



ЭФФЕКТЫ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ D-ГЛЮКОЗЫ НА АКТИВНОСТЬ АМПА И НМДА РЕЦЕПТОРОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА СРЕЗАХ МОЗГА

А.А. Мокрушин

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН
199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

На переживающих срезах мозга обонятельной коры мозга крыс исследовали влияния различных концентраций D-глюкозы (0,5; 1; 3; 5; 7; 10; 12; 14; 17; 20; 22; 25 мМ) на изменения активностей АМПА и НМДА ионотропных глутаматергических механизмов. Зависимость амплитуд АМПА и НМДА потенциалов от концентрации D-глюкозы была куполообразной. Малые концентрации (0,5; 1; 3; 5 мМ) вызывали прогрессивное увеличение амплитуд АМПА и НМДА потенциалов. При концентрации глюкозы во внеклеточной среде 7, 10 мМ амплитуды АМПА и НМДА потенциалов были максимальными и стабильными. При концентрации D-глюкозы 14 мМ активности АМПА и НМДА механизмов снижались и при дальнейшем увеличении углевода необратимо блокировались. Долговременная посттетаническая потенциация (модель неассоциативного обучения) развивалась только при концентрации D-глюкозы 10 мМ. Белок теплового шока (Mw 70 кДа) протектировал активности АМПА и НМДА механизмов от негативного действия высокой гипергликемической концентрации D-глюкозы 14 мМ. Полученные данные показывают реакции АМПА и НМДА механизмов при развитии гипергликемии. Данную модель можно использовать для поиска веществ при защите нейронных механизмов в нервной ткани при развитии гипергликемического сахарного диабета.

Ключевые слова: срезы мозга крыс, АМПА, НМДА механизмы, D-глюкоза, гипергликемия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов, С.Е. Боровикову за техническую помощь в наладке и обслуживании электрофизиологической установки.

Финансирование: работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4).

Для цитирования: Мокрушин А.А. Эффекты высоких концентраций D-глюкозы на активность АМПА и НМДА рецепторов при моделировании гипергликемии на срезах мозга. *Биомедицина*. 2025;21(1):34–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-34-45>

Поступила 03.10.2024

Принята после доработки 13.01.2025

Опубликована 10.03.2025

EFFECTS OF ELEVATED D-GLUCOSE CONCENTRATIONS ON AMPA AND NMDA RECEPTOR ACTIVITY IN MODELED HYPERGLYCEMIA IN BRAIN SLICES

Anatoliy A. Mokrushin

I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences
19903, Russian Federation, St. Petersburg, Makarova Emb., 6

The effects of various D-glucose concentrations (0.5; 1; 3; 5; 7; 10; 12; 14; 17; 20; 22; and 25 mM) were studied using brain slices of the rat olfactory cortex to determine changes in the activities of AMPA and NMDA ionotropic glutamatergic mechanisms. The dependence of the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials on D-glucose concentrations was dome-shaped. Lower concentrations (0.5; 1; 3; 5 mM) caused a progressive increase in the amplitudes of AMPA and NMDA potentials. Under D-glucose concentrations in the extracellular medium of 7 and 10 mM, the amplitudes of AMPA and NMDA potentials were maximal and stable. Under a D-glucose concentration of 14 mM, the activities of AMPA and NMDA mechanisms decreased and, following a further increase in carbon, were irreversibly blocked. Long-term post-tetanic potentiation (model of non-associative learning) developed only at a D-glucose concentration of 10 mM. Heat shock protein (Mw70 kDa) protected the activities of AMPA and NMDA mechanisms from the negative effects of high hyperglycemic D-glucose concentration of 14 mM. The data obtained indicate the response of AMPA and NMDA mechanisms during the development of hyperglycemia. This model can be used to search for substances to protect neuronal mechanisms in the nervous tissue during the development of hyperglycemic diabetes mellitus.

Keywords: rat brain slices, AMPA, NMDA mechanisms, D-glucose, hyperglycemia

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

Acknowledgment: the author expresses his gratitude to G.P. Smirnova for assistance in conducting the experiments, S.E. Borovikov for technical assistance in setting up and servicing the electrophysiological installation.

Funding: the study was supported by state funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (No. 1023032400236-8-3.1.4).

For citation: Mokrushin A.A. Effects of Elevated D-Glucose Concentrations on AMPA and NMDA Receptor Activity in Modeled Hyperglycemia in Brain Slices. *Journal Biomed.* 2025;21(1):34–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-34-45>

Submitted 03.10.2024

Revised 13.01.2025

Published 10.03.2025

Введение

Сахарный диабет — серьезное заболевание, снижающее качество жизни людей. В мире распространенность этого заболевания постоянно возрастает. У больных диабетом возникает высокое содержание глюкозы в крови (гипергликемия). При этом происходят нарушения во многих органах и тканях, но особенно серьезные и негативные возникают в ЦНС, что проявляется в когнитивных нарушениях. Глюкоза является основным источником энергии для мозга млекопитающих, необходимым для поддержания нормальной мозговой функции. Повышение внеклеточной концентрации глюкозы приводит к развитию гипергликемического состояния, и это является основным триггером диабетических когнитивных нарушений [7, 13, 15]. Когнитивные дефи-

циты наблюдались и в экспериментальных моделях диабета, такие как нарушение сенсорного восприятия, а также дефицит рабочих и пространственных функций памяти. Более того, выявлено развитие негативных изменений процессов обучения и формирования памяти [8, 12, 23, 24]. В опытах на животных эти изменения проявились при развитии долговременной посттетанической потенциации (ДПП), которая рассматривается как экспериментальная модель обучения и формирования памяти [2].

Известно, что развитие ДПП связано с активацией ионотропных глутаматергических рецепторных АМПА (α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота) и НМДА (N-метил-D-аспаргат) механизмов. Однако гиперактивация НМДА рецепторов вызывает повреждение нейронов за счет

увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция. Эти изменения индуцируют целый комплекс нарушений в клетках: образование свободных радикалов, активация протеаз, фосфолипаз и эндонуклеаз. Обнаружено, что пролонгация таких изменений в нейронах приводит к серьезным нейродегенеративным заболеваниям, таким как ишемический инсульт, травма и эпилепсия [14, 22].

Учитывая, что ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы являются ключевыми в адаптации организма к окружающей среде, для лечения диабетических нарушений в мозге важно знать, какие изменения происходят в глутаматных АМПА и НМДА рецепторах при развитии гипергликемии и возможна ли их защита от действия высоких концентраций D-глюкозы.

Целью нашего исследования было определение характера изменений активностей АМПА и НМДА-зависимых механизмов при действии на них различных концентраций D-глюкозы. В работе мы сосредоточились на изучении процессов, связанных с развитием гипергликемии. Для выяснения этих процессов опыты проводились на переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс, чтобы получить ответ, как модифицируются активности этих рецепторных механизмов при моделировании гипергликемических изменений АМПА и НМДА механизмов.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс-самцов популяции линий Wistar массой 180–200 г. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры мозга крыс толщиной 400–500 мкм. Крыс декапитировали, извлекали головной мозг и готовили срезы специальным резаком [1, 2]. Срезы

переносили в стеклянную вилу объемом 1 мл с искусственной цереброспинальной жидкостью (ИЦЖ), составом (мМ): 124,0 NaCl; 5,0 KCl; 2,6 CaCl₂; 1,24 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 3,0 NaHCO₃; 10,0 глюкозы; pH=7,3 при 37°C. Флаконы со срезами устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) и прerinкубировали в течение 1 ч.

Затем срезы переносили в регистрационную камеру электрофизиологической установки [4], непрерывно перфузировали ИЦЖ со скоростью 2,0 мл/мин и проводили регистрацию электрической активности. При электрической стимуляции латерального обонятельного тракта (ЛОТ) внеклеточно регистрировали фокальные потенциалы (ФП). ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ — суммарный потенциал действия (ПД ЛОТ), и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию ионотропных глутаматергических рецепторов — АМПА потенциал и НМДА потенциал (рис. 1).

АМПА и НМДА потенциалы (мкВ) регистрировали стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм. Эти потенциалы возникали на электрические стимулы, подаваемые на ЛОТ от электростимулятора (ЭСУ-1, Россия) прямоугольной формы, длительностью 0,1 мс, интенсивностью 1–3 В и частотой 0,003 Гц. Потенциалы усиливали (НТО, Россия), оцифровывали аналого-цифровым прибором (Е 20-10, Россия) и обрабатывали компьютерной программой «Анализ электрической активности нейронов» (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия).

Химические компоненты для приготовления инкубационных растворов и D-глюкозы были приобретены в фирме «Химреактив» (Россия), «БТШ70» (Институт цитологии РАН).

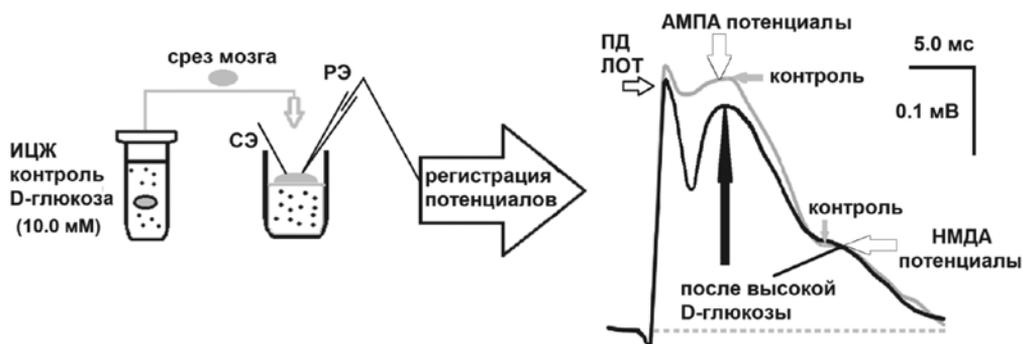


Рис. 1. Экспериментальная модель для изучения эффектов различной концентрации D-глюкозы на ионотропные глутаматергические АМПА и НМДА рецепторы.

Примечание: срез мозга инкубировался в ИЦЖ с концентрацией D-глюкозы 10 мМ, затем переносился в вилу с тестируемой концентрацией D-глюкозы. Для регистрации АМПА и НМДА потенциалов срез помещали в регистрирующую камеру электрофизиологической установки. СЭ — стимулирующий электрод, РЭ — регистрирующий электрод. Справа на схеме: суммарный потенциал, регистрируемый в срезе в ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ с указанием регистрируемых компонентов: АМПА и НМДА потенциалы (мкВ), также суммарный потенциал действия проводящих волокон ЛОТ — ПДЛОТ (в работе не анализировался). Серый профиль ФП — контроль, черный — ФП при действии изменений концентрации D-глюкозы. Пунктирная линия представляет изолинию — потенциал среза в состоянии покоя; стрелки показывают точки измерения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов. Калибровка как указана.

Fig. 1. Experimental model for studying the effects of various D-glucose concentrations on ionotropic glutamatergic AMPA and NMDA receptors.

Note: a brain slice was incubated in a control ИЦЖ with a D-glucose concentration of 10 mM followed by placing in a vial with the tested concentration of D-glucose. To record the АМПА and НМДА potentials, the slice was placed in the recording chamber of an electrophysiological setup. СЭ is a stimulating electrode, РЭ is a recording electrode. On the right of the diagram: the total potential recorded in the slice in response to electrical stimulation of the ЛОТ with an indication of the recorded components: АМПА and НМДА potentials (μV), as well as the total action potential of the conductive fibers of the ЛОТ — ПДЛОТ (not analyzed in the study). The gray profile of the ФП is the control, the black one is the ФП under the influence of changes in the concentration of D-glucose. The dotted line represents the isoline — the resting potential; the arrows indicate the measurement points of the amplitudes of the АМПА and НМДА potentials. Calibration as indicated.

Статистическую обработку изменений амплитуд АМПА и НМДА потенциалов осуществляли с применением непараметрического параметра Вилкоксона—Манна—Уитни (U-критерия). Цифровые данные выражали как среднее значение и его стандартную ошибку. Уровень статистической значимости составлял $p \leq 0,05$.

Дизайн экспериментов по исследованию эффектов различных концентраций D-глюкозы на срезы проводился в следующей последовательности. Срезы в течение 20 мин перфузировали ИЦЖ в проточной камере электрофизиологической установки [4] и регистрировали амплитуды АМПА

и НМДА потенциалов (мкВ). Затем срезы перфузировали ИЦЖ с тем же солевым составом с добавлением D-глюкозы в концентрациях: 0,5; 1; 3; 5; 7; 10; 12; 14; 17; 20; 22; 25 мМ в течение 20 мин и регистрировали АМПА и НМДА потенциалы.

Приготовление растворов с различной концентрацией D-глюкозы осуществляли следующим образом. Контрольная концентрация D-глюкозы была 10 мМ, поскольку при этой концентрации жизнедеятельность срезов, оцениваемая по амплитудам АМПА и НМДА потенциалов, сохранялась в течение более 1 ч. Другие концентрации D-глюкозы готовили либо снижением, либо

увеличением до указанных концентраций. Для регуляции осмолярности растворов с повышенной или пониженной концентрацией D-глюкозы применяли метод снижения или увеличения концентрации NaCl, соответственно, в растворе до значений 290–300 мОсм/кг, которые для крови считаются нормальными, с помощью измерения на осмометре ОСКР-1М (Россия).

Срезы перфузировали ИЦЖ с одной из концентраций D-глюкозы в течение 30 мин. В течение этого времени регистрировали амплитуды АМПА и НМДА потенциалов после воздействия на них соответствующей концентрации D-глюкозы. Сопоставляя амплитуды АМПА и НМДА потенциалов при воздействии углевода с их контрольными значениями, определяли степень их изменений.

Опыты по исследованию D-глюкозы в разных концентрациях на развитие НМДА-зависимой ДПП проводились в следующей последовательности. Были выбраны три критические концентрации D-глюкозы на основании результатов наших исследований, представленных на рис. 2: 3, 10, 14 мМ. В каждом срезе в течение 15 мин регистрировали амплитуды НМДА потенциалов, эти значения были контрольными. Затем проводилась тетанизация ЛОТ электрическими импульсами с частотой 100 Гц длительностью 15 с. Далее регистрировали амплитуды НМДА потенциалов во временных интервалах, указанных на оси абсцисс рис. 3.

При исследовании протективных влияний белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) последовательность экспериментов была следующей. При воздействии контрольных значений D-глюкозы (10 мМ) измеряли амплитуду НМДА потенциалов на отдельной группе срезов, и эти значения рассматривались как контрольные. В другой группе срезов измерялась амплитуда НМДА потенциалов в концентрации D-глюкозы 14 мМ. Третья группа срезов сначала инкубировалась с БТШ70

(70 мкг/мл) в течение 20 мин. После этого времени на срезы апплицировали D-глюкозу (14 мМ). После такой обработки срезов были измерены амплитуды НМДА потенциалов и сопоставлены со значениями амплитуд в контрольной группе.

Результаты исследований

В начале исследований в срезах были протестированы эффекты различных концентраций D-глюкозы на активность ионотропных глутаматергических АМПА и НМДА рецепторов, определяемых по амплитуде потенциалов. Каждую концентрацию D-глюкозы тестировали на отдельной группе срезов. Зависимость амплитуд АМПА и НМДА потенциалов от концентрации D-глюкозы была куполообразной (рис. 2). Сначала были исследованы эффекты концентраций 0,5 и 1 мМ глюкозы, которые соответствуют нормогликемии для мозга в условиях *in vivo* для крыс и человека [13, 19]. При действии 1 мМ амплитуды АМПА и НМДА потенциалов глюкозы были ингибированы и составляли 27 ± 5 и 65 ± 8 мкВ соответственно. Еще более выраженное угнетение было при 0,5 мМ амплитуды АМПА и НМДА потенциалов: до 40 и 10 мкВ (рис. 2).

Возрастающие концентрации действия глюкозы (3, 5, 7 мМ) вызывали увеличение амплитуд АМПА и НМДА потенциалов до 10 мМ, причем изменения этих кривых были конгруэнтны. Увеличение концентрации D-глюкозы до 12 мМ вызывало снижение амплитуд АМПА и НМДА потенциалов, но эти изменения были статистически недостоверны. Критические изменения с активностью АМПА и НМДА механизмов обнаружены при увеличении концентрации D-глюкозы до 14 мМ. Следует отметить, что АМПА-зависимые механизмы были более устойчивы, чем НМДА-зависимые механизмы (рис. 2). Испытания других более высоких концентраций (17, 20, 22, 25 мМ) D-глюкозы, которые соответствуют состоя-

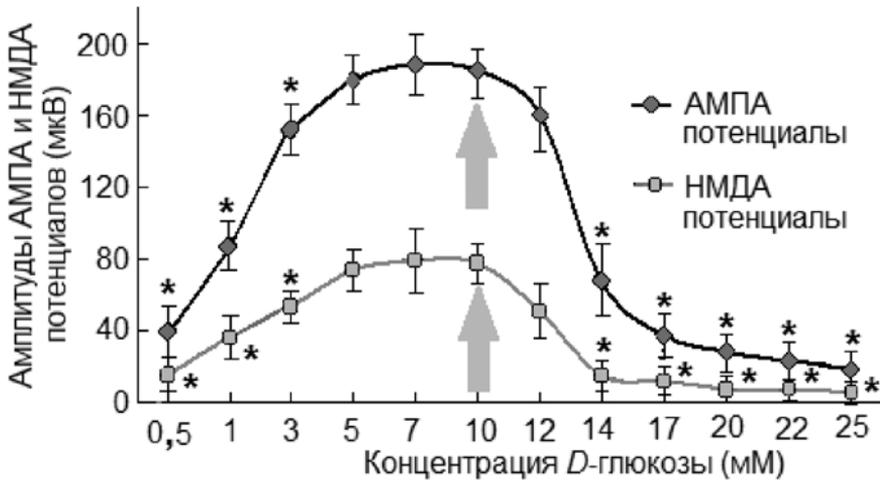


Рис. 2. Эффекты воздействия D-глюкозы в различных концентрациях на амплитуды АМПА и НМДА потенциалов.

Примечание: стрелками указана контрольная концентрация D-глюкозы. Эффекты каждой концентрации D-глюкозы изучались на отдельной группе срезов ($n=7$). Каждая точка на кривых представляет собой усредненные значения (мкВ). Различия амплитуд АМПА и НМДА потенциалов по сравнению с контрольными значениями определяли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$ (*).

Fig. 2. D-glucose effects in various concentrations on the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials.

Note: the arrows indicate the control concentration of D-glucose. The effects of each concentration of D-glucose were studied on a separate group of slices ($n=7$). Each point on the curves represents the mean values (μV). Differences in the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials compared to the control values were determined using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney U-test, $p \leq 0.05$ (*).

нию комы, выявили монотонный характер изменений АМПА и НМДА механизмов. Амплитуды резко снижались, и кривые изменений амплитуд АМПА и НМДА потенциалов были параллельны оси абсцисс. Эти данные указывают, что активности ионотропных глутаматергических рецепторов ингибируются при высоком уровне D-глюкозы. Восстановить активность этих механизмов не удалось при отмывании контрольным р-ром D-глюкозы (10 мМ), что свидетельствует о необратимости процессов ингибирования.

Следующий этап работы заключался в исследовании эффектов различных концентраций D-глюкозы на развитие ДПП, поскольку в клинике выявлено существенное снижение процессов обучения и памяти

при диабете. Известно, что НМДА рецепторы «ответственны» за синаптическую пластичность в срезах обонятельной коры мозга [2].

При воздействии на срезы контрольной концентрации D-глюкозы (10 мМ) возникла стабильная ДПП с фазой индукции 5 мин и длительностью ДПП 70 мин (рис. 3). Нормогликемическая концентрация D-глюкозы (1 мМ) вызывала только кратковременное увеличение НМДА потенциалов на 26% по сравнению с состоянием до тетанизации. Эффекты влияния D-глюкозы (3 мМ) проявлялись только в развитии фазы индукции ДПП (5 мин). Затем амплитудные значения ДПП снижались во временном интервале 10–40 мин, что указывает на развитие сохраняющей-

ся посттетанической депрессии (ПДД), что свидетельствует о необратимости угнетения (рис. 3). Данные на кривой при этой концентрации D-глюкозы достоверно отличаются от значений контрольной кривой (U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$).

Особый интерес вызывают данные о развитии ДПП при «критической» концентрации D-глюкозы 14 мМ — состояние комы (рис. 3). Фаза индукции ДПП была до 5 мин, но амплитудные значения были меньше по сравнению с действием D-глюкозы 3 и 10 мМ.

Во временном интервале 5–20 мин увеличивалась амплитуда НМДА потенциалов, которую следует рассматривать как крат-

ковременную потенциацию. С 20–40 мин наблюдалось прогрессивное снижение амплитуд ДПП, которое можно расценить как депрессию (рис. 3). В этом временном интервале данные статистически отличаются от значений контрольной кривой (U-критерия, Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \geq 0,05$).

Цель следующей серии опытов заключалась в обнаружении вещества, протектирующего глутаматергические рецепторы от негативных влияний диабетической/коматозной концентрации D-глюкозы (14 мМ). В качестве протектора был использован БТШ70. Протективный эффект белка оценивался на сохранение активности

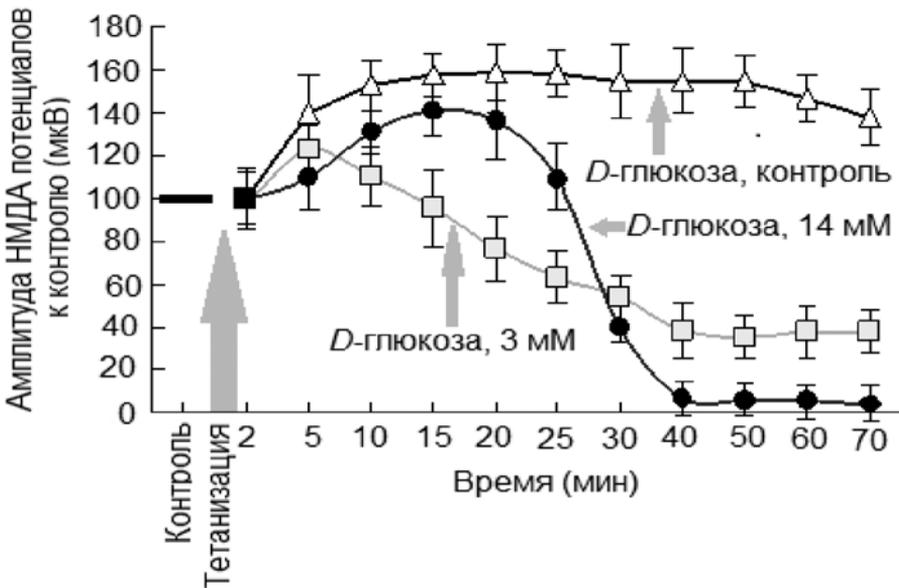


Рис. 3. Эффекты критически важных концентраций D-глюкозы (3, 14 мМ) по сравнению с контрольной концентрацией (10 мМ) на развитие ДПП НМДА механизмов.

Примечание: каждая точка на кривых — суммарное значение при действии концентрации D-глюкозы 3 мМ (n=5); 10 мМ (n=6); 14 мМ (n=7). Различия амплитуд НМДА потенциалов по сравнению со значениями при концентрации D-глюкозы 10 мМ (контроль) определяли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$. Подробности статистического анализа приведены в тексте.

Fig. 3. Effects of critically important concentrations of D-glucose (3, 14 mM) compared against the control concentration (10 mM) on the development of DPP of NMDA mechanisms.

Note: each point on the curves is the total value under the action of a D-glucose concentration of 3 mM (n=5); 10 mM (n=6); 14 mM (n=7). Differences in the amplitudes of NMDA potentials compared with the values at a D-glucose concentration of 10 mM (control) were determined using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney U-test, $p \leq 0.05$. Details of the statistical analysis are given in the text.

НМДА механизмов (НМДА потенциалы). Последовательность экспериментов описана в разделе «Материалы и методы» и показана на рис. 4. Проведенные эксперименты показали, что предварительная инкубация срезов БТШ70 протектировала амплитуду НМДА потенциалов от ингибирующего влияния «коматозной» концентрации D-глюкозы 14 мМ (76 мкВ, контроль *vice versa* 67 мкВ, БТШ70 + D-глюкоза; $U=12$, $n=7$, $p \leq 0,05$) (рис. 4). Протективный эффект белка, как показали исследования, сохранялся и при отмывании срезов от воздействия БТШ70 и D-глюкозы (76 мкВ, контроль *vice versa* 78 мкВ, БТШ70 + D-глюкоза; $U=11$, $n=7$, $p \leq 0,05$) (рис. 4).

Обсуждение результатов

Таким образом, проведенные нами исследования показывают, что активация ионотропных глутаматергических АМПА и НМДА рецепторов происходит трехфазно. В первой фазе при действии нормогликемических концентраций D-глюкозы (0,5; 1 мМ) активности АМПА и НМДА механизмов были ингибированы, очевидно, за счет недостаточного энергетического обеспечения. Эти данные указывают на развитие гипогликемии и ишемического состояния нейронов мозга. Однако следует отметить, что при этих концентрациях D-глюкозы АМПА и НМДА механизмы продолжают выполнять свои функции. Они генерируют

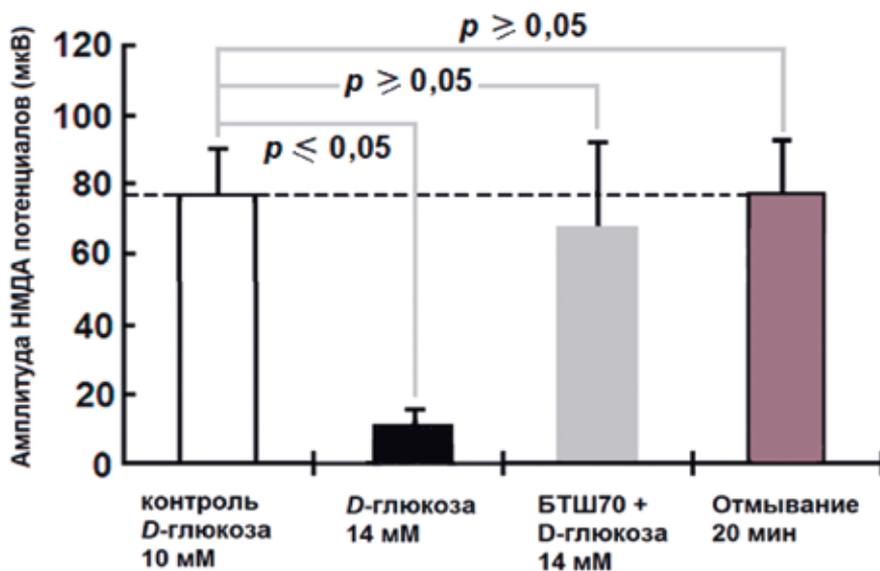


Рис. 4. БТШ70 (70 мкг/мл) защищает активность НМДА механизмов при действии высокой концентрации D-глюкозы (14 мМ).

Примечание: данные представляют собой средние значения ($n=7$). Различия амплитуд НМДА потенциалов по сравнению со значениями при концентрации D-глюкозы 10 мМ (контроль) определяли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$. Пунктирная линия — уровень значений амплитуд при действии контрольной концентрации D-глюкозы (10 мМ).

Fig. 4. БТШ70 (70 $\mu\text{g/ml}$) protects the activity of NMDA mechanisms under the influence of an evaluated concentration of D-glucose (14 mM).

Note: the data represent mean values ($n=7$). Differences in the amplitudes of NMDA potentials compared to the values at a D-glucose concentration of 10 mM (control) were determined using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney U-test, $p \leq 0,05$. The dotted line is the level of amplitude values under the influence of the control concentration of D-glucose (10 mM).

электрические потенциалы и транслируют их другим нейронам в кортикальной нейросети, хотя и в редуцированном виде. При дальнейшем увеличении концентрации D-глюкозы (3, 5 мМ) (первая фаза) активности АМПА и НМДА рецепторов возрастают. Во второй фазе в узком диапазоне действия D-глюкозы (7, 10 мМ) активности АМПА и НМДА рецепторов были максимальными и стабильными, что указывает на максимальное обеспечение работы АМПА и НМДА механизмов. Отметим, что обнаруженные нами изменения активности АМПА и НМДА рецепторов развиваются при действии концентраций D-глюкозы во второй фазе и в клинике рассматриваются как гипергликемические. Вероятно, в таких диапазонах концентраций D-глюкозы развивается эксайтотоксичность, которая характеризуется выделением избыточных концентраций медиатора глутамата из синаптических терминалей и необратимым нарушением функционирования АМПА и НМДА механизмов. Такое предположение подтверждается тем, что в гиппокампе обнаружено резкое повышение концентрации глутамата во внеклеточной среде и возникновение гиперактивности на ранней стадии развития диабета [10].

В третьей фазе при действии D-глюкозы (14 мМ и более) усиливается гипергликемическое ингибирование АМПА и НМДА механизмов. При интерпретации полученных данных можно говорить, что гипергликемические изменения АМПА и НМДА механизмов сначала активируются, затем необратимо блокируются.

В свете представленных экспериментальных данных возникает вопрос. Почему в настоящем исследовании контрольный оптимальный диапазон концентрации D-глюкозы был 10 мМ, тогда как в клинике принято считать, что верхний уровень нормального уровня D-глюкозы в крови составляет 5,5–6,0 ммоль/л? Уровень D-глюкозы больше 15,2 ммоль/л и выше рассматрива-

ется как возникновение сахарного диабета [21]. Это противоречие объясняется тем, что в целом организме регуляция обмена D-глюкозы осуществлялась другими тканями: печенью, поджелудочной железой (β -клетки), почками, поперечнополосатыми мышцами. В срезах мозга такая системная регуляция D-глюкозы отсутствует, что делает этот экспериментальный объект оптимальным для исследования процессов начальных стадий реакции глутаматных рецепторных механизмов в «чистом» виде. Кроме того, установлено, что оптимальный диапазон D-глюкозы для нормального и длительного (10–12 ч) функционирования срезов мозга составляет 10 мМ. Такая концентрация D-глюкозы принята нами в качестве контрольной.

Трехфазный характер возрастающих концентраций D-глюкозы подтвердился в другой серии исследований при изучении ДПП, которую рассматривают как проявление процессов неассоциативного обучения и формирования памяти [21]. Отметим, что многие исследователи обнаружили негативные влияния избыточных доз глюкозы на высшие формы деятельности нервной системы — обучение и память [6, 19, 21], что указывает на формирование когнитивных нарушений.

В настоящей работе мы обнаружили, что ДПП значительно изменялась в концентрации D-глюкозы 14 мМ по сравнению с контрольной концентрацией углевода 10 мМ. Это проявлялось в уменьшении временных и амплитудных значений фазы индукции ДПП. Однако при этом развивалась кратковременная потенциация в течение 10 мин. Затем она трансформировалась в стабильную депрессию, развитие которой свидетельствует об ингибировании процессов обучения и формирования следов памяти. Увеличение концентрации D-глюкозы во внеклеточной среде до 20–25 мМ блокировало развитие ДПП. Нарушения развития ДПП в срезах мозга подтверждаются

результатами исследования на срезах гиппокампа крыс с экспериментально вызванным диабетом [5, 9, 18, 20], а также в нейронах соматосенсорной коры мышей с стрептозотоциновым диабетом [10, 11, 21].

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при низкой концентрации углевода (1, 3 мМ) не выявились основные признаки ДПП: фаза индукции и кратковременная потенциация. По нашему мнению, это свидетельствует о том, что процессы обучения и памяти блокируются при развитии этого вида диабета. Такой вывод подтверждается результатами нарушения памяти у крыс при моделировании диабета первого типа [6].

Мы задались вопросом, возможно ли нормализовать функции глутаматергических механизмов при больших гипергликемических концентрациях D-глюкозы (14 мМ и более)? Ранее нами было выявлено, что белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) эффективно протектировал активность АМПА и НМДА-зависимых механизмов от негативных влияний «тяжелой» 10 мин аноксии [3].

Эту гипотезу мы проверили на наиболее уязвимых к действию цитотоксических факторов — НМДА механизмах при регистрации НМДА потенциалов. Результаты исследований выявили, что предварительная инкубация срезов с БТШ70 способствовала сохранению активности НМДА механизмов от угнетающего влияния гипергликемической концентрации D-глюкозы (14 мМ). Эти данные, по нашему мнению, свидетельствуют об эффективной защите НМДА механизмов БТШ70 при развитии такой стадии диабета. Следует подчеркнуть, что протективный эффект белка сохраняется и при отмывании срезов от воздействия БТШ70 и D-глюкозы.

Подводя итог полученным данным, на вопрос, поставленный выше, о возможности сохранить нормальное функционирование глутаматергических механизмов при дейст-

вии высоких концентраций, можно ответить утвердительно. Этот вывод подтверждается данными о протективных эффектах других веществ, например эксендина-4, который является структурным аналогом глюкагоноподобного пептида-1 у крыс с развитием стрептозотоцинового диабета [24]. Нейропротекторный эффект обнаружен при испытании 3',4'-дигидроксибензилгликоля у крыс с диабетом первого типа [17].

Следует отметить, что существуют вещества эндогенного происхождения без негативных последствий с потенциальным протективным вектором действия. Такие, например, как КРФ-подобный белок мистиксин, который защищал глутаматные рецепторы от тяжелой аноксии (10 мин) [16]. Мы уверены, что будут найдены другие эффективные протекторы для защиты глутаматергических механизмов в мозге от негативных влияний развития диабета.

Заключение

Таким образом, мы на срезах мозга имитировали начальные стадии развития гипергликемии при действии различных концентраций D-глюкозы. Обнаружено, что ионотропные глутаматергические рецепторы (АМПА и НМДА) нелинейным (трехфазным) образом реагируют на действие D-глюкозы при увеличении концентраций. При малых концентрациях возникает ингибирование, при средних оптимальных (10 мМ) значениях — максимальная активация; при больших — блокада активностей АМПА и НМДА механизмов. Неассоциативная модель обучения и памяти — ДПП успешно развивалась только при оптимальной концентрации D-глюкозы. Удалось выявить, что БТШ70 эффективно протектировал активности АМПА и НМДА механизмов от негативного действия высокой концентрации D-глюкозы. Для клиники важно, что полученные данные раскрывают различные этапы развития процессов сахарной гипергликемии в нервной системе,

где «главный удар» принимают на себя АМПА и НМДА механизмы. Применение данной модели дает возможность провести скрининг фармакологических препаратов,

защищающих нейрональные механизмы, как на начальных этапах развития разных стадий сахарного диабета, так и для изучения последствий диабетической нейропатии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р. *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования*. Л.: Наука, 1986:127. [Mityushov M.I., Emelianov N.A., Mokrushin A.A., Voyner I.A., Bagaeva T.R. *Perezhivayushchij srez mozga kak ob'ekt nefrofiziologicheskogo i neirohimicheskogo issledovaniya* [The surviving brain slice as an object of neurophysiological and neurochemical research]. Leningrad: Nauka Publ., 1986:127. (In Russian)].
2. Мокрушин А.А. *Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре: дис. ... д-ра биол. наук*. СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1997:397. [Mokrushin A.A. *Peptid-zavisimye mekhanizmy neironal'noj plastichnosti v obonyatel'noj kore* [Peptide-dependent mechanisms of neuronal plasticity in the olfactory cortex]: diss. ... Dr. of Biol. Sci. St. Petersburg: I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 1997:397. (In Russian)].
3. Мокрушин А.А., Павлинова Л.И., Гужова И.В., Маргулис Б.А. Эффекты экзогенного белка теплового шока (HSP70) на глутаматергическую синаптическую передачу в обонятельной коре мозга крыс *in vitro*. *Доклады Академии Наук*. 2004;395(4):551–553. [Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Guzova I.V., Margulis B.A. Effekty ekzogennoho belka teplovogo shoka (HSP70) na glutamatergicheskuyu sinapticheskuyu peredachu v obonyatel'noj kore mozga kryis *in vitro* [Effects of Exogenous heat shock protein (Hsp70) on glutamatergic synaptic transmission in rat olfactory cortex *in vitro*]. *Dokl. Acad. of Sci.* 2004;395(4):551–553. (In Russian)].
4. Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;2(2):214–217. [Mokrushin A.A., Borovikov S.E. Ustanovka dlya izucheniya gipotermicheskikh effektoy na perezhivayushchih srezah mozga teplokovnykh [Installation for the study of hypothermic effects on the brain surviving slices of warm-blooded]. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnykh fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied Fundamental Research]. 2017;2(2):214–217. (In Russian)].
5. Biessels G.J., Kamal A., Ramakers G.M. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996;45:1259–1267.
6. Brossaud J., Bosch-Bouju C., Marissal-Arvy N., Campas-Lebecque M.-N., Webster S.P., Walker B.R., Moisan W.-P. Memory deficits in a juvenile rat model of type 1 diabetes are due to excess 11 β -HSD1 activity, which is upregulated by high glucose concentrations rather than insulin deficiency. *Diabetologia*. 2023;66(9):1735–1747. DOI: 10.1007/s00125-023-05942-3.
7. Cukierman T., Gerstein H.C., Williamson J.D. Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia*. 2005;48:2460–2469. DOI: 10.1007/s00125-005-0023-4.
8. Di Mario U., Morrano S., Valle E. Electrophysiological alteration of the central nervous system in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 1995;11:259–277.
9. Fang F., Xu L., Zhang R., Liu L., Tang M. Neuronal Hyperactivity in the Hippocampus during the Early Stage of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Mice. *Neuroendocrinology*. 2024;114(4):356–364.
10. Garcia-Magro N., Mesa-Lombardo A., Barros-Zulaica N., Nuñez Á., Artola A., Kamal A., Gispen W.H. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2005;22:169–178. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04205.x.
11. Garcia-Magro N., Mesa-Lombardo A., Barros-Zulaica N. Impairment of synaptic plasticity in the primary somatosensory cortex in a model of diabetic mice. *Front Cell Neurosci.* 2024;30:18–25. DOI: 10.3389/fncel.2024.1444395.
12. Gispen W.H., Biessels G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 2000;23:542–549.
13. Gruettter R., Novothy E.J., Boulware S.D., Rothman D.L. Direct measurement of brain glucose concentrations in humans by 13 C NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89:1109–1112.
14. Hristov M., Nankova A., Andreeva-Gateva P. Alterations of the glutamatergic system in diabetes mellitus. *Metab. Brain Dis.* 2023;39(2):321–333. DOI: 10.1007/s11011-023-01299-z.
15. Liu D., Zhang H., Gu W., Zhang M. Effects of exposure to high glucose on primary Cultured hippocampal neurons: involvement of intracellular ROS accumulation. *Neurological Science*. 2014;35(6):831–837.
16. Mokrushin A.A. Mystixin-7 mini-peptide protects ionotropic glutamatergic mechanisms against oxygen-glucose deprivation *in vitro*. *Neuropeptides*. 2015;54:163–168.
17. Rodriguez-Perez M.D., Perez de Algaba I., Martin-Aurioles E. Dihydroxyphenylglycol In Type-1-like Diabetic Rats-Influence of the Hydroxytyrosol/3',4-dihydroxyphenylglycol Ratio. *Nutrients*. 2022;14(6):1146. DOI: 10.3390/nu14061146.

18. Sasaki-Hamada S., Sacai H., Oka J.-I. Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-treated rats. *Neuroscience*. 2012;227:293–304. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.081.
19. Silver I.A., Ereciaska M. Extracellular Glucose Concentration in Mammalian Brain: Continuous Monitoring of Changes during Increased Neuronal Activity and upon Limitation in Oxygen Supply in Normo-, Hypo-, and Hyperglycemic Animals. *The Journal of Neuroscience*. 1994;14(8):5068–5076.
20. Trudeau F., Sylvain G., Guy M. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;490(1–3):177–186. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.02.055.
21. Valastro B., Cossette J., Lavoie N., Gagnon S., Trudeau F. Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002;45:642–650. DOI: 10.1007/s00125-002-0818-5.
22. Volianskis A., France G., Jensen M.S., Bortolotto Z.A., Jane D.E., Collingridge G.L. Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Research*. 2015;1621:5-16. DOI: 10.1016/J.Brainres.2015.01.016.
23. Yin H., Wang W., Yu W., Li J. Changes in Synaptic Plasticity and Glutamate Receptors in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. *Journal of Alzheimer's disease*. 2017;57(4):1207–1220. DOI: 10.3233/JAD-160858.
24. Zanotto C., Hansen F., Galland F., Batassini C. Glutamate-tergic Alterations in STZ-Induced Diabetic Rats Are Reversed by Exendin-4. *Molecular Neurobiol.* 2019;56(5):3538–3551. DOI: 10.1007/s12035-018-1320-5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Мокрушин Анатолий Александрович, д.б.н.,
ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН;
e-mail: mok@inbox.ru

Anatoliy A. Mokrushin, Dr. Sci. (Biol.), I.P. Pavlov
Institute of Physiology of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: mok@inbox.ru