ФАРМАКО-ЭЭГ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НА ГИППОКАМП КОШЕК АЦЕТИЛХОЛИНА И ИНСУЛИНА В НАНОЧАСТИЦАХ

Ю.В. Фокин*, С.Ю. Харитонов, Л.А. Табоякова, Н.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Изучены центральные механизмы ацетилхолина и инсулина в наночастицах при транспалатинальном введении кошкам с помощью алгоритма нейровизуализации — программного фармако-ЭЭГ анализа графических функций нормированных электрограмм. Показано их преимущественно депримирующее действие, начинающееся на первых часах после введения. Липосомированные формы ацетилхолина и инсулина проникают через гематоэнцефалический барьер и модулируют интрацентральные отношения головного мозга, отражающиеся в высокочастотных ритмах (преимущественно γ -диапазона) гиппокампального отдела головного мозга и связанные с активностью вставочных нейронов и пирамидных клеток. Тестируемые вещества перспективны в качестве инновационных средств профилактики и лечения нейропатий, вызванных в т. ч. гериатрической дисфункцией холинэргической и инсулиновой сигнальной систем, для улучшения консолидации памяти и когнитивных функций.

Ключевые слова: нейровизуализация, электрограммы головного мозга, фармако-ЭЭГ, нормирование/нормализация электрограмм мозга (НЭМ), быстрое преобразование Фурье (БПФ), ацетилхолин, инсулин, липосомы, гиппокамп, кошки

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю., Табоякова Л.А., Каркищенко Н.Н. Фармако-ЭЭГ анализ влияния на гиппокамп кошек ацетилхолина и инсулина в наночастицах. *Биомедицина*. 2023;19(3):58–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-58-65>

Поступила 20.03.2023

Принята после доработки 31.07.2023

Опубликована 10.09.2023

PHARMACO-EEG ANALYSIS OF THE EFFECT OF ACETYLCHOLIN AND INSULIN IN NANOPARTICLES ON THE HIPPOCAMPUS OF CATS

Yuriy V. Fokin*, Sergey Yu. Kharitonov, Lidiya A. Taboyakova, Nikolay N. Karkischenko

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The central mechanisms of acetylcholine and insulin in nanoparticles via transpalatinal administration to cats were studied using a neuroimaging algorithm, including a software-supported pharmacology-EEG analysis of graphic functions of normalized electrograms. The studied substances were found to exhibit a predominantly depressing action, which begins in the first hours after administration. Liposomal forms of acetylcholine and insulin penetrate the blood-brain barrier and modulate the intracerebral relations of the brain, reflected in high-frequency rhythms (mainly γ -rhythms) of the hippocampal region of the brain and associated with the activity of intercalary neurons and pyramidal cells. The substances under study appear to be promising for the prevention and treatment of neuropathies caused, e.g., by geriatric dysfunctions of

the cholinergic and insulin signaling systems, as well as for improving memory consolidation and cognitive functions.

Keywords: neuroimaging, brain electrograms, pharmaco-EEG, normalized brain electrograms (NBE), fast Fourier transform (FFT), acetylcholine, insulin, liposomes, hippocampus, cats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu., Taboyakova L.A., Karkischenko N.N. Pharmaco-EEG Analysis of the Effect of Acetylcholin and Insulin in Nanoparticles on the Hippocampus of Cats. *Journal Biomed.* 2023;19(3):58–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-58-65>

Submitted 20.03.2023

Revised 31.07.2023

Published 10.09.2023

Введение

В настоящее время в научной литературе содержится достаточно мало сведений о связи холинэргической системы и инсулиновой сигнальной системы в мозге, но имеющиеся данные указывают на их кооперативное взаимодействие [5–10].

В нейронах коры головного мозга человека обнаружена совместная локализация субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS-1) InsR и ферментов холинэргической системы ChAT [9, 10]. Молекулярные компоненты сигнальной системы инсулина, такие как InsR, протеинкиназа В (PKB или Akt) и гликогенсинтазы киназа β (GSK-3 β), ко-экспрессируются с маркерами холинэргической системы, такими как ChAT, в пирамидальных клетках CA1 региона гиппокампа мыши, что, по мнению авторов, указывает на участие инсулиновой сигнализации в выполнении холинэргическими нейронами их функций [10]. Сведения о степени и направлении влияния инсулина на активность ферментов холинэргической системы ChAT и AChE во многом противоречивы и показывают зависимость этих эффектов от локализации нейронов. Инсулин повышал активность ChAT в культуре септальных холинэргических нейронов [5, 7], культуре нейрональных клеток человека PNET2 [9], в нейронах сетчатки глаза [8], но снижал активность ChAT в нейронах стриатума [5]. Инсулин не влиял на активность AChE в гомогенатах мозга крыс

в физиологическом интервале концентраций, но повышал эту активность в концентрациях, превышающих физиологические [6]. Инсулин незначительно снижал мРНК AChE и не влиял на экспрессию белка AChE в культуре нейрональных клеток человека PNET2. У людей с болезнью Альцгеймера (БА) прогрессивное снижение экспрессии инсулина и InsR в коре мозга происходило с одновременным утяжелением клинических симптомов БА и снижением мРНК ChAT, при неизменном уровне экспрессии AChE [9]. В целом, эти данные указывают на то, что активность инсулина в областях мозга, связанных с выполнением когнитивных функций, по-видимому, направлена на повышение экспрессии ChAT в холинэргических нейронах и на усиление синтеза ацетилхолина, что особенно важно при лечении гериатрической дисфункции памяти и БА (рис. 1).

В наших предыдущих исследованиях по данной тематике [1] было показано, что ацетилхолин и инсулин, применяемые в липосомированных формах, обладают однонаправленным действием, оказывают влияние на центральные механизмы высшей нервной деятельности и коррелируют посредством преобразования частотно-спектральных характеристик ультразвуковой вокализации, параметров свободного поведения и когнитивных способностей лабораторных крыс. Тестируемые вещества проявляют признаки анксиолитиче-

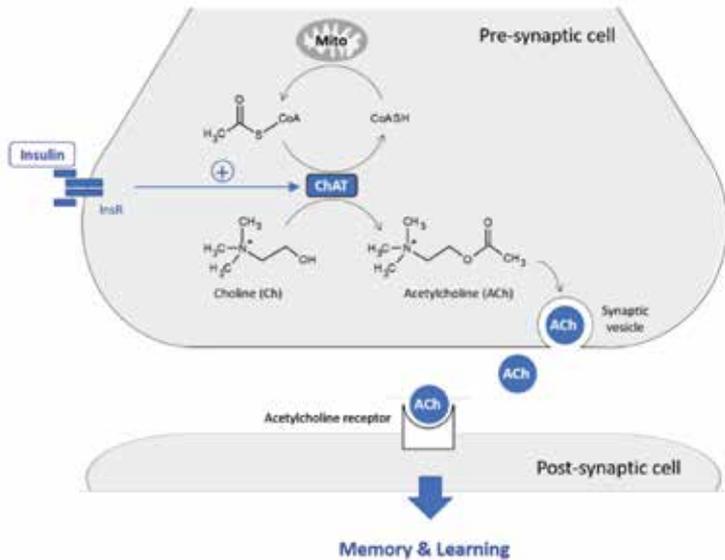


Рис. 1. Влияние инсулина на синтез ацетилхолина и холинэргическую нейротрансмиссию. Инсулиновый рецептор (*InsR*) и холинацетилтрансфераза (*ChAT*) ко-экспрессируются в холинэргических нейронах [9, 10]. Инсулин стимулирует экспрессию *ChAT*, усиливая таким образом синтез ацетилхолина (*ACh*) из холина (*Ch*) в коре головного мозга [9]. *ACh* накапливается в синаптических везикулах, секретируется в синаптическую щель и связывается с ацетилхолиновыми рецепторами на пост-синаптической мембране, запуская холинэргическую нейротрансмиссию, критически важную в процессах обучения и памяти

Fig. 1. Effect of insulin on acetylcholine synthesis and cholinergic neurotransmission. The insulin receptor (*InsR*) and choline acetyltransferase (*ChAT*) are co-expressed in cholinergic neurons [9, 10]. Insulin stimulates *ChAT* expression, thus enhancing the synthesis of acetylcholine (*ACh*) from choline (*Ch*) in the cerebral cortex [9]. *ACh* accumulates in synaptic vesicles, is secreted into the synaptic cleft, and binds to acetylcholine receptors on the postsynaptic membrane, triggering cholinergic neurotransmission, which is critical in learning and memory processes

ских средств с седативным компонентом. Курсовое недельное применение липосомированного инсулина повышает когнитивные способности животных более чем в два раза, ацетилхолина — более чем в четыре раза, что отражает высокочастотные β - и γ -ритмы (выше 20 Гц) гиппокампального отдела головного мозга, связанные с активностью вставочных нейронов и пирамидных клеток, модулирующих противотревожное, антидепрессивное, обезболивающее и прочие сходные действия исследуемых веществ, а также улучшение консолидации памяти и когнитивных функций.

Настоящая работа явилась продолжением исследований холинэргической и инсу-

линовой сигнальной систем и направлена на изучение центральных механизмов их действия.

Цель работы — нейровизуализация интрацентральных отношений головного мозга кошек при действии нейромедиатора ацетилхолина и гормона инсулина посредством алгоритма программного фармако-ЭЭГ-анализа графических функций нормированных электрограмм.

Материалы и методы

Объект исследований — взрослые кошки обоего пола в возрасте более 3 лет, не имеющие признаков чистопородности, массой тела 4–6 кг.

Вживление электродов в головной мозг животных производилось стереотаксическим путём в виде разработанных электродных конструкций.

Регистрация и анализ параметров электрограмм (ЭГМ) с последующим нормированием (НЭМ-метод) осуществлялись с помощью разработанных в НЦБМТ ФМБА России инновационных технических средств и программного обеспечения (микромодуль) [2–4].

Нейровизуализация параметров ЭГМ — получаемые данные представлены на трёх графиках, нанесённых на круговую векторную диаграмму и отражающих средние значения:

- 1) фоновых измерений — синие линии;
- 2) воздействия (экспериментальные данные) — красные линии;
- 3) НЭМ нормированных данных (десятичный логарифм) — жёлтые линии.

На диаграмме отмечены:

- цифровое кодирование по периметру — частоты ЭГ (1–64 Гц);
- спектральные характеристики ЭГ (круговые сектора) — от 0 (внутренний сектор) до $\lg 10n$ (внешний сектор);
- базисная линия нормирования принята за единицу. Расположение кривой НЭМ внутри (ближе к внутреннему сектору диаграммы) свидетельствует о снижении мощности частот ЭГ при воздействии по сравнению с фоновыми данными, расположение снаружи (ближе к внешнему сектору) — о повышении мощности частот ЭГ по сравнению с фоном.

На диаграммах указаны все частоты ЭГ анализируемого диапазона, и для удобства восприятия материала специалистами, привыкшими к традиционной форме интерпретации ЭГ, мы разграничили частоты согласно принятой классификации на дельта- (δ — 1–4 Гц), тета- (θ — 4–8 Гц), альфа- (α — 8–12 Гц), сигма- (σ — 12–16 Гц), бета- (β — 16–30 Гц) и гамма- (γ — 30–64 Гц) диапазоны.

Получение липосом с инсулином и ацетилхолином

Для включения в липосомы готовили р-ры инсулина и ацетилхолина в предварительно подогретой до 30 ± 2 °С деионизованной воде, затем постепенно, при постоянном медленном перемешивании, вносили 70% фосфатидилхолин с индексом окисленности не более 0,25 до его конечной концентрации 10%, диспергировали до образования гомогенной преддисперсии, постепенно увеличивая скорость оборотов до 20 тыс. об./мин. Полученные преддисперсии обрабатывали на гомогенизаторе высокого давления (от 10 до 40–80 Мпа), при температуре 33 ± 3 °С, постоянно контролируя размер полученных частиц с помощью анализатора размера частиц методом лазерной дифракции света (638 нм). При достижении частицами среднего размера 100 нм гомогенизацию завершали, в дисперсию добавляли криопротектор в соотношении к фосфолипидам 1:2, лиофилизировали. В полученных конечных продуктах содержалось 100 мг (2860 МЕ) инсулина и 100 мг ацетилхолина соответственно.

Оценка нейропсихоактивных средств осуществлена с однократным транспалатинальным применением разработанных и синтезированных в НЦБМТ ФМБА России субстанций, обеспечивающих системное накопление в мозге ацетилхолина (АЦХ) и инсулина, в липосомированных формах, позволяющих веществам эффективнее всасываться в желудочно-кишечном тракте, сохраняя свою структуру и при этом практически не разрушаясь при первом прохождении через печень, в связи с чем используется меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивается эффективная действующая концентрация. При попадании к органу-мишени содержимое липосом легко проникает внутрь клетки благодаря биологической совместимости липосомной оболочки с клеточными структурами.

Оба вещества вводились в средних терапевтических дозах с учётом межвидовых коэффициентов на кошек, составляющих для липосомированного АЦХ 15 мг/кг (по лиофилизату), для инсулина — 10 МЕ/организм.

Результаты и их обсуждение

Через анализ нормированных функций электрограмм головного мозга осуществлена нейровизуализация эффектов АЦХ. Наиболее значимые результаты, отражающие интрацентральные механизмы, обнаружены в области дорзального гиппокампа (*hippocampus posterior*, НРр), они представлены в динамике по основным времен-

ным реперным точкам (пиковому действию и следовым эффектам).

НЭМ-анализ АЦХ липосомированного (рис. 2, 3) отражает его преимущественно депримирующее действие по всему анализируемому диапазону, наиболее выражено проявляющееся через 2 ч и до 6 ч после введения, которое свидетельствует о седативных свойствах данной субстанции.

Через 2 ч наиболее выраженные эпизоды депримации отмечаются в θ -ритме (2–7 Гц) и высокочастотных β - и γ -ритмах (20, 27, 49 Гц). При этом на частоте около 52–53 Гц наблюдается близкий к фоновому уровень активности.

Через 6 ч наблюдаются скачкообразные изменения преимущественно депримирующего характера, наиболее выраженные проявляющиеся на высоких частотах около 32, 39, 64 Гц. При этом в областях 2–7, 11–15, 46, 51, 57–62 Гц отмечаются эпизоды активации, а в диапазонах 20–28, 34–37 Гц наблюдается близкий к фоновому уровень активности.

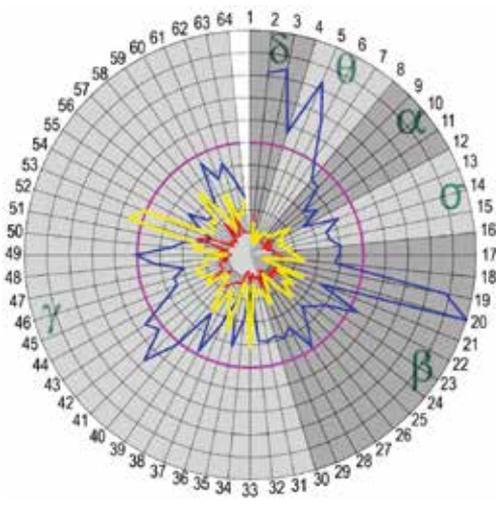


Рис. 2. Параметры ЭГМ и НЭМ через 2 ч после введения АЦХ липосомированного

Примечание: синяя кривая — фоновые измерения; красная кривая — воздействие; жёлтая кривая — НЭМ; розовый контур — базисная линия нормирования. Цифровое кодирование по периметру — частоты, Гц. Круговые сектора — спектральные характеристики ЭГМ.

Fig. 2. BE and NBE parameters 2 hours after the administration of Acetylcholine liposomal

Note: The blue curve is background measurements, the red curve is impact, the yellow curve is NBE. The pink contour is the basic line of valuation. Digital coding on the perimeter is the frequency, Hz. Circular sectors are the spectral characteristics of BE.

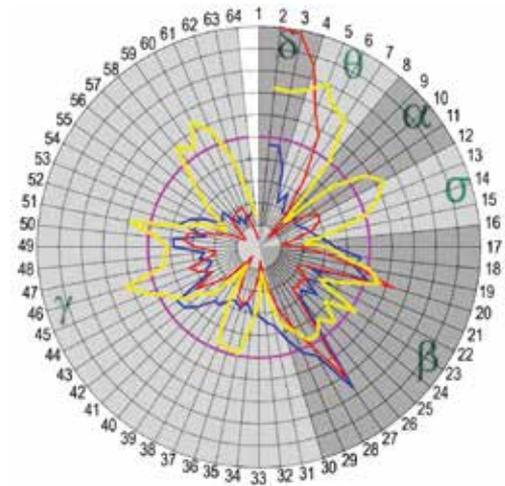


Рис. 3. Параметры ЭГМ и НЭМ через 6 ч после введения АЦХ липосомированного (все обозначения — как на рис. 2)

Fig. 3. BE and NBE parameters 6 hours after the administration of Acetylcholine liposomal (for all designations, refer to Fig. 2)

Преобладающие изменения в высокочастотном γ -диапазоне могут являться важнейшими показателями эффектов нейротропных средств.

НЭМ-анализ инсулина липосомированного (рис. 4, 5) также отражает его депримирующее действие по всему анализируемому диапазону, наиболее выражено проявляющееся через 1 ч и до 4 ч после введения, которое свидетельствует о седативных свойствах данной субстанции.

Через 1 ч обнаруживается максимальный уровень депримации на всём частотном диапазоне (приблизительно в 4,5 раза по сравнению с исходными значениями).

Через 4 ч наблюдается менее выраженное депримирующее действие вещества. Наибольшая спектральная плотность мощности обнаружена на частоте около 62 Гц, относящейся к γ -диапазону, что также может свидетельствовать о его важнейшей роли в эффектах нейротропных средств.

Выводы

Посредством алгоритма программного фармако-ЭЭГ-анализа графических функций нормированных электрограмм установлены центральные механизмы действия нейромедиатора ацетилхолина и гормона инсулина в липосомированных формах. Методом нейровизуализации интрацентральных отношений головного мозга показано их преимущественно депримирующее действие, начинающееся на первых часах после трансплатинального введения. Восстановление параметров электрограмм мозга более отчётливо прослеживается при применении липосомированного ацетилхолина.

Подтверждено предположение о том, что липосомированные формы ацетилхолина и инсулина проникают через гематоэнцефалический барьер и модулируют интрацентральные отношения головного мозга, отражающиеся в высокочастотных ритмах

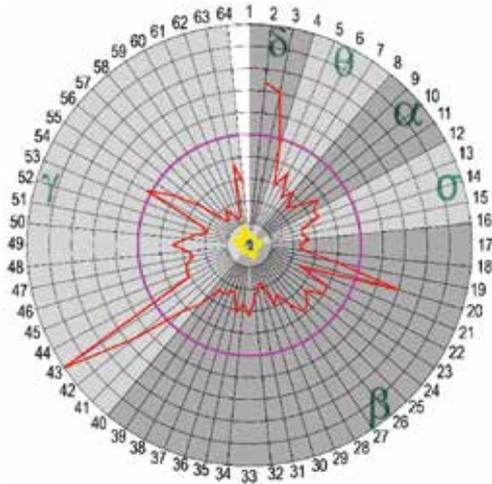


Рис. 4. Параметры ЭГМ и НЭМ через 1 ч после введения инсулина липосомированного (все обозначения — как на рис. 2)

Fig. 4. BE and NBE parameters 1 hour after the administration of insulin liposomal (for all designations, refer to Fig. 2)

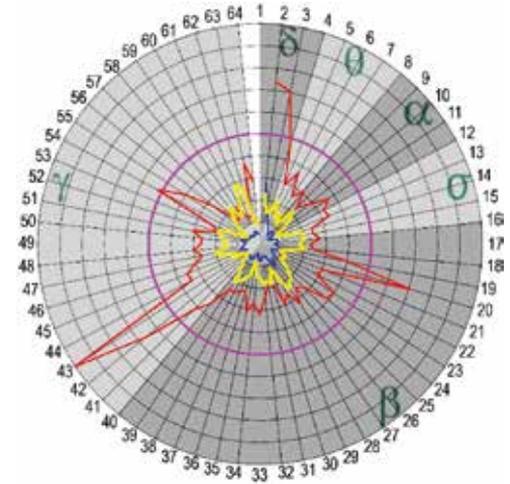


Рис. 5. Параметры ЭГМ и НЭМ через 4 ч после введения инсулина липосомированного (все обозначения — как на рис. 2)

Fig. 5. BE and NBE parameters 4 hours after the administration of insulin liposomal (for all designations, refer to Fig. 2)

(преимущественно γ -диапазона) гиппокампального отдела головного мозга и связанные с активностью вставочных нейронов и пирамидных клеток.

Обнаруженное действие исследуемых веществ определяет перспективность их при-

менения в качестве инновационных средств профилактики и лечения заболеваний ЦНС, вызванных в т. ч. гериатрической дисфункцией холинэргической и инсулиновой сигнальной систем, для улучшения консолидации памяти и когнитивных функций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Помыткин И.А., Алимкина О.В., Таболякова Л.А., Капцов А.В., Борисова М.М., Каркищенко Н.Н. Центральные механизмы липосомированных форм ацетилхолина и инсулина посредством анализа когнитивных, психоэмоциональных и поведенческих параметров крыс. *Биомедицина*. 2022;18(1):32-55. [Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L., Pomytkin I.A., Alimkina O.V., Taboyakova L.A., Kapctov A.V., Borisova M.M., Karkischenko N.N. Tsentral'nye mekhanizmy liposomirovannykh form atsetilkholina i insulina posredstvom analiza kognitivnykh, psikhoemotsional'nykh i povedencheskikh parametrov kryс [Central mechanisms of liposomated forms of acetylcholin and insulin by analysis of cognitive, psycho-emotional and behavioral parameters of rats]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(1):32-55. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-1-32-55.
2. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Таболякова Л.А., Мокроусов М.И., Алимкина О.В. Конвергентная валидация интрацентральных отношений головного мозга животных. *Биомедицина*. 2017;3:16-39. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Mокроусов M.I., Alimkina O.V. Konvergentnaya validatsiya intratsentral'nykh otnosheniy golovnogo mozga zhyvotnykh [Convergent validation of intracentral relationships of the brain of animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2017;3:16-39. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Таболякова Л.А., Харитонов С.Ю., Алимкина О.В. Новые подходы к оценке интрацентральных отношений по показателям оперантного поведения и электрограмм мозга кошек. *Биомедицина*. 2018;4:4-17. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Kharitonov S.Yu., Alimkina O.V. Novye podkhody k otsenke intratsentral'nykh otnosheniy po pokazatelyam operantnogo povedeniya i elektrogramm mozga koshek [New approaches to the assessment of intracentral relations in terms of operant behavior and electrograms of the cats brain]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;4:4-17. (In Russian)].
4. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhyvotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]*. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
5. Brass B.J., Nonner D., Barrett J.N. Differential effects of insulin on choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in neuron-rich striatal cultures. *J. Neurochem*. 1992;59(2):415-424. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb09387.x.
6. Catalán R., Martínez A., Mata F., Aragonés M. Effect of insulin on acetylcholinesterase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1981;101(4):1216-1220. DOI: 10.1016/0006-291x(81)91577-1.
7. Knusel B., Michel P.P., Schwaber J.S., Hefti F. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci*. 1990;10(2):558-570. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.10-02-00558.1990.
8. Ren Y., Holdengreber V., Ben-Shaul Y., Shah B.H., Varanasi J., Hausman R.E. Causal role for jun protein in the stimulation of choline acetyltransferase by insulin in embryonic chick retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997;232(3):788-793. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6374.
9. Rivera E.J., Goldin A., Fulmer N., Tavares R., Wands J.R., de la Monte S.M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers Dis*. 2005;8(3):247-268. DOI: 10.3233/jad-2005-8304.
10. Wang H., Wang R., Zhao Z., Ji Z., Xu S., Holscher C., Sheng S. Coexistences of insulin signaling-related proteins and choline acetyltransferase in neurons. *Brain Res*. 2009;1249:237-243. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.10.046.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Фокин Юрий Владимирович*, к.б.н., ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: fokin@scbmt.ru

Yuriy V. Fokin*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific
Center of Biomedical Technologies of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: fokin@scbmt.ru

Харитонов Сергей Юрьевич, ФГБУН «Науч-
ный центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;

e-mail: zetroks5@gmail.com

Sergey Yu. Kharitonov, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: zetroks5@gmail.com

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н.,
проф., академик РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Academician of the Russian Academy of Rocket and
Artillery Sciences, Corresponding Member of the
Russian Academy of Sciences, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author