

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՍՈՒՔԻԱՍՅԱՆ ԼԻԼԻԹ ՍԱՂԱԶԻ

**ՖՐՈՒԿՏՈԶՈՎ ՀՐԱՀՐՎԱԾ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԽԱՆՎԱՐՈՒՄՆԵՐԻ
ԵՎ ՀԱԿԱՆՈԼԻՆԵՍԹԵՐԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՄԲ ԲՈՒՍԱԿԱՆ
ՄԻՋՈՑՆԵՐՈՎ ՊՐՈՏԵԿԿՑԻԱՅԻ ՆԵՅՐՈՆԱՅԻՆ ԵՎ ԱՆՈԹԱՅԻՆ
ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԸ**

Գ. 00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական
գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂԱԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2023

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. Л.А. ОРБЕЛИ

СУКИАСЯН ЛИЛИТ МАГАКОВНА

**НЕЙРОНАЛЬНЫЕ И ВАСКУЛЯРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФРУКТОЗОЙ
ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ И ПРОТЕКЦИИ
РАСТИТЕЛЬНЫМИ СРЕДСТВАМИ С АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09 – «Физиология человека и животных»

ЕРЕВАН – 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գիտական խորհրդով:
Գիտական ղեկավար՝

Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր
Վ.Ա. Չավուշյան-Պապյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր
պրոֆ. Վ.Յ. Սարգսյան
Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
Ա.Վ. Ոսկանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի Պետական Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կկայանա 2023թ. մարտի 30-ին ժամը 13⁰⁰-ին ՀՀ
ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, ֆիզիոլոգիայի 023
մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, Երևան, Օրբելի եղբ. փող. 22):
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գրադարանում և www.physiol.sci.am կայքում:
Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2023թ. փետրվարի 14-ին:

023 մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու

Ն.Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на ученом совете Института физиологии им. Л. А. Орбели НАН
РА

Научный руководитель:

доктор биологических наук
В. А. Чавушян-Папаян

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
проф. В.А. Саргсян
кандидат биологических наук
А.В. Восканян

Ведущая организация:

Ереванский Государственный Университет

Защита диссертации состоится 30 марта 2023г. в 13⁰⁰ч. на заседании специализированного совета
023 по Физиологии, в Институте физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА (РА, 0028, г. Ереван, ул.
бр. Орбели 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. Л. А. Орбели НАН
РА и на сайте www.physiol.sci.am.
Автореферат разослан 14 февраля 2023г.

Ученый секретарь специализированного совета 023
кандидат биологических наук

Н.Э. Тадевосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время фруктоза выступает в качестве неблагоприятного диетического компонента. Известно, что длительное потребление фруктозы ассоциировано с метаболическим синдромом (МС), повышением риска развития и усугубления континуума сахарного диабета типа 2 (СД2) [Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh., 2016], нарушением гомеостаза сердечно-сосудистой системы [Lehnen A. et al., 2013; Stanhope et al., 2015] и выраженной нейротоксичностью [Fargoqi, 2013] со всеми вытекающими последствиями, в частности, деменцией [Stephan, et al., 2010; Parazaifropoulou A, 2020]. Экспериментальной моделью для имитации человеческих симптомов МС выступают грызуны, длительно потребляющие фруктозой-обогащенную диету [Panchal S., Brown L. 2011; Lozano I. et al., 2016; Toop C., Gentili Sh., 2016].

Механизмы, лежащие в основе развития когнитивной дисфункции у больных СД2, до конца не выяснены [Milstein J., Ferris H., 2021; Casagrande S., et al., 2021]. Доказано, что в процесс вовлекаются окислительный стресс, митохондриальный дисметаболизм, инсулиновая резистентность, нейровоспаление [Milstein J., Ferris H., 2021; James D. et al., 2021; Maciejczyk M. et al., 2019; Sergi D. et al 2019], а строгий контроль уровня гликемии у пациентов с СД2 – важный фактор для снижения возможности развития деменций [Srikanth V. et al., 2020; Zheng B. et al., 2021].

Центральным патогенетическим звеном МС является эндотелиальная дисфункция (ЭД). Индуцированная фруктозой ЭД развивается посредством задействования многих механизмов, включая снижение образования оксида азота, увеличение количества активных форм кислорода (АФК) и повышенного синтеза вазоконстрикторов [Tran et al., 2020]. Обнаружена тесная взаимосвязь между нейродегенеративными заболеваниями и триадой патологических состояний – МС, СД2 и микрососудистая дисфункция (МСД) [Coen D., 2018]. Учитывая то, что макро- и микрососудистая дисфункция является интегральным звеном патогенеза развития нейродегенеративной патологии среди пациентов с СД2, коррекция и поддержание нормогликемии становится основной тенденцией в модуляции изменений со стороны микрососудистого русла, тем самым модифицируя риск развития сосудистой деменции. Данная концепция позволяет рассматривать новые мишени фармакологического менеджмента и профилактики нейропатологии среди пациентов с СД2 с учетом высокого риска развития осложнений. В последнее время среди широкого спектра применяемых лекарственных средств, из экономических соображений все более приоритетным становится применение средств растительного происхождения. Следовательно, необходимы стратегии по улучшению биологической активности лекарственных средств растительного происхождения с целью оптимизации гликемического контроля, коррекции МСД головного мозга и пластичности, связанных с развитием МС.

Наряду с уже имеющимися препаратом – диабетомом в качестве возможного стабилизатора нейрососудистой патологии, вызванной МС в рамках настоящей диссертационной работы были исследованы новые точки приложения и использования противодиабетического фитосбора «Диабефит» (с гипотезируемой активностью ингибитора ацетилхолинэстеразы (иАХЭ)) и галантамина (клинически одобренного препарата природного происхождения с активностью иАХЭ для лечения деменций). Выявлены корреляция между изменениями холинергической системы мозга и МС, а также вовлеченность ее в воспалительные процессы при МС, вызывающие когнитивный спад как результат нейровоспаления, aberrантной протеиновой агрегации и синаптической дисфункции [Martinelli I. et al., 2017]. Более того, на модели $\alpha 7$ -nAChR knock-out ($\alpha 7^{-/-}$) мышей выявлена важная роль $\alpha 7$ -nAChR в гомеостазе глюкозы: конститутивный недостаток $\alpha 7$ -nAChR запускает новый путь, влияющий на патогенез МС и СД2 [Gausserès B., et al., 2020].

Абляция холинергических нейронов, отходящих от базальных отделов переднего мозга (и парасимпатических ганглиев) и иннервирующих церебральные кровеносные сосуды снижает региональный мозговой кровоток [Toda, Okamura, 2003], одновременно увеличивая отложение β -амилоида ($A\beta$) в них [Roher et al., 2000], что особенно актуально при болезни Альцгеймера (БА). К тому же известно, что индуцированная диетой резистентность к инсулину увеличивает патологию БА [Hascup et al., 2019]. У пациентов с БА, принимающих лечение препаратами с активностью иАХЭ наблюдается значительное дозозависимое увеличение мозгового кровотока [Lojkowska et al., 2003], что в свою очередь повышает функциональный потенциал нейронов [Moretti et al., 2002], обеспечивая холинергическое многообразие (различия в нацеливании аксонов, субпопуляционной функции и электрофизиологических свойствах). Холинергические нейроны nucleus basalis magnocellularis (NBM), иннервирующие большую часть холинергической коры, в разной степени уязвимы при различных патологиях, вызывающих деменцию [Geula et al., 2021]. Холинергические системы действуют комплексными путями, а модуляция их сигналов может увеличивать потенциал выживания нейронов и оптимальную функцию коры посредством изменений в церебральном кровотоке и метаболизме глюкозы. Кроме того, нарушение инсулинового сигналинга и метаболизма глюкозы в головном мозге при СД2 и ассоциированные с этим нейровоспаление и изменение в продукции нейротрансмиттеров [Papaziforopoulou A., 2020] являются также патогенетическими звеньями и БА. С учетом того, что в настоящее время иАХЭ являются лицензированными средствами для симптоматического лечения БА [Magucci et al., 2021], рассмотрение противодиабетического фитосбора (Диабефита) с антихолинэстеразной активностью в качестве лекарственного средства природного происхождения, защищающего структуры мозга от воздействия фруктозой-опосредованных микрососудистых и нейрональных нарушений представляет собой актуальное научно-исследовательское направление. Результаты исследования широкого спектра активности данного фитосбора в сравнении с диабетомом и галантамином (препаратами первой линии при лечении диабета и деменций, соответственно) будут способствовать лучшему пониманию потенциальных механизмов уязвимости холинергических нейрональных цепей (проекций) при МС и их значения для модификации течения нейрососудистой патологии.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования явилось изучение электрофизиологических показателей церебральных холинергических проекций и васкулярной функции в условиях: а) фруктозой индуцированных метаболических нарушений у грызунов и б) терапии с применением фитосбора «Диабефит» и галантамина.

В задачи исследования входят:

- ✓ Охарактеризовать активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в плазме крови, в nucleus basalis magnocellularis (NBM) и энторинальной коре у крыс в норме и под воздействием галантамина и комбинированного фитосбора «Диабефит».
- ✓ Охарактеризовать активность малондиальдегида (МДА), супероксиддисмутазы (СОД), оксида азота (NO), эндотелина (ЭТ-1) в плазме крови у крыс при фруктозо-индуцированном нарушении метаболизма и в условиях терапии фитосбором «Диабефит».
- ✓ Оценить эффекты фитосбора «Диабефит» на некоторые показатели крови, сердечно-сосудистой и дыхательной систем (уровень глюкозы, артериальное давление, частота сердечных сокращений, частота дыхательного ритма) в условиях длительного потребления фруктозо-обогащенной диеты у крыс;
- ✓ Оценить состояние микроциркуляторного русла префронтальной коры мозга в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции «Диабефитом», галантамином и диабетомом.
- ✓ *In vivo* экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов медиальной префронтальной коры (mPFC) при высокочастотной стимуляции (ВЧС) NBM, в условиях

интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции «Диабефитом», галантамином и диабетоном.

✓ *In vivo* экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов латеральной энторинальной коры (ЛЕС) при ВЧС NBM, в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции «Диабефитом» и галантамином.

Научная новизна. В работе представлены новые данные об однонаправленной тенденции понижения активности АХЭ в плазме крови, в нейронах NBM и ЛЕС под воздействием галантамина и исследуемого фитосбора «Диабефит», что указывает на идентичную антихолинэстеразную активность галантамина (известного иАХЭ) и фитосбора.

Получены новые данные о фруктозо-индуцированной дестабилизации баланса антиоксидантной и прооксидантной систем (СОД и МДА), а также оценка фруктозо-индуцированной ЭД на основе сдвигов концентраций NO и ЭТ-1 (показатели нитрозативного стресса и вазоконстрикции): фитосбор «Диабефит» индуцирует активацию антиоксидантных систем, а также компенсаторных эффектов, направленных на устранение ЭД.

Представлены новые данные о дестабилизации некоторых показателей крови, сердечно-сосудистой и дыхательной систем в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы, а также регуляторной роли фитосбора «Диабефит».

Впервые оценено состояние капиллярного русла коры мозга у крыс и выявлены заниженные показатели плотности и среднего размера микрососудов в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы. Представлены новые данные о сравнительной оценке ангиопротекторных потенциалов «Диабефита», галантамина и диабетона.

Впервые выявлено, что динамическая активность нейронных сетей (холинергических проекций NBM–mPFC и NBM–ЛЕС), поддерживаемая компенсаторными механизмами синаптического гомеостаза, приобретает иную интегрированность в условиях фруктозо-индуцированной диабетической нейропатии. Впервые методом экстраклеточной регистрации отдельных нейронов mPFC и ЛЕС оценена кратковременная пластичность (КВП) у крыс на фруктозной модели СД2, а также сравнительная эффективность протекции галантамином (известным иАХЭ) и фитосбором «Диабефит» в локальных цепях с холинергическими проекциями с целью выявления характерных показателей пластичности при фруктозо-индуцированных метаболических нарушениях.

Впервые показано, что баланс возбуждительных и ингибиторных ответов, вызванных ВЧС NBM, и интенсивность таковых, указывающие соответственно на входные/выходные параметры цепей и состояние нейротрансмиссии, коррелируют с идентичными тенденциями под воздействием галантамина и эндемического антидиабетического растительного сбора «Диабефит».

Таким образом, в рамках представленной работы впервые показано, что в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы однонаправленные протекторные эффекты галантамина и фитосбора «Диабефит» осуществляются благодаря установлению и стабилизации компенсаторного статуса метаболизма глюкозы, окислительно-восстановительной и микрососудистой систем, гомеостатической пластичности корковых холинергических локальных сетей, которые в целом являются ключевыми для интегративной когнитивной функции.

Научно-практическое значение. На экспериментальной модели грызунов, интенсивно и длительно потребляющих 50% водный раствор фруктозы (для имитации человеческих симптомов МС, вызванного интенсивным потреблением неблагоприятных пищевых продуктов) выявлены морфо-функциональные характеристики сосудистой и нейрональной дисфункции, а также особенности показателей протекторного потенциала эндемического фитосбора «Диабефит» и клинически одобренных антидиабетического препарата диабетон и галантамина (с активностью иАХЭ). Выявлены новые показатели динамической активности единичных нейронов, ответственные за компенсаторные механизмы синаптического гомеостаза, поддерживающие

сегрегированность и интегрированность холинергических сетей в условиях диабетической нейропатии. В этом контексте полученные данные открывают новые мишени холинергической терапии диабетической деменции: изучение различных проявлений гомеостатической пластичности актуально для расширения парадигм терапии.

Фундаментальное обоснование многовекторной превентивной эффективности этноботанического лекарственного фитосбора благодаря его уникальному составу и вовлечению дополнительных значимых механизмов для реализации нейро- и ангиопротекции имеет как научное медико-биологическое, так и социально-экономическое значение (в контексте рентабельного и общедоступного этнофармакологического средства для улучшения качества жизни диабетических больных), в силу чего фитосбор «Диабефит» можно рекомендовать в производственных целях в качестве биологически активной добавки.

Структура диссертации. Диссертация изложена в традиционной форме на 115 страницах и включает 21 иллюстрацию, 7 таблиц. «Литературный обзор» изложен на 21 страницах, «Результаты и их обсуждение» - на 49 страницах. Список цитируемой литературы содержит 254 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал. Состав фитосбора «Диабефит»: *Stevia rebaudiana Bertoni* - 15%; *Lycium barbarum L.* - 15%; *Ganoderma lucidum* - 15%; *Leonurus cardiac L.* - 10%; *Sambucus nigra L.* - 15%; *Smilax officinalis L.* - 8%; *Melissa officinalis L.* - 8%; *Mentha piperita L.* - 8%; *Hypericum perforatum L.* - 6%. *Stevia rebaudiana* и *Lycium barbarum* были выращены методом гидропоники в Институте проблем гидропоники им. Г. Давтяна НАН РА. Количественный состав фитосбора был идентичен широко применяемому в антидиабетических целях в Арцахе лекарственному растительному сбору в традиционно (в трех поколениях) установившихся пропорциях.

Экспериментальные группы. Эксперименты проводились на крысах альбиносах (самцы, 220±10 г) (в общем количестве n = 60). Крысы в группе Норма находились на стандартном корме и потребляли обычную питьевую воду. Крысы группы Фруктоза получали 50% (масса/объем) водный раствор диетической фруктозы (5 мг/крыса/день) вместо питьевой воды в течение 9 недель. Крысы группы Фитосбор получали 50% водный раствор диетической фруктозы вместо питьевой воды в течение 9 недель и фитосбор «Диабефит» (7,5 мг/крыса/сутки) - с кормом с 6-ой по 9-ую неделю (в течение 3 недель, ежедневно). Крысам в группе Галантамин давали 50% водный раствор диетической фруктозы вместо воды в течение 9 недель, а галантамин (Нивалин – галантамина гидробромид, Sopharma, Bulgaria) вводили в виде внутримышечной инъекции (0,25 мг/кг/сутки, в течение 3 недель, ежедневно) с 6-ой по 9-ую неделю. Крысам группы Диабетон давали 50% водный раствор диетической фруктозы вместо питьевой воды в течение 9 недель, а диабетон (0,5 мг/кг/сутки) давали с кормом с 6-ой по 9-ую неделю (3 недели, ежедневно).

Оценка артериального давления и вариабельности частоты пульса

Общую вариабельность пульсовой разницы и систолического артериального давления оценивали согласно Malliani и соавторам (1991) [Malliani A. et al., 1991].

Определение активности АХЭ в срезах головного мозга [метод Karnovsky M., Roots L., 1964]. В основе метода лежит способность тиохалина преимущественно восстанавливать феррицианид до ферроцианида. Последний соединяется с ионами Cu^{2+} с образованием нерастворимого ферроцианида меди. Ионы Cu^{2+} в среде образуют комплексы с цитратом и предотвращают образование феррицианида меди. Сложный эфир тиохалина, используемый в качестве субстрата, подвергается гидролизу АХЭ, а освобожденный тиохалин захватывается ионами Cu^{2+} , осаждаясь в виде бесцветного тиохалина меди. Последний превращается в коричневатый CuS при обработке сульфидом.

Определение активности. АХЭ в плазме крови крыс Определение активности АХЭ в плазме крови крыс (мЕд/мл) проводили колориметрическим методом с использованием набора AChEAssayKit (Abcam, cat. Number ab138871). Для измерений использовали ридер для микропланшетов SpectraMax 250 (Molecular Devices).

Определение изменений мозгового микрососудистого русла безинъекционным кальций-аденозинтрифосфат гистоангиологическим методом. Для оценки изменений внутримозгового микрососудистого русла использовали безинъекционный гистоангиологический метод Чилинга-Яна с применением аденозинтрифосфата кальция [Chilingaryan et al., 2006]. Он основан на избирательном осаждении фосфора, отщепляемого от АТФ ионами Cu^{2+} . В результате продукт реакции превращается в черный PbS. Метод идентифицирует микроциркуляторное русло различных органов при трехмерном измерении на толстых срезах (90-100 μm) и обеспечивает избирательное и четкое контрастирование сосудисто-капиллярной сети.

Методология количественного определения морфометрии капиллярной сети на основе программного обеспечения с открытым исходным кодом Fiji (Image J). В настоящее время Rust et al. (2020) описывают быстрый автоматизированный метод, основанный на программном обеспечении с открытым исходным кодом Fiji (Image J), который позволяет проводить высокопроизводительную количественную оценку различных сосудистых параметров и их изменений, в том числе при нервно-сосудистых заболеваниях у мышей и у людей [Rust et al., 2020]. Протокол позволяет выявлять патологические изменения или фармакологические эффекты на сосудистую архитектуру.

In vivo экстраклеточная электрофизиология (регистрация и анализ одиночных нейронов и интегративных показателей холинергических проекций). По завершении 9-недельного периода эксперимента крыс усыпляли гуманным образом путем глубокой анестезии уретаном (1.1 г/кг, внутривенно). Животных иммобилизовывали 1% раствором дитилина (25мг/кг, в/б). Анестезированных крыс помещали в стереотаксический аппарат, после чего применяли искусственную вентиляцию легких. Для регистрации внеклеточной спайковой активности mPFC микроэлектрод (с диаметром кончика 1–2 μm), заполненный 2М раствором NaCl, многократно погружали в мозг согласно стереотаксическим координатам (A/P +3.2мм; M/L +0.5-0.6мм; D/V +2.5-3.6мм) атласа головного мозга крысы [Paxinos, Watson 2005]. Для регистрации в IEC микроэлектрод многократно погружали соответственно координатам A/P - 9.0мм; M/L +3.5-4.0мм; D/V+3.8-4.3мм. Высокочастотную стимуляцию (ВЧС) (100 Гц в течение 1 сек) NBM проводили биполярным цилиндрическим электродом с применением прямоугольных импульсов тока длительностью 0.05 мс и амплитудой 0.10 – 0.14 мА. Электрод погружали в ипсилатеральный NBM согласно координатам атласа головного мозга крысы (A/P -1.08-1.1мм; M/L +2.8-3мм; D/V +7.4-7.8мм) [Paxinos, Watson, 2005]. Ответы оценивали в реальном времени до стимуляции (Mbs) (базовая или фоновая активность), после стимуляции (Mps) и на период ВЧС (Mhfs) (Рис. 3). Статистическую значимость неоднородности межспайковых интервалов (или частоты спайков) в указанных временных отрезках анализировали с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности АХЭ в плазме крови, в *nucleus basalis magnocellularis* (NBM) и энторинальной коре у крыс в норме и под воздействием галантамина и фитосбора «Диабефит»

Целью исследований, представленных в данной подглаве было определение возможности арцахского этно-ботанического сбора лекарственных трав «Диабефит» воздействовать на уровень активности АХЭ плазмы и головного мозга и стать полезным противодиабетическим средством с терапевтическим потенциалом для улучшения познавательной функции при диабетической деменции. Галантамин одобрен в качестве ингибитора АХЭ и рассматривается как препарат первой линии при лечении деменций, поэтому использован нами в качестве положительного контроля. Концентрация АХЭ в плазме в норме составляла 184.03 ± 1.08 мЕд/мл. Через 3 недели после перорального приема галантамина уровень АХЭ в плазме снизился до $141,06 \pm 4,41$ мЕд/мл ($p < 0.05$), а после перорального приема «Диабефита» – до 158.14 ± 0.68 мЕд/мл ($p < 0.05$). Согласно методике Карновского-Рутса при действии галантамина и «Диабефита» по сравнению с нормой в NBM изменения препитации (активности АХЭ) в мозге крыс в группах Галантамин и «Диабефит» не очевидны (Рис. 1. (1)Б, (1)В), в то время как в энторинальной коре выявлено очевидное снижение активности АХЭ (Рис. 1. (2)Б, (2)В).

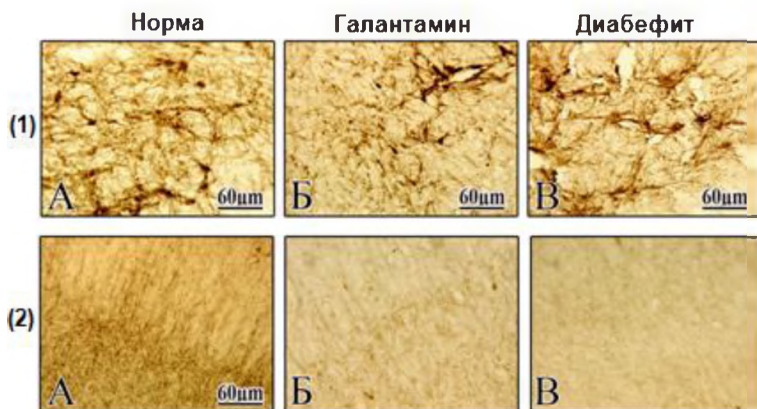


Рисунок 1 - На срезах толщиной 20 мкм показаны уровни активности АХЭ в NBM (1) и в энторинальной коре (2) крыс (по методу Карновского-Рутса).

Однако, в соответствии с оценкой отдельных параметров на основе Image-J в NBM (Таблица 1) выявляются достоверные различия между группами Норма, Норма+Галантамин, Норма+Диабефит по % Площади (или Area Fraction) (15.4 ± 0.3 % и 21.6 ± 0.8 % по отношению к 25.6 ± 0.5 % в норме; $p < 0.0001$ и $p < 0.0005$, соответственно). По средней величине серого (*Mean Gray Value*) и максимальному уровню серого (*Max Gray Level*) отличия недостоверны (Таблица 1). В энторинальной коре выявляются достоверные различия между группами Норма, Норма+Галантамин, Норма+Диабефит по % площади (23.3 ± 0.8 % и 21.8 ± 0.8 % по отношению к 27.4 ± 1.3 % в норме; $p = 0.02$ и $p = 0.002$, соответственно) и по максимальному уровню серого (226 ± 2.5 и 219 ± 3.3 по отношению к 207 ± 2.8 в норме; $p < 0.0001$ и $p = 0.01$, соответственно) (Таблица 1).

Ингибирование распада АХ в головном мозге приводит к повышению уровня медиатора и улучшению мнестических процессов, что используется для лечения как альцгеймеровской деменции, так и сосудистых когнитивных нарушений [Turani S. et al., 2016; Srivastava S. et al., 2021]. АХЭ обладает более значительной каталитической активностью при низких концентрациях АХ, что приводит к ингибированию субстрата при его высоких дозах [Lane R. et al., 2006]. В связи с этим NBM характеризуется как ядро с очень высокой концентрацией АХ по сравнению с IEC, и возможно, поэтому значимые изменения активности в IEC более выражены по сравнению с NBM.

Таблица 1. Количественное определение активности АХЭ в NBM и в энторинальной коре (IEC) в указанных группах

Группы	% Площадь	Средняя величина	Максимум
(NBM) Норма (A1)	25.6± 0.5	172.4 ± 5.0	245 ± 2.6
(NBM) Норма+Галантамин (B1)	15.4± 0.3 *	187.4 ± 6.5	246 ± 3.5
(NBM) Норма+«Диабефит» (B1)	21.6± 0.8 *	190.2 ± 10.0	247 ± 4.2
(IEC) Норма (A2)	27.4 ± 1.3	157.8 ± 7.5	207 ± 2.8
(IEC) Норма+Галантамин (B2)	23.3 ± 0.8 *	173.2 ± 5.2	226 ± 2.5 *
(IEC) Норма+«Диабефит» (B2)	21.8 ± 0.8 *	177.6 ± 10.2	219 ± 3.3 *

Примечание. Значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

* - отличия от интактной группы норма. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

Различные иАХЭ по-разному могут влиять на межбелковые взаимодействия и мультимеризацию вариантов АХЭ в дополнение к их разным потенциалам вызывать увеличение АХЭ и изменения в композиции вариантов АХЭ [Lane R. et al., 2006]. Поэтому фармакокинетические особенности, механизмы ингибирования ферментов, избирательность мозга и дифференциальная избирательность для различных молекулярных форм АХЭ также могут быть важными факторами детерминирования индивидуального клинического профиля того или иного иАХЭ. Известно, что галантамин умеренно ингибирует АХЭ и оказывает аллостерическое потенцирующее лигандное действие на никотиновые рецепторы [Xie H. et al., 2020]. Галантамин (не исключено, что и «Диабефит») является аллостерическим модулятором и взаимодействует с рецептором через сайты связывания, отличные от таковых для АХ и никотиновых агонистов и антагонистов. Возможно по этой причине в группах Галантамин и Диабефит по сравнению с нормой выявлены незначительные изменения в интенсивности АХЭ (по методу Карновского-Рутса), однако немаловажно, что таковые имеют идентичную направленность.

Многие молекулы природного сырья, такие как полифенолы, флавоноиды, дубильные вещества, антоцианидины, являются мощными иАХЭ [Roseiro L. et al., 2012; Balkis A. et al., 2015]. Полифенолы являются основными компонентами *Lycium barbarum*, обеспечивающими активность иАХЭ [Zhou, Zheng-Qun et al., 2017]. В фитосборе представлены виды семейства *Lamiaceae* с высоким содержанием природных иАХЭ [Vladimir-Knežević et al., 2014]. Спиртовые и различные экстракты из корней растения *Smilax china* проявляют ингибирующее действие на АХЭ и рекомендуются для лечения БА [Yokeshwaran A. et al., 2020]. Метанольный экстракт зверобоя продырявленного обладает значительными антихолинэстеразными и антиоксидантными

свойствами [Altun M. et al., 2013]. *Ganoderma lucidum* богата тритерпеноидами и полисахаридами, балансирующими про- и антиоксидантный статус. Выделенные из *Ganoderma lucidum* тритерпены и полисахариды проявляют заметный антихолинэстеразный эффект [Cör D. et al., 2018].

Определение активности малондиальдегида (МДА), супероксиддисмутазы (СОД), оксида азота (NO), эндотелина (ЭТ-1) в плазме крови у крыс при фруктозо-индуцированном нарушении метаболизма и в условиях терапии фитосбором «Диабефит»

Таблица 2. Концентрации МДА, СОД, NO, ЭТ-1 в опытных группах

Показатель	Группа Контроль (интактные крысы)	Группа Фруктоза	Группа Фруктоза+ «Диабефит»
МДА (Ед/мг)	22.00±2.47	110.59±14.60	77.86±6.74
СОД (Ед/мг)	32.34±1.93	16.31±1.46	29.72±2.30
NO (ммоль/л)	22.54±0.96	35.11±2.22	26.15±1.44
ЭТ-1 (пг/мл)	2.91±0.01	4.63±0.20	3.36±0.27

МДА был выбран в качестве маркера, отражающего усиление процессов перекисного окисления липидов и оксидативного стресса. По сравнению с контрольной группой в группе Фруктоза выявлено резкое увеличение уровня МДА (на 403%). Напротив, в группе Фруктоза+Диабефит снижение этого показателя, вызванное «Диабефитом», было на 30% (по сравнению с группой Фруктоза) (Таблица 2). В данном исследовании в качестве маркера антирадикальной защиты была выбрана СОД. Выявлено, что Фруктоза подавляет активность СОД, а «Диабефит» оказывает стимулирующий эффект СОД. Согласно современным представлениям, эндотелий представляет собой целостную морфофункциональную единицу с выраженной нейро-иммуно-эндокринной активностью [Incalza M. et al., 2018]. Нарушение ее целостности приводит к дестабилизации секреторной функции эндотелия, – к ЭД [Deanfield J. et al., 2007], для оценки которой были выбраны такие маркеры, как NO и ЭТ-1. Так, согласно полученным данным, в группе Фруктоза выявлено повышение уровня NO на 56% по отношению к соответствующим показателям в группе Контроль, тогда как в группе Фруктоза+Диабефит установлено его достоверное снижение (на 25%) по отношению к соответствующим показателям в группе Фруктоза (Таблица 2). В патологических условиях повышение уровня NO приводит к развитию «нитрозативного стресса» с последующим образованием радикала пероксинитрита, запускающего образование других реакционноспособных форм азота [Cheng H. et al., 2020]. Изменения концентрации ЭТ-1 значимы с учетом его выраженного сосудосуживающего и дерегулирующего эффекта [Houde M., et al., 2016]. В группе Фруктоза выявлено достоверное увеличение уровня ЭТ-1 (на 59,1%) по отношению к аналогичным показателям в контрольной группе, а в группе Фруктоза+Диабефит снижение уровня ЭТ-1 составило 27,4% по отношению к показателю в группе Фруктоза (Таблица 1). Результаты дают основание утверждать, что диеты с высоким содержанием фруктозы индуцируют АФК-зависимое повреждение и развитие ЭД, а фитосбор «Диабефит» обладает специфическим антиоксидантным потенциалом, служит индуктором продукции СОД, а также модулятором и стабилизатором выработки МДА и NO. Диабефит-индуцированное снижение NO и ЭТ-1 позволяет предположить сосудопротекторный эффект исследуемого фитосбора.

Эффекты фитосбора «Диабефит» на некоторые показатели крови, сердечно-сосудистой и дыхательной систем (уровень глюкозы, артериальное давление, частота сердечных сокращений, частота дыхательного ритма) в условиях длительного применения фруктозой обогащенной диеты у крыс

Среднее значение уровня глюкозы в плазме крови до введения фруктозы в группе Фруктоза-контроль составляло 75.71 ± 11 мг/дл. Через 3 недели приема фруктозы этот показатель составил 77 ± 6.12 мг/дл ($p=0.86$); через 6 недель – 87 ± 8.88 мг/дл ($p=0.12$), а через 9 недель – 108 ± 3.96 мг/дл ($p=0.0003$). Среднее значение уровня глюкозы в плазме до приема фруктозы в группе Фруктоза-Диабефит составило 85.6 ± 8.08 мг/дл; через 3 нед приема фруктозы этот показатель составил 90.57 ± 11.18 мг/дл ($p=0.44$); через 6 недели – 102.8 ± 5.5 мг/дл ($p=0.004$); а через 9 недель (из них при одновременном приеме «Диабефита» в течение 3 недель) этот показатель составил 73.2 ± 3.03 мг/дл ($p=0.01$). Исходный показатель частоты пульса в группе Фруктоза-контроль составил 420 ± 40 уд/мин, а через 9 недели – 448 ± 37.01 уд/мин ($p=0.28$). В группе Фруктоза-Диабефит исходный индекс частоты пульса составил $428 \pm 44,38$ уд/мин, а через 9 недель после приема фруктозы (вместе с одновременным приемом Диабефита в течение 3 недель) – 428 ± 28.72 уд/мин ($p=1.0$). Среднее значение артериального давления в группе Фруктоза-Контроль составило 126 ± 9.62 мм рт.ст.; через 9 недель артериальное давление в этой группе составило 134.6 ± 10.53 мм рт.ст. ($p=0.21$). Среднее значение этого показателя до приема фруктозы в группе Фруктоза-Диабефит составило 137 ± 8.37 мм рт.ст., а через 9 недель (прием фруктозы вместе с «Диабефитом» в течение 3 недель) этот показатель составил 131 ± 7.42 мм рт.ст. ($p=0.26$). Исходный средний показатель частоты дыхания в группе Фруктоза-Контроль составил 94.8 ± 11.28 вдохов в минуту; через 9 недель приема фруктозы этот показатель составил 114 ± 19.8 вдых/мин ($p=0.09$). Исходный средний показатель частоты дыхания в группе Фруктоза-Диабефит составил 99.2 ± 9.01 вдох/мин; через 9 недель после введения фруктозы (вместе с «Диабефитом» в течение 3 недель) – 97.2 ± 8.94 вдох/мин ($p=0.5$).

Нефармакологические методы лечения, такие как антиоксидантная фитотерапия, получают все большее признание, поскольку они имеют клиническое значение для борьбы с негативными последствиями вредоносных диет. В частности, компоненты фитосбора «Диабефит» имеют потенциал протекторного воздействия. Так, *Stevia rebaudiana* (15% фитосбора) — это некалорийный заменитель сахара с антидиабетическим действием и хорошо известное коммерческое лекарственное растение, выращиваемое в Республике Армения с 2012 года [Babakhanyan M. et al., 2019]. Стевия имеет большую общую долю фенолов, – до 91 мг/г [Shivanna N. et al., 2012], и проявляет антиоксидантные свойства в условиях диабетической нейропатии, вызванной фруктозой [Chavushyan V. et al., 2017]. Снижение выработки АФК предлагается в качестве возможных механизмов кардиозащиты, а пустырник сердечный обладает антиоксидантной активностью и используется в качестве дополнительного средства для улучшения функции сердца и кровообращения [Bematiene J. et al., 2014]. Бузина черная (*Sambucus nigra*) (10% фитосбора) обладает лечебными свойствами, связанными с наличием полифенолов, которые представляют собой соединения с потенциальными антиоксидантными свойствами. Они могут сильно влиять на течение болезненных процессов, противодействуя окислительному стрессу, оказывая благотворное влияние на регуляцию артериального давления, снижение гликемии, повышение активности антиоксидантных ферментов (в том числе глутатиона) в плазме крови, снижение уровня мочевой кислоты [Sidor A. et al., 2015]. Наши данные коррелируют с указанными в литературе данными о неблагоприятном влиянии диетических подсластителей на уровни артериального давления и липидов в плазме крови [TeMorenga L. et al., 2014]. Известно, что диета с высоким содержанием фруктозы приводит к гипертонии у животных [Song D. et al., 2004]. Доказано, что прием плодов *L. barbarum* (15% фитосбора) может благоприятствовать контролю уровня глюкозы [Guo X. et al., 2017], поскольку полисахариды в их составе обладают гипогликемической и инсулиносенсибилизирующей

активностью [Zhu J. et al., 2013]. Полисахариды и флавоноиды фруктов являются хелатами ионов металлов в борьбе со свободными радикалами [Li X. et al., 2007]. Растение стевия и его экстракты использовались в качестве заменителя сахарозы при лечении гипертонии у крыс [Jeppesen P. et al., 2002] и человека [Chan P. et al., 2000]. *Ganoderma lucidum* - хорошо известный препарат, используемый в традиционной китайской медицине для лечения различных нарушений обмена веществ, таких как сердечно-сосудистые заболевания и диабет [Deepalakshmi K. et al., 2011]. *Ganoderma lucidum*, обогащенная тритерпеноидами и полисахаридами, которые могут активировать ген, участвующий в антиоксидантных ферментах, и тем самым поддерживать баланс между образованием свободных радикалов и антиоксидантным статусом [Chiu H. et al., 2017] и используется в качестве пищевой добавки [Rubel R. et al., 2011]. Наши результаты показывают, что изменения уровня глюкозы в крови, частоты пульса, артериального давления и частоты дыхания у крыс, вызванные интенсивным потреблением фруктозы, предотвращаются этноботанической фитотерапией.

Оценка состояния микроциркуляторного русла коры мозга в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции «Диабефитом», галантамином и диабетоном

Изменения диаметра капилляров, межкапиллярного расстояния, плотности капилляров и ограниченной капиллярными петлями площади являются признаками микроциркуляторных адаптивных механизмов, служащих для обеспечения метаболических потребностей различных клеточных популяций [Richard E. et al., 2010; Shaver S. et al., 1990].

Спустя 9 недель после приема фруктозы капилляры разрываются и сужаются по всему полю префронтальной коры (Рис. 2Б). В группах Диабетон (Рис. 2В), Галантамин (Рис. 2Г) и Диабефит (Рис. 2Д) через 3 недели лечения во всех отделах микрососудистого русла сосуды расширены, по сравнению с группой Фруктоза, приближаясь к нормальным размерам (Рис. 2Е). Под воздействием «Диабефита» размер капилляров, межкапиллярное расстояние и площади, ограниченные капиллярными петлями, незначимо отличались от таковых интактных. Если в норме для подсчета 100 капилляров требовалось 40 полей зрения, то количество полей зрения для этого подсчета после потребления 50% фруктозы увеличилось до 52 полей, что свидетельствует о снижении плотности функционирующих капилляров.

Увеличение плотности капиллярного звена коры головного мозга крыс наблюдали при введении диабетона, галантамина и фитосбора (Рис. 2 В,Г,Д). Капиллярная сеть стала более гладкой и целостной под влиянием диабетона и фитосбора (Рис. 2 В,Д), тогда как под влиянием галантамина (Рис. 2Г) в коре наблюдаются прерывистые или извитые капилляры; определялись также капилляры, которые местами сужены, а местами расширены по сравнению с группой Фруктоза. Существовала значительная разница между группами Норма и принимавшей фруктозу, по % площади/или плотности капилляров (9.9 ± 0.4 по отношению к 24.4 ± 1.1 в норме; $p < 0.0001$) и измерениям среднего размера капилляров (7.7 ± 0.3 по отношению к 13.8 ± 0.2 в норме; $p < 0.0001$) в соответствии с оценкой отдельных сосудистых параметров на основе Image-J (Таблица 3).

Гипергликемия способствует выработке вазоконстрикторов-простаноидов и, таким образом, повышению сократительной способности гладкомышечных сосудистых клеток [Okon E. et al., 2003]. В то же время, микроваскулярное разрежение может быть результатом уменьшения количества перфузируемых сосудов в сосудистом русле (функциональное разрежение) или уменьшения количества сосудов в ткани (структурное разрежение) [Levy B. et al., 2008]. Помимо плотности сосудов, для понимания особенностей обмена кислородом и питательными веществами между капиллярной сетью и тканью мозга важны длина и разветвление сосудов [Корулова V. et al., 2017]. Более того, гладкомышечные клетки сосудов в сосудистом русле имеют различное эмбриональное происхождение: проксимальные эластические и мышечные сосуды происходят из эктодермальной ткани, а русла мелкомышечных сосудов и артериолы происходят

из мезодермальной ткани. Эти эмбриологические различия могут иметь фармакологическое значение, поскольку они вызывают различные эффекты определенных классов вазодилататоров на проксимальные и дистальные гладкомышечные клетки сосудов [Strain W., Paldanius P., 2018].

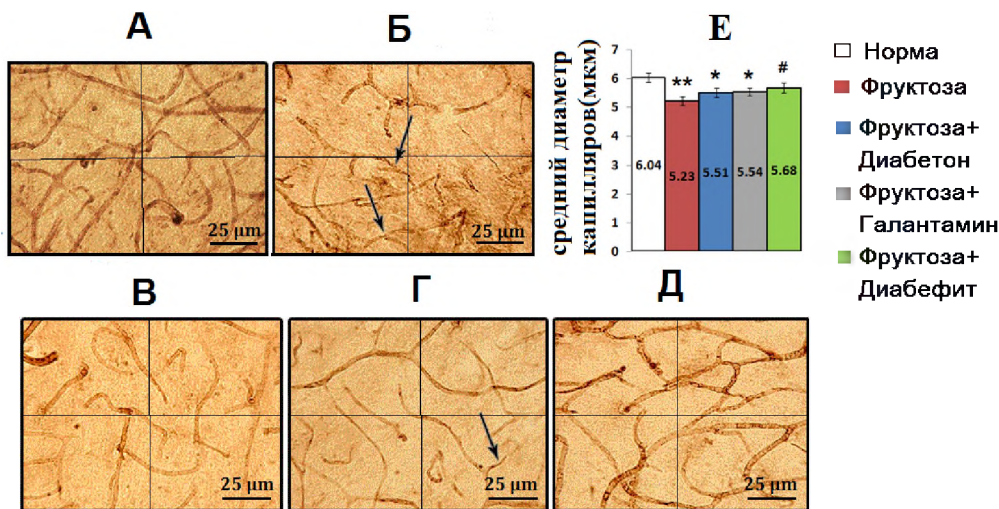


Рисунок 2. Изображения капиллярной сети головного мозга крыс, полученные безинъекционным кальций-аденозинтрифосфат гистоангиологическим методом. Изменения капиллярного звена микросудуистого русла в норме (А), в группе Фруктоза (контроль) (Б), Фруктоза+Диабетон (В), Фруктоза+Галантамин (Г), Фруктоза+Фитосбор Диабефит (Д). Е - изменения средних диаметров микрокапиллярной сети коры, в указанных группах. Значения представлены как среднее значение±стандартная ошибка среднего. * - отличия от интактной группы (Норма). # - отличия от группы Фруктоза.

Таблица 3. Количественное определение корковых сосудов префронтальной коры в норме, в группах Фруктоза, Фруктоза+Диабетон, Фруктоза+Галантамин и Фруктоза+Фитосбор

Группы	% Площадь	Средний размер
Норма (А)	24.4 ± 1.1	13.8 ± 0.2
Фруктоза (Б)	9.9 ± 0.4 *	7.7 ± 0.3 *
Фруктоза +Диабетон (В)	10.5 ± 0.4 *	10.6 ± 0.2 * #
Фруктоза + Галантамин (Г)	16.1 ± 0.5 * #	11.4 ± 0.4 * #
Фруктоза + Фитосбор (Д)	12.4 ± 0.7 * #	17.2 ± 1.2 * #

Примечание. Значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. * - отличия от интактной группы (норма). # - отличия от группы Фруктоза.

Следует отметить, что в моделях грызунов с МС выявлены некоторые общие инициирующие факторы развития диабетической патологии сосудов, такие как увеличение количества АФК, утрата модулирующей роли эндотелия и увеличение продукции сосудосуживающих средств [Tran V. et al., 2020]. Вызванная гипергликемией ЭД представляет собой дизадаптивный эндотелиальный фенотип, характеризующийся снижением биодоступности

NO, усилением окислительного стресса, повышенной экспрессией провоспалительных и протромботических факторов и аномальной вазореактивностью [Barac A. et al., 2007]. Имеющиеся некоторые противоречивые результаты в группе Фитосбор (значительно низкая плотность капилляров и больший средний размер капилляров по сравнению с нормой), по-видимому, связаны с неадекватным эндотелиальным фенотипом, сформированным длительным приемом высоких доз фруктозы, который функционирует атипично. Здоровый эндотелий играет важную роль в гомеостазе, активно секретируя различные молекулы, действующие паракринным, аутокринным и эндокринным путем. Согласно результатам протективные возможности фитосбора недостаточны для обеспечения полноценного нормального физиологического состояния. С другой стороны, учитывая то, что резистентность к инсулину есть важный предиктор ЭД [Lind L., 2008], терапия фитосбором (содержащим стевию), направленная на улучшение чувствительности к инсулину может быть более рациональным вариантом лечения ЭД при метаболических нарушениях. Кроме того, ингибирование АХЭ увеличивает региональный микроциркуляторный кровоток за счет дилатации внутрикортикальных микрососудов [Kasa P. et al., 2000], поскольку многие холинергические нейроны синтезируют и высвобождают мощный сосудорасширяющий NO [Toda N, Okamura T., 2003]. Фитосбор может способствовать передаче сигналов инсулина, активности eNOS и уменьшению окислительного и воспалительного стресса, что приводит к восстановлению баланса сужающего и расширяющего действия инсулина, тем самым подтверждая предположение о повышенной эффективности травяных комбинаций фитосбора в профилактике осложнений МС, таких как МСД.

***In vivo* экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов mPFC при ВЧС NBM, в условиях интенсивного потребления фруктозы и протекции «Диабетом», галантамином и диабетомом**

Процентное распределение возбудительных и ингибиторных ответов в нейронах mPFC и при высокочастотной стимуляции (ВЧС) NBM.

Сравнение процентной доли всех типов ответов показало, что в группе Норма определялась наименьшая доля ответов ТД-ППП (15%), а в группе Фруктоза – максимальная доля таких же ответов (40%, Рис. 3). Соотношение ответов ТП-ППП в группах Норма (28%) и Фруктоза (29%) было одинаковым (Рис. 3). В группе Фитосбор пропорционально преобладали ТД-ПТД (41%) (как в норме) и ТД-ППП (39%) (как в группе Фруктоза). Ответы ТД-ППП (55% и 51%, соответственно) преобладали в группах Галантамин и Диабетон. Однако, если ответы ТП-ПТД и ТП-ППП в группах Фитосбор и Галантамин достоверно ниже, чем в норме (5% и 16% по отношению к 22% в норме; 6% и 6% по отношению к 28% в норме, соответственно), то ответы ТП-ПТД и ТП-ППП в группе Диабетон практически идентичны таковым в норме (21% по отношению к 22% в норме; 25% по отношению к 28% в норме, соответственно).

Оценка фоновой активности, а также выраженности возбудительных и тормозных ответов в нейронах mPFC при ВЧС NBM.

Нами было обнаружено значимое отличие спайковой фоновой активности от нормы только в популяции нейронов с ответами ТП-ППП в группе Фруктоза ($2,32 \pm 0,3$ по отношению к $1,47 \pm 0,08$ спайк/сек в норме, $p=0,05$) (Рис. 4А). В нейронах с ответами ТД-ПТД выявлено достоверное повышение фоновой активности в группе Фитосбор ($3,63 \pm 0,5$ по отношению к $2,28 \pm 0,3$ спайк/сек в норме, $p=0,02$), и достоверное снижение в группе Галантамин ($1,13 \pm 0,3$ по отношению к $3,80 \pm 0,4$, $p=0,002$) по сравнению с нормой в популяции нейронов с ответами ТП-ПТД (Рис. 4А). Как указывалось ранее, ответы ТД-ПТД были доминирующими в группе Фитосбор (максимум 41% по отношению к максимум 35% в норме; $3,63$ по отношению к $2,28$ спайк/сек в норме). В группе Фруктоза мы обнаружили достоверное снижение процентной выраженности ТД (-

73.5±2.7% по отношению к -95.2±2.7% в норме, $p<0.0001$) в популяции нейронов с ответами ТД-ПТД, а также достоверное снижение ТП (250±13.5% по отношению к 589±12.8%,

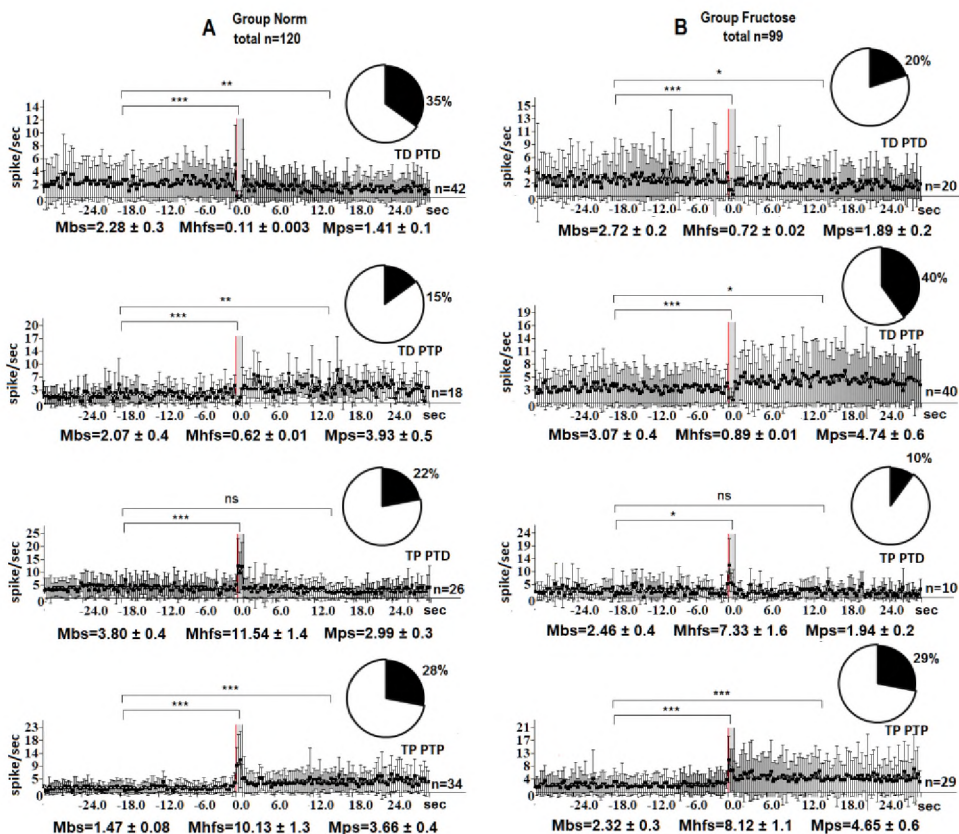


Рисунок 3. Гистограммы средней перистимульной частоты спайковой активности одиночных нейронов mPFC на ВЧС NBM в группе Норма (А) и Фруктоза (В). Mbs - средняя частота импульсного потока в реальном времени 30 сек до стимуляции (спайк/сек, $M \pm SEM$); Mhfs - средняя частота импульсного потока во время ВЧС (100 Гц, 1 с); Mps - средняя частота потока импульсов в реальном времени 30 сек после стимуляции; n — количество нейронов с данным типом ответов. Статистическую значимость интенсивности ответа оценивали по критерию Стьюдента; (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). На дисках представлены процентная доля указанного типа ответов в данной группе.

в норме; $p<0.0001$) в популяции нейронов с ТП-ПТП ответами (Рис. 4В). Как уже указывалось, ТП-ПТП в группах Фруктоза и Норма идентичны (29% по отношению к 28% в норме). В группах Фитосбор (232.2±20%), Галантамин (119.5±26%) и Диабетон (280±16.5%) отмечено достоверное снижение ($p<0.0001$) ТП по сравнению с группой Норма (589±12.8% в норме) (Рис. 4В) в популяции нейронов с ТП-ПТП. Интересно, что в группе Диабетон в то же время ТП был достоверно более выражен в популяции нейронов с ТП-ПТД ответами (362±26% по отношению к

203.7±12% в норме; $p < 0.0001$), в то время как в этой группе ТД достоверно менее выражена по сравнению с нормой в популяции нейронов с ТД-ПТД (-37.8±1.4% по отношению к -95.2±2.7% в норме; $p < 0.0001$) (Рис. 4В).

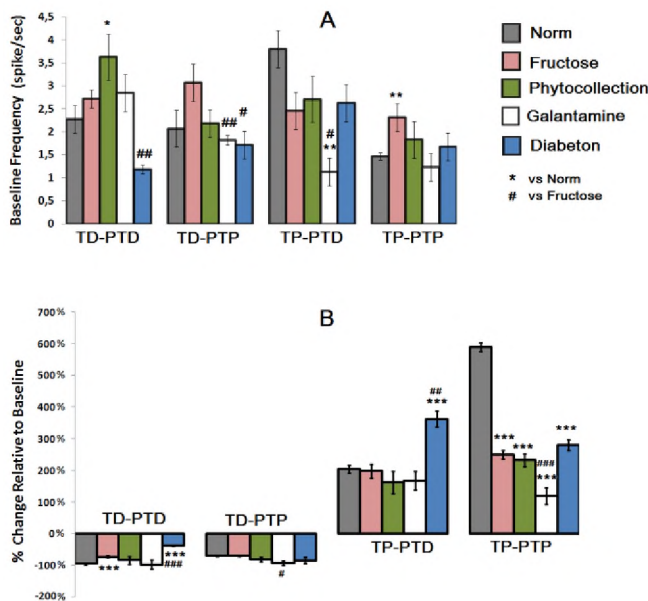


Рисунок 4. Сравнительный анализ показателей спайковой активности в группах Норма, Фруктоза, Фитосбор, Галантамин и Диабетон. (А) - Среднее значение базовой частоты (спайк/сек, $M \pm SEM$) ТД-ПТД, ТД-ПТП, ТП-ПТД, ТП-ПТП ответов; (В) - процентное выражение (% $M \pm SEM$) ТП и ТД относительно исходного уровня в тех же ответах; * достоверность по сравнению с нормой и # - по сравнению с группой Фруктоза. Значимость между двумя группами оценивали по критерию Стьюдента (*[#] $p < 0.05$, **^{##} $p < 0.01$, ***^{###} $p < 0.001$).

Нейромодулятор АХ регулирует спайк-время-зависимую пластичность, включая ретроградное распространение [Tsubokawa et al., 1997]. Двухнаправленные кортикальные синаптические модификации достигаются путем изменения частоты пресинаптических или постсинаптических импульсов во время оперативного обуславливания [Malenka, Bear, 2004]. Временной фактор между пре- и постсинаптической активацией определяет направленность синаптических изменений [Seol et al., 2007]. КВП синапсов обеспечивает эффективные механизмы нейронных цепей для решения проблемы дифференциации активности (изменения частоты импульсов, индуцированные стимулом в отличие от частотных колебаний фоновой активности) [Tauffer et al., 2021]. Повреждение ЦНС, вызванное гипергликемией, также может быть вызвано другими возможными путями. Некоторые из клеточных событий, ответственных за невропатию, вызванные диабетом, вероятно, подтверждают наши выводы о КВП в группе Фруктоза. Так, хронический диабет у крыс связан с постсинаптическими механизмами (например, регуляция AMPA-рецепторов), а стрептозотоцин-индуцированный диабет у крыс обусловлен биофизическими аномалиями AMPA-рецепторов [Vaithianathan et al., 2003], вызывающих активацию возбудительных реакций. Выраженность синаптической депрессии также опосредована модификациями постсинаптических токов, вызванных подтипом AMPA глутаматных рецепторов [Malinow R., Malenka R., 2002]. Вызванное диабетом снижение связывания $[3H]AMPA$ более выражено в коре головного мозга [Chabot et al., 1997].

Наша модель диеты с высоким содержанием фруктозы характеризуется ИР и гиперинсулинемией [Faroouqi et al., 2012]. Известно, что инсулин является модулятором синаптической пластичности [Mainardi et al., 2015], и мы рассматриваем инсулин в качестве функционального и структурного субстрата, лежащего в основе интеграции нейронов в сети при патологии и профилактике, модификации потенциации/ингибиции и их экспрессии, а также

количества и усредненной частоты фоновой активности в различных популяциях корковых нейронов с модифицированными ответами.

МС нарушает холинергическую передачу, как и изменения в экспрессии везикулярного транспортера АХ, что свидетельствует о холинергическом повреждении [Martinelli et al., 2017] и, в частности, в синаптических окончаниях фронтальной коры [Tayeabati et al., 2008].

Ранее, изучая КВП в гиппокампе и миндалевидном теле, мы обнаружили, что стевия обладает как краткосрочным активирующим, так и долгосрочным депрессорным действием, предполагая, что она действует как аллостерический модулятор. Долгосрочные изменения аллостерических лигандов приводят к увеличению фактора роста нервов (NGF) за счет трансформации аллостерических белков-модуляторов, ключевым из которых для природных субстратов является с G-белком-связанный рецептор [Babel H, Bischofs I., 2016]. NGF-продуцирующие клетки коры ответственны за модуляцию холинергических кортикальных входов, а также за корковые механизмы пластичности. Интересно, что ГАМК-ергические интернейроны в префронтальной коре крысы могут способствовать реорганизации коры посредством регуляции сигнализации NGF [Biane et al., 2014]. Поскольку базальная холинергическая система переднего мозга оказывает влияние на опыт-зависящую пластичность коры [Kilgard et al., 1998; Conner et al., 2005], в ходе наших экспериментов было высказано предположение, что передача сигналов NGF усиливает NBM-опосредованную пластичность. Кроме того, помимо долгосрочного трофического воздействия на базальные холинергические клетки переднего мозга, NGF может также играть роль в краткосрочном ремоделировании цепи [Lessmann et al., 2003], что, по-видимому, играет существенную роль в формировании модификаций возбуждающих и тормозных эффектов в нейронах mPFC в ответ на ВЧС NBM. Следует отметить, что после тетанической стимуляции ГАМК-ергические интернейроны могут вызывать сильное посттетаническое возбуждение во взрослом гиппокампе и, следовательно, играть облегчающую роль в индукции потенциации [Taiga et al., 1997]. Интересно также, что галантамин лимитированно ингибирует АХЭ и на нейрональные nAХ-рецепторы оказывает эффекты лиганда с аллостерическим потенцирующим действием [Woodruff-Pak et al. 2002], чем и обеспечивается возможность предотвращения десенсibilизации и подавления экспрессии рецепторов [Perszyk R., et al., 2021].

Диабетон (гликлазид) стимулирует рецептор, активируемый пролифератором пероксисом гамма (PPAR- γ) и оказывает антиамилоидогенное и противовоспалительное действие, которое может играть роль в замедлении и снижении риска нейродегенерации [Alagiakrishnan K., Senior P., 2013]. Лечение инсулином и гликлазидом предотвращает снижение экспрессии NR2A и NR2B (2A и 2B субъединицы NMDAрецептора) и предотвращает повышение уровней МДА, маркера перекисного окисления липидов [Delibas N, et al., 2004]. Указанные факторы, по-видимому, имели важную роль и в формировании гомеостатической пластичности мозга в наших экспериментах.

***In vivo* экстраклеточное исследование вызванной спайковой активности нейронов латеральной энторинальной коры (ЛЕС) при ВЧС NBM, в условиях интенсивного длительного потребления фруктозы и протекции фитосбором «Диабефит» и галантамином**

Процентное распределение возбуждательных и ингибиторных ответов в нейронах ЛЕС при высокочастотной стимуляции (ВЧС) NBM.

Сравнение процентной доли всех типов ответов показало, что в группе Норма ТП-ППП ответы составляют 60% (60 нейронов из 100 единиц данной группы), а в группе Фруктоза таковые составляют 11.3% (12 нейронов из 106 единиц данной группы).

Если в группе Норма ТД-ПТД ответы составляли 16%, то в группе Фруктоза они составляли 41.5%. В группе Фруктоза максимальной процентной долей представлены ТД-ПТП ответы (43.4% по отношению к 12% в норме) (Рис. 5А). В целом, в группе Фруктоза доля ТД-ПТД и ТД-ПТП ответов достоверно увеличивается ($p < 0.001$), а доля ТП-ПТД и ТП-ПТП ответов достоверно снижается ($p < 0.05$, $p < 0.001$, соответственно) по сравнению с таковыми в норме (Рис. 5А). В группах Фитосбор и Галантамин доминировала доля нейронов с ТД-ПТП ответами (44.7% и 56.3%, соответственно), а ТД-ПТД ответы представлены соразмерно (31.6% и 33.3%, соответственно) (Рис. 5А). В целом, в группах Фитосбор и Галантамин доля ТД-ПТД и ТД-ПТП ответов значимо выше ($p < 0.0001$), а доля ТП-ПТД ($p < 0.04$, $p < 0.07$, соответственно) и ТП-ПТП ответов ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, соответственно) значимо ниже по сравнению с таковыми в норме (Рис. 5А), что было идентично с тенденциями в группе Фруктоза.

Оценка частоты фоновой спайковой активности, а также выраженности в популяциях нейронов ИЕС, проявивших возбудительные и тормозные ответы при ВЧС NBM

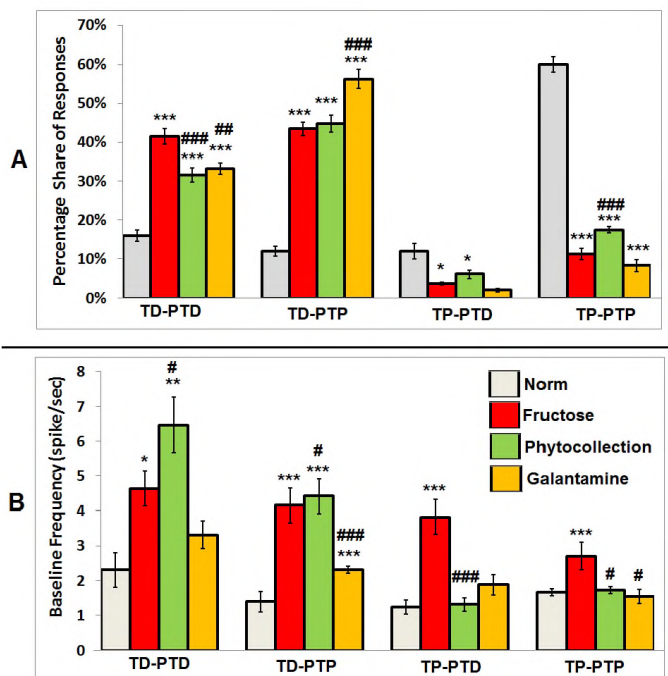


Рисунок 5. Сравнительный анализ показателей спайковой активности в группах Норма, Фруктоза, Фитосбор и Галантамин. А- Процентная доля ТД-ПТД, ТД-ПТП, ТП-ПТД и ТП-ПТП ответов (%; $M \pm SEM$); В - средняя частота фоновой спайковой активности (спайк/сек; $M \pm SEM$) в популяции нейронов, проявивших указанный тип ответов. Статистическая достоверность в сравниваемых двух группах оценивалась согласно unpaired Student's t-test; (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ относительно нормы); (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ относительно группы Фруктоза).

В популяциях нейронов с ТД-ПТД ответами выявлено достоверное повышение фоновой активности в группах Фруктоза (4.64 ± 0.5 по отношению к 2.31 ± 0.5 спайк/сек в норме; $p = 0.01$) и

Фитосбор (6.48±0.8 по отношению к 2.31±0.5 спайк/сек в норме; p=0.002), а в группе Галантамин повышение не достоверно (3.32±0.4 по отношению к 2.31±0.5 спайк/сек в норме; p=0.1) (Рис. 5В). В популяциях нейронов с ТД-ПТД ответами также выявлено достоверное повышение фоновой активности в группах Фруктоза, Фитосбор, Галантамин (4.16±0.5 спайк/сек; p<0.0001; 4.43±0.5 спайк/сек; p=0.0001; 2.31±0.1 спайк/сек; p=0.0001 по отношению к 1.39±0.3 спайк/сек в норме, соответственно) (Рис. 5В). В группе Фруктоза частота фоновой активности повышена по сравнению с нормой в популяциях нейронов с ТП-ПТД ответами (3.83±0.5 спайк/сек по отношению к 1.24±0.2 спайк/сек в норме; p<0.0001) и ТП-ПТП ответами (2.71±0.4 спайк/сек по отношению к 1.66±0.1 спайк/сек в норме; p=0.0004) (Рис. 5В). В группе Фитосбор фоновая активность в популяциях нейронов с ТП-ПТД (1.31±0.2 спайк/сек по отношению к 1.24±0.2 спайк/сек в норме; p=0.8) и ТП-ПТП (1.72±0.1 спайк/сек по отношению к 1.66±0.1 спайк/сек в норме; p=0.7) не отличались от нормы) (Рис. 5В). В группе Галантамин также фоновая активность в популяциях нейронов с ТП-ПТД (1.88±0.3 спайк/сек по отношению к 1.24±0.2 спайк/сек в норме; p=0.2) и ТП-ПТП (1.54±0.2 спайк/сек по отношению к 1.66±0.1 спайк/сек в норме; p=0.7) не отличалась от нормы) (Рис. 5В).

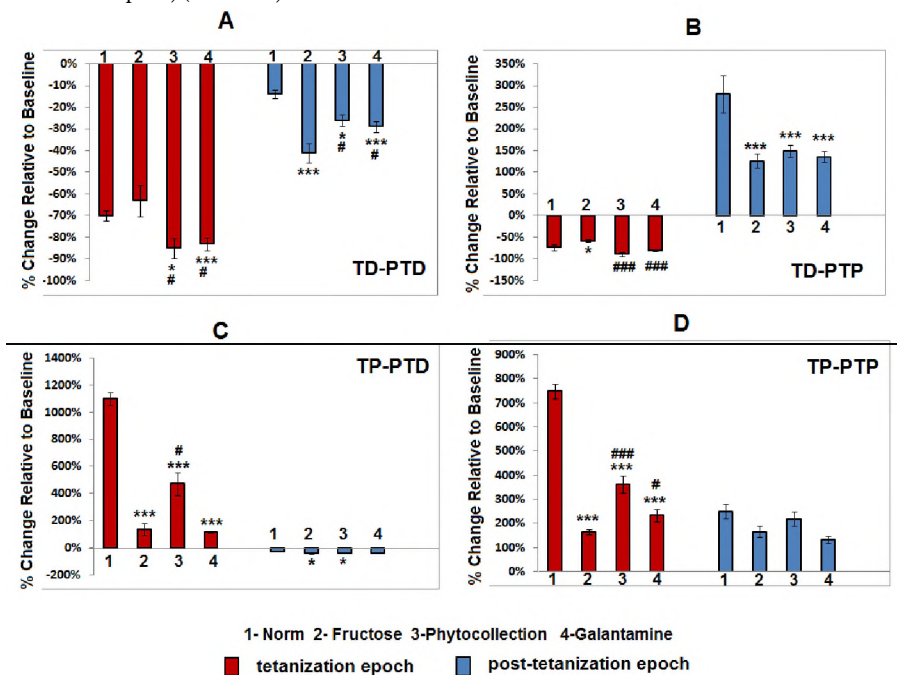


Рисунок 6. Сравнительный анализ показателей усредненной процентной выраженности возбудительных и ингибиторных ответов нейронов IEC при ВЧС NBM в группах Норма (1), Фруктоза (2), Фитосбор (3) и Галантамин (4). Усредненная процентная выраженность (%), M ±SEM) ТП и ТД (красный – время тетанизации), а также ПТП и ПТД (синий – постстимульное время) относительно базового уровня частоты спайков (Mbs, нулевой уровень) в популяциях нейронов с ТД-ПТД (А), ТД-ПТП (В), ТП-ПТД (С), ТП-ПТП (D) ответами. Статистическая достоверность выраженности ответов в сравниваемых двух группах оценивалась согласно unpaired Student's t-test; (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 относительно нормы); (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 относительно группы Фруктоза)

Сравнительный анализ усредненной процентной выраженности (% , $M \pm SEM$) ингибиторных ответов на время тетанизации (ТД) выявил значимое усиление депрессорных ответов в группах Фитосбор ($-85 \pm 4.4\%$ по отношению к $-70 \pm 2.2\%$ в норме; $p=0.03$) и Галантамин ($-83 \pm 3\%$ по отношению к $-70 \pm 2.2\%$ в норме; $p=0.006$), и незначимое ослабление ($-63 \pm 7.3\%$ по отношению к $-70 \pm 2.2\%$ в норме; $p=0.5$) в группе Фруктоза в популяциях нейронов ИЕС, проявивших ТД-ПТД ответы (Рис. 6А). В этой же популяции постстимульные депрессорные ответы (ПТД) по сравнению с нормой проявили более интенсивную выраженность как в группе Фруктоза ($-41 \pm 4.5\%$ по отношению к $-14 \pm 2\%$ в норме; $p=0.0008$) в группах Фитосбор ($-26 \pm 2.7\%$ по отношению к $-14 \pm 2\%$ в норме; $p=0.007$) и Галантамин ($-29 \pm 2.5\%$ по отношению к $-14 \pm 2\%$ в норме; $p=0.0003$) (Рис. 6А). В то же время по сравнению с группой Фруктоза, ПТД в группах Фитосбор ($p=0.008$) и Галантамин ($p=0.04$) менее выражена (с тенденцией к нормализации) (Рис. 6А). В популяциях нейронов ИЕС, проявивших ТД-ПТП ответы (Рис. 7Б) усредненная процентная выраженность ТД (красные столбцы) достоверно ослаблена ($-58 \pm 3.3\%$ по отношению к $-73.4 \pm 6\%$ в норме; $p=0.03$) только в группе Фруктоза, в то время как в группах Фитосбор и Галантамин усиление ТД по сравнению с нормой не достоверно ($p=0.2$ и $p=0.1$, соответственно). В популяции этих нейронов постстимульные возбуждающие реакции (ППИ; синие столбцы на Рис. 6В) значимо ослаблены по сравнению с нормой в группе Фруктоза ($126 \pm 17\%$ по отношению к $280 \pm 43\%$ в норме; $p=0.0003$), в группе Фитосбор ($149 \pm 13.5\%$ по отношению к $280 \pm 43\%$ в норме; $p=0.0004$) и в группе Галантамин ($136 \pm 13\%$ по отношению к $280 \pm 43\%$ в норме; $p < 0.0001$).

Сравнительный анализ усредненной процентной выраженности (% , $M \pm SEM$) возбуждающих ответов во время тетанизации (ТП на Рис. 6С) выявил достоверное снижение интенсивности ответа во время тетанизации в группах Фруктоза ($138 \pm 44\%$ по отношению к $110 \pm 48\%$ в норме; $p < 0.0001$), Фитосбор ($473 \pm 84\%$ по отношению к $110 \pm 48\%$ в норме; $p < 0.0001$) и Галантамин ($118 \pm 5.3\%$ по отношению к $110 \pm 48\%$ в норме; $p < 0.0001$) в популяциях нейронов ИЕС, проявивших ТП-ПТД ответы. Следует отметить, что в группе Фитосбор терапия проявила тенденцию восстановления ТП (достоверного повышения по сравнению с группой Фруктоза; $p=0.02$), но не доходящего до нормы. В популяции этих же нейронов постстимульные депрессорные реакции (ПТД; синие столбцы на Рис. 6С) значимо усилены по сравнению с нормой в группах Фруктоза ($-38 \pm 6.4\%$ по отношению к $-26 \pm 2\%$ в норме; $p=0.02$) и Фитосбор ($-37 \pm 4.5\%$ по отношению к $-26 \pm 2\%$ в норме; $p=0.01$), а в группе Галантамин ПТД отличается от нормы недостоверно ($p=0.06$). Сравнительный анализ усредненной процентной выраженности возбуждающих ответов во время тетанизации выявил достоверное снижение интенсивности ТП ответа в группах Фруктоза ($164 \pm 11\%$ по отношению к $749 \pm 30\%$ в норме; $p < 0.0001$), Фитосбор ($362 \pm 35\%$ по отношению к $749 \pm 30\%$ в норме; $p < 0.0001$) и Галантамин ($234 \pm 26\%$ по отношению к $749 \pm 30\%$ в норме; $p < 0.0001$) в популяциях нейронов ИЕС, проявивших ТП-ПТП ответы (Рис. 6Д). При этом в группе Фитосбор и Галантамин терапия проявила тенденцию восстановления ТП (достоверного повышения по сравнению с группой Фруктоза; $p=0.0002$ и $p=0.01$, соответственно), не доходящего до нормы. В этой же популяции нейронов ПТП реакции занижены недостоверно в группах Фруктоза ($166 \pm 22\%$ по отношению к $250 \pm 30\%$ в норме; $p=0.2$), Фитосбор ($219 \pm 29\%$ по отношению к $250 \pm 30\%$ в норме; $p=0.6$) и Галантамин ($133 \pm 13\%$ по отношению к $250 \pm 30\%$ в норме; $p=0.2$) (Рис. 6Д).

Таким образом, методом экстраклеточной регистрации единичных нейронов ИЕС и анализа в реальном времени фоновой и постстимульной спайковой активности, а также активности во время ВЧС были выявлены изменения КВП, ассоциированные с дегенеративными изменениями в группе Фруктоза: 1) резкое снижение долевого соотношения и интенсивности возбуждающих реакций на время ВЧС (ТП) при стимуляции холинергического NBM; 2) резкое повышение долевого соотношения депрессорных реакций во время ВЧС (ТД) без изменений интенсивности ответов при стимуляции холинергического NBM; 3) значимое повышение средней частоты фоновой спайковой активности в популяциях нейронов со всеми типами

ответов. В группе Фитосбор по сравнению с нормой выявлены: 1) увеличение доли и интенсивности ТД ответов, наряду с повышенной частотой фоновой активности; 2) уменьшение доли и интенсивности ТП ответов. Галантамин вызывал: 1) увеличение доли постстимульных возбудительных ответов (значительно выше нормы), но не восстанавливал интенсивность возбудительных реакций во время тетанизации; 2) значимое увеличение доли и интенсивности ингибиторных ответов во время тетанизации.

В заключение, галантамин и фитосбор стимулировали тенденцию приближения к норме (тенденцию восстановления) доли и интенсивности возбудительных и депрессорных ответов. Характерной особенностью терапевтического действия галантамина и фитосбора можно считать повышение процентной доли и выраженности ответов популяции нейронов с ТД-ППП, что, очевидно, указывает на ключевую роль этих нейронов в гомеостатической пластичности и интеграции в нейрональные цепи холинергических проекций.

Холинергическая система мозга играет важную роль в регуляции памяти, обучения и внимания, а холинергическая нейродегенерация затрагивает преимущественно нейроны базального ядра [Hampel H., et al 2018]. Мы выявили, что при фруктозо-индуцированных длительных изменениях метаболизма нейроны NBM и IEC адаптируются путем регулирования ряда детерминант клеточной возбудимости, таких как потенциация и депрессия эпохи тетанизации (ТП, ТД) и посттетанизации (ППП, ПТД). Стабилизация функций нейрональных цепей осуществляется модификациями пре- и постсинаптических свойств нейрональных единиц, достигаемой антероградной и ретроградной сигнальными системами (действующими в пре- и постсинаптических отделах) для достижения гомеостатического контроля нейротрансмиссии, а также постсинаптической локализацией рецепторов и оптимальной настройкой суммарного уровня нейрональной активности [Abbott L, Regehr W., 2004; Tong R., et al., 2020; Goel P, et al., 2020], которую мы оценили для популяций нейронов с однотипными ответами в сравниваемых группах.

Гомеостатическая пластичность утилизирует ряд механизмов через индивидуальные нейроны и локальные цепи, которые частично перекрываются с другими формами пластичности. Осмысление различных проявлений гомеостатической пластичности при нейродегенерации не только расширяет понимание патогномичных механизмов, но и может указывать на новые подходы терапии. Kavalali E. и соавторы (2020) рассматривают пересечения в находках нейропсихиатрических терапевтических подходов и изучений гомеостатической пластичности для выдвижения на передовой план возможное расширение парадигм для прогресса терапии [Kavalali E. et al., 2020]. В этом контексте полученные нами данные открывают новые мишени холинергической терапии диабетической деменции.

С учетом вышеприведенного, мы заключаем, что терапевтические эффекты фитосбора в установлении компенсаторной гомеостатической пластичности осуществляются благодаря комбинации факторов: а) устранение ИР, б) установление оптимального окислительно-восстановительного баланса путем активации антиоксидантной системы, в) регуляция иммунной функции и нейровоспаления путем восстановления холинергической сигнализации эфферентного звена воспалительного рефлекса, г) смягчение микрососудистой дисфункции головного мозга, д) восстановление интенсивности холинергической сигнализации в локальных цепях NBM-mPFC и NBM-IEC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты дают основание заключить, что в условиях интенсивного потребления фруктозы терапевтические эффекты средств с антихолинэстеразной активностью (галантамин и фитосбор «Диабефит») осуществляются благодаря комбинации факторов, ключевых для интегративной когнитивной функции: гликемический контроль, активация

антиоксидантных систем, предотвращение микрососудистой дисфункции головного мозга, установление и стабилизация компенсаторной гомеостатической пластичности корковых холинергических локальных сетей. В настоящее время предполагается, что совершенствование интерпретаций сложности ЦНС возможна при помощи подхода системной биологии и путем построения прогностических молекулярных моделей, которые позволяют проливать свет на регуляцию сложных молекулярных сетей, лежащих в основе функций мозга в норме и патологии, тем самым открывая путь к изысканию более эффективного лечения. Принимая во внимание большую сложность организации нейрональных синапсов, определяемую как пятикомпонентную структуру при учетывании экстраклеточного матрикса и нейро-васкулярной единицы, возникает необходимость в таких моделях и экспериментальных концепциях, которые позволят рассматривать их с позиций системной биологии [De Luca C. et al., 2020]. Мы надеемся, что выносимые на защиту положения в рамках данной концепции представляют собой новое видение касательно патогенетических механизмов, лежащих в основе сложных молекулярных процессов, в частности, таких как развитие нейродегенеративных расстройств, вызванных интенсивным и длительным потреблением неблагоприятных пищевых продуктов.

ВЫВОДЫ

1. Под воздействием галантамина и фитосбора «Диабефит» у интактных крыс выявлена однонаправленная тенденция понижения активности АХЭ в плазме крови, в нейронах латеральной энторинальной коры (ЛЕС) и магноцеллюлярного базального ядра (НВМ), что указывает на идентичную антихолинэстеразную активность галантамина (известного иАХЭ) и исследуемого фитосбора.
2. В условиях интенсивного длительного потребления фруктозы фитосбор «Диабефит» проявляет антиоксидантную активность, модулируя активность МДА и СОД для компенсации фруктозой индуцированного окислительного стресса, а также оказывает сосудодилататорный эффект путем снижения повышенных уровней NO и ЭТ-1 с целью компенсации эндотелиальной дисфункции.
3. В условиях интенсивного длительного потребления фруктозы фитосбор «Диабефит» стабилизирует некоторые показатели крови, сердечно-сосудистой и дыхательной систем (уровень глюкозы, артериальное давление, частота сердечных сокращений, частота дыхательного ритма) у крыс.
4. В условиях интенсивного длительного потребления фруктозы галантамин, фитосбор и диабетон предотвращают дальнейшее прогрессирование фруктозо-опосредованной микрососудистой дисфункции, проявляя тенденцию приближения к норме фруктозой заниженных показателей плотности (или процентной площади) и среднего размера микрососудов медиальной префронтальной коры (mPFC) у крыс.
5. В нейронах mPFC и ЛЕС выявлен соответствующий условиям интенсивного длительного потребления фруктозы гомеостатический уровень фоновой спайковой активности, а также интенсивности (или выраженности) и баланса возбуждающих и ингибиторных ответов, вызванных стимуляцией холинергического НВМ.
6. В условиях интенсивного длительного потребления фруктозы галантамин, фитосбор и диабетон проявляют тенденцию нормализации показателей кратковременной пластичности путем модуляции уровней фоновой спайковой активности, а также интенсивности и баланса возбуждающих и ингибиторных ответов в локальных холинергических цепях НВМ – mPFC и НВМ – ЛЕС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Avetisyan L.G., **Sukiasyan L.M.**, Babakhanyan M.A., Hovhannisyan L.E., Simonyan K.V., Nahapetyan Kh.H., Isoyan A.S., Avetisyan R.A., Avetisyan Z.A., Chavushyan V.A. Effects of phytotherapy on the cardiovascular changes induced by fructose overload. **Electronic Journal of Natural Sciences**. 2019; 33(2):14-20. ISSN 1728-791 <http://ejns.sci.am> > [allissues](#)
2. Բաբախանյան Մ.Ա., Հովհաննիսյան Լ.Է., Նահապետյան Խ.Հ., Իսոյան Ա.Ս., **Սուքիասյան Լ.Մ.**, Մինոյան Կ.Վ., Լորիկյան Ա.Գ., Չավուշյան Վ.Ա. Դիաբեթիտ բուսահումքի բազմաթիրախային օգտագործման հեռանկարները: **ՀՀ ԳԱԱ Հայաստանի բժշկագիտություն** 2020. LX. № 2. 54-65. ISSN 0514-7484 <https://arar.sci.am>
3. Մ.Ա. Բաբախանյան, Լ.Է. Հովհաննիսյան, Լ.Մ. Ղալաշյան, Խ.Հ. Նահապետյան, Շ.Ս. Չաքարյան, Շ.Ա. Գյուլնազարյան, Ա.Գ. Ղուկասյան, **Լ.Մ. Սուքիասյան**: Միկրոտարրերի պարունակության կարգավորումը սննդային բուսահումքով: **ՀՀ ԳԱԱ Հայաստանի բժշկագիտություն** 2020. LX. № 4. 67-78. <https://arar.sci.am>
4. **Л.М. Сукиасян.** Фруктозо-индуцированная токсичность: рациональность применения фитосбора. **Медицинская Наука Армении** 2020, LX. № 4. 43-55. <https://arar.sci.am>
5. **Sukiasyan L.M.**, Danielyan M.H., Hovhannisyan L.E., Babakhanyan M.A., Simonyan K.V., Isoyan A.S., Avetisyan L.G., Lorikyan A.G., Chavushyan V.A. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Artsakh traditional antidiabetic remedy. **Сборник материалов Юбилейной Международной Научной Конференции «90 ЛЕТ – ОТ РАСТЕНИЯ ДО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ»**, Москва, 10 - 11 июня 2021 г., с. 346-352. ISBN 978-5-87019-100-3 DOI: 10.52101/9785870191003_2021_346 <http://vilarnii.ru> > [conference-90-](#)
6. Avagimyan A, **Sukiasyan L**, Sahakyan K, Gevorgyan T, Aznauryan A. The molecular mechanism of diabetes mellitus – related impairment of cardiovascular homeostasis. **Georgian Med News**. 2021;(315):99-102 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34365433/>
7. Ashot Avagimyan, **Lilit Sukiasyan**, Lev Kakturskiy, Lusine Mkrtchyan, Vergine Chavushyan, Kakhaber Chelidze, Alexey Ionov, Ivan Pavluchenko Diabefit as a Modifier of Fructose-induced Impairment of Cardio-vascular System. **Current Problems in Cardiology** 2022, 47(10), 100943 doi: 10.1016/j.cpcardiol.2021.100943. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.100943>
8. **Sukiasyan L.M.** Fructose-Induced Alteration of the Heart and Vessels Homeostasis. **Current Problems in Cardiology**, 2023,48(2), 101013 DOI:10.1016/j.cpcardiol.2021.101013 <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.101013>
9. Chavushyan V.A., Simonyan K.V., Danielyan M.H., Avetisyan L.G., Darbinyan L.V., Isoyan A.S., Lorikyan A.G., Hovhannisyan L.E., Babakhanyan M.A., **Sukiasyan L.M.** Pathology and prevention of brain microvascular and neuronal dysfunction caused by a high-fructose diet in rats. **Metabolic Brain Disease**, (2023) 38:269–286 doi: 10.1007/s11011-022-01098-y. PMID: 36271967 <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01098-y>
10. **Л. М. Сукиасян**, Л. Г. Аветисян, А. С. Исоян, К. В. Симонян, М. А. Бабаханиян, В. А. Чавушян. Оценка нейропротекторной эффективности ацетилхолинэстераза-ингибиторной терапии на модели диабета. **Журнал эволюционной биохимии и физиологии**, 2020, том 56, № 7, с. 692 ISSN 0044-4529 DOI: 10.31857/S0044452920071663 <https://rusiphysiol.org/index.php/iebp/issue/download/98/35>
11. **Lilit Sukiasyan**, Ruzanna Simonyan, Michail Babakhanyan, Rima Avetisyan, Vergine Chavushyan, Nodar Sulashvili. Plasma Endothelin as a Target of Therapeutic Effects of the Diabephyt Antidiabetic Medicinal Herbal Collection (in English). **Caucasus Journal of Health Sciences and Public Health**, V.5, Supplement 9, 2022, p.58 <http://caucasushealth.ge/pdf/Volume%205%20supplement%209.pdf>

ՍՈՒՔԻԱՍՅԱՆ ԼԻԼԻԹ ՄԱՂԱՔԻ

ՖՐՈՒԿՏՈՉՈՎ ԳՐԱԳՐՎԱԾ ՆՅՈՒԹԱՓՈՒՆԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԽԱՆՁԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ԵՎ ՀԱՎԱՌՈՒԼԻՆԵՍԹԵՐԱԶՄՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՄԲ ԲՈՒՄԱԿԱՆ ՄԻՋՈՑՆԵՐՈՎ ՊՐՈՏԵԿՏԻԱՅԻ ՆԵՅՐՈՆԱՅԻՆ ԵՎ ԱՆՈՒԹՅԻՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Ապացուցված է, որ ֆրուկտոզի երկարատև ինտենսիվ ընդունումը ասոցացվում է մետաբոլիկ համախտանկիշի, երկրորդ տիպի դիաբետի գարգացման ռիսկի բարձրացման, սիրտ-անոթային համակարգի հոմեոստազի խանգարման և արտահայտված նեյրոսոքսիկոլոգիայի հետ: Արդիական է համարվում երկրորդ տիպի դիաբետով հիվանդների կոգնիտիվ խանգարման հիմքում ընկած մեխանիզմների բացահայտումը, որոնց կենտրոնական ախտածնական օղակներն են համարվում անոթային և նեյրոնային ֆունկցիաների խանգարումները: Ֆրուկտոզի 50%-ոց ջրային լուծույթն ինտենսիվորեն և երկարատև ստացող կրծողների փորձարարական մոդելում բացահայտվել են անոթային և նեյրոնային դիսֆունկցիայի մորֆոֆունկցիոնալ բնութագրիչները, ինչպես նաև «Դիաբեթիտ» բուսական հավաքածուի, գալանտամինի և դիաբետոնի պրոտեկտորային ներուժի ցուցանիշների առանձնահատկությունները:

Գալանտամինի և «Դիաբեթիտ» ֆիտոհավաքածուի ներգործությամբ պայմանավորված ինտակտ առնետների մոտ ացետիլխոլինէսթերազի ակտիվության որոշման մեթոդով բացահայտվել է ացետիլխոլինէսթերազի ակտիվության փոփոխության համամասն ուղղվածություն արյան պլազմայում, ինչպես նաև լատերալ էնտորինալ կեղևի (IEC) և մագնոցեյուլար բազալ կորիզի (NBM) նեյրոններում: Ֆրուկտոզի ինտենսիվ երկարատև ընդունման պայմաններում «Դիաբեթիտ» ֆիտոհավաքածուն ցուցաբերում է. ա) հակաօքսիդանտային ակտիվություն, փոփոխելով մալոնդիալդեհիդի և սուպերօքսիդի ամուսնագի ակտիվությունը՝ ֆրուկտոզով հրահրված օքսիդատիվ սթրեսը կոմպենսացնելու նպատակով, ինչպես նաև ցուցաբերում է անոթապրոտեկտոր ազդեցություն՝ NO-ի և Էնդոթելին-1-ի բարձրացված մակարդակների նվազեցման միջոցով Էնդոթելային դիսֆունկցիան կոմպենսացնելու նպատակով, բ) արյան, սրտանոթային և շնչառական համակարգերի, ինչպես նաև կուլթափոխանակային որոշ ցուցանիշների (գլյուկոզի, զարկերակային ճնշման մակարդակ, սրտի կծկումների և շնչառական ռիթմի հաճախականություն) վրա կայունացնող ազդեցություն: Ֆրուկտոզի ինտենսիվ և երկարատև ընդունման պայմաններում գալանտամինը, «Դիաբեթիտ» ֆիտոհավաքածուն և դիաբետոնը կանխում են առնետների մոտ ֆրոկտոզով միջնորդված միկրոանոթային դիսֆունկցիայի զարգացումը, կեղևային միկրոանոթների խտության և միջին տրամաչափի ֆրուկտոզի ազդեցությամբ նվազեցված ցուցանիշները՝ նորմայի սահմաններին մոտեցնելու միտում դրսևորելով: Մեդիալ պրեֆրոնտալ կեղևի (mPFC) և IEC նեյրոններում բացահայտվել է ֆրուկտոզի ինտենսիվ և տևակի ընդունման պայմաններին համապատասխանող ֆոնային սպայկային ակտիվության, ինչպես նաև խոլիներգիկ NBM խթանմամբ հրահրված դրդիչ և արգելակիչ պատասխանների ինտենսիվության և հավասարակշռության հոմեոստատիկ մակարդակը: Ֆրուկտոզի ինտենսիվ և տևական ընդունման պայմաններում գալանտամինը, ֆիտոհավաքածուն և դիաբետոնը ցուցաբերում են կարճաժամկետ պլաստիկության ցուցանիշների բնականոնին մոտեցման միտում՝ ֆոնային սպայկային ակտիվության մակարդակների, ինչպես նաև NBM-mPFC-ի և NBM-IEC-ի տեղային խոլիներգիկ շղթաներում դրդիչ և արգելակիչ պատասխանների ինտենսիվության և հավասարակշռության փոփոխման ճանապարհով:

Եզրակացություն: Ֆրուկտոզի ինտենսիվ և տևական ընդունման պայմաններում խոլինէսթերազային արգելակիչների (գալանտամին և «Դիաբեթիտ» ֆիտոհավաքածու)

թերապևտիկ ազդեցությունը իրականացվում է ինտեգրատիվ կոգնիտիվ ֆունկցիայի համար կարևոր գործոնների (գլիկեմիկ վերահսկողություն, հակաօքսիդանտային համակարգերի ակտիվացում, գլխուղեղի միկրոանոթային դիսֆունկցիայի կանխարգելում, կեղևային խոլիներգիկ տեղային ցանցերի կոմպենսատոր հոմեոստատիկ պլաստիկության հաստատում և կայունացում) համակցության շնորհիվ: Էթնոբուսական ֆիտոհավաքածուի կանխարգելիչ և թերապևտիկ բազմավեկտորային արդյունավետության ֆունդամենտալ հիմնավորումն ունի ոչ միայն գիտաբժշկականաբանական, այլև սոցիալ-տնտեսական նշանակություն (ծախս-արդյունավետ և հանրությանը հասանելի լինելու համատեքստում՝ որպես դիաբետոլ հիվանդների կյանքի որակը բարելավող էթնոդեղաբանական միջոց), որի շնորհիվ էլ կարելի է «Դիաբեֆիտ» ֆիտոհավաքածուն առաջարկել որպես կենսաբանական ակտիվ հավելում արտադրման նպատակով:

LILIT MAGHAK SUKIASYAN

NEURONAL AND VASCULAR PARAMETERS OF FRUCTOSE-INDUCED METABOLIC DISORDERS AND PROTECTION BY HERBAL MEANS WITH ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY

SUMMARY

It has been proven that long-term and intensive consumption of fructose is associated with metabolic syndrome, an increased risk of developing type 2 diabetes, impaired homeostasis of the cardiovascular system, and expressed neurotoxicity. The elucidation of the mechanisms underlying the development of cognitive dysfunction in the patients with type 2 diabetes remains relevant, the central pathogenetic links of which are considered to be the vascular and neuronal dysfunction. On an experimental model of rodents intensively consuming a 50% aqueous solution of fructose (to simulate human symptoms of the metabolic and cardiovascular pathology), morphological and functional characteristics of vascular and neuronal dysfunctions have been revealed, as well as the specific features of the protective potential indicators of "Diabephyt" phytocollection, galantamine and diabeton.

Under the influence of galantamine and "Diabephyt" phytocollection, a similar pattern of changes in the activity of acetylcholinesterase in the blood plasma, as well as in neurons of the entorhinal cortex and of the magnocellular basal nucleus in intact rats was detected using the acetylcholinesterase activity determination method. On the background of prolonged intensive consumption of fructose, the phytocollection "Diabephyt" exhibited: 1) an antioxidant activity, thereby modulating the activity of malondialdehyde and superoxide dismutase to compensate for the oxidative stress induced by fructose, and also a vasoprotective effect by reducing the elevated levels of NO and ET-1 contributing to compensation for the evolved endothelial dysfunction; 2) a stabilizing effect on some metabolic parameters of the blood, cardiovascular and respiratory systems (namely, the plasma glucose level, blood pressure, heart rate, and the respiratory rate).

Under the conditions of prolonged intensive consumption of fructose, the appliance of galantamine, "Diabephyt" phytocollection and diabetone counteracts the development of fructose-mediated microvascular dysfunction, manifesting a tendency of approaching the norm of the priorly reduced by fructose indices of density and mean size of the cortical microvessels in rats. In

the neurons of the medial prefrontal cortex (mPFC) and lateral entorhinal cortex (IEC), a homeostatic level of background spike activity corresponding to the conditions of prolonged intensive fructose consumption, as well as the intensity and balance of the excitatory and inhibitory responses caused by stimulation of the cholinergic magnocellular basal nucleus have been revealed. Under the conditions of prolonged intensive fructose consumption, the effects of galantamine, phytocollection, and diabetone tend to normalize the short-term plasticity indicators by modulating the levels of background spike activity, as well as the intensity and balance of the excitatory and inhibitory responses in the NBM-mPFC and NBM-IEC local cholinergic circuits.

Conclusion: under the conditions of prolonged intensive consumption of fructose, the therapeutic effects of cholinesterase inhibitors (galantamine and the "Diabephyt") are encountered due to a combination of factors that are crucial for integrative cognitive function, including the glycemic control, activation of antioxidant systems, counteraction to microvascular dysfunction in the brain, as well as establishment and stabilization of the compensatory homeostatic plasticity of the cortical cholinergic local networks. The fundamental substantiation of the multi-vector preventive and therapeutic efficacy of the "Diabephyt" ethnobotanical medicinal phytocollection has both scientific medical-biological and socio-economic significance (in the context of a cost-effective and publicly reachable ethnopharmacological agent for improving the quality of life of diabetic patients) which enables us recommending the "Diabephyt" phytocollection as a biologically active additive for industrial purposes.