

АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗ В МОЗГЕ, МИОКАРДЕ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНЫМ ИНСУЛИНОМ

Л. А. Кузнецова, К. В. Деркач, Т. С. Шарова, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков

*ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова»
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

Кузнецова Людмила Александровна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН; *Деркач Кира Викторовна* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН; *Шарова Татьяна Сергеевна* — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН; *Бондарева Вера Михайловна* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН; *Шпаков Александр Олегович* — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН.

Контактная информация: ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» Российской академии наук (ИЭФБ РАН), пр. Тореза, д. 44, Санкт-Петербург, 194223. Тел. +7(812)552–31–17; факс (812)552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Шпаков Александр Олегович).

Резюме

Нарушения микро- и макроциркуляции при ожирении связаны с изменением активности NO-синтаз — ферментов, катализирующих синтез эндогенного NO. Однако в условиях экспериментального ожирения они изучены недостаточно. Отсутствуют данные о влиянии на активность NO-синтаз длительной обработки интраназально вводимым инсулином (ИИ), который используют для лечения предиабетических состояний. Цель работы состояла в изучении активности NO-синтаз в тканях крыс с ожирением, вызванным высокожировой диетой, и влияния длительной обработки ИИ на активность фермента. Для индукции ожирения самцов крыс Wistar в течение 4 месяцев содержали на высокожировой диете. Лечение ИИ начинали на 60-й день диеты и проводили в течение двух месяцев в суточной дозе 0,48 IU/крыса. Оценивали активность общей, эндотелиальной и нейрональной изоформ NO-синтазы в мозге, миокарде и скелетных мышцах животных. Показано, что в миокарде и скелетных мышцах крыс с ожирением активность общей и эндотелиальной NO-синтаз снижалась; в мозге она заметно не менялась. Лечение ИИ крыс с ожирением приводило к частичному или полному восстановлению активности общей и эндотелиальной NO-синтаз в миокарде и скелетных мышцах, и повышало NO-синтазную активность в мозге выше ее уровня в контроле. Таким образом, длительная обработка ИИ восстанавливает инсулиновую сигнальную систему мозга и положительно влияет на ослабленную в условиях ожирения NO-синтазную систему в ЦНС и на периферии, что может вызывать улучшение циркуляции крови и предупреждать развитие дисфункций в нервной, сердечно-сосудистой и других системах организма.

Ключевые слова: NO-синтаза, ожирение, мозг, миокард, скелетные мышцы

THE ACTIVITY OF NO-SYNTHASES IN THE BRAIN, MYOCARDIUM AND SKELETAL MUSCLES OF OBESE RATS AND THE INFLUENCE OF LONG-TERM TREATMENT WITH INTRANASAL INSULIN

L. A. Kuznetsova, K. V. Derkach, T. S. Sharova, V. M. Bondareva, A. O. Shpakov

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Thorez av., Saint-Petersburg, Russia, 194223. Phone +7 (812)552-31-17; fax +7 (812)552-30-12; E-mail: alex_shpakov@list.ru (Alexander O. Shpakov — Sc.D., Head of Laboratory of Molecular Endocrinology, I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry).

Abstract

Background. The abnormalities of micro- and macrocirculation in obesity are associated with the changes in the activity of NO-synthases, the enzymes catalyzing synthesis of endogenous NO. However, in experimental obesity they are not well understood. There are no data on the influence of long-term treatment with intranasally administered insulin (I-I) that is used for the treatment of pre-diabetic states on NO-synthase activity. **Objective.** The aim of this work was to study the activity of NO-synthases in the tissues of rats with obesity induced by high-fat diet and the influence of long-term I-I treatment on them. **Design and methods.** To induce the obesity, Wistar male rats received a high-fat diet during 4 months. The I-I treatment was started on the 60th day of the diet, and carried out for two months at a daily dose 0.48 IU/rat. The activity of total, neuronal and endothelial isoforms of NO-synthase in the brain, myocardium and skeletal muscles was evaluated. **Results.** It was shown that in the myocardium and skeletal muscles of obese rats the activity of total and endothelial NO-synthases was decreased, and in the brain it has not significantly changed. The treatment of obese rats with II resulted in partial or complete restoration of the activity of total and endothelial NO-synthases in the myocardium and skeletal muscles, and caused an increase of NO-synthase activity in the brain above this level in control. **Conclusion.** Summing up, long-term I-I treatment restores insulin signaling system in the brain and positively affect the NO-synthase system in CNS and periphery, attenuated in the obesity, which can lead to improved blood circulation and to prevent the development of dysfunctions of the nervous, the cardiovascular and other systems.

Key words: NO-synthase, obesity, brain, myocardium, skeletal muscle.

Статья поступила в редакцию 10.11.2014 и принята к печати 23.01.2015.

Введение

Ожирение, которым страдает более 20 % взрослого населения в США и странах Европы, представляет собой одну из наиболее острых социальных проблем современного индустриального общества. Ожирение является предшественником метаболического синдрома и сахарного диабета 2-го типа (СД2) и рассматривается как фактор риска для развития атеросклероза коронарных сосудов и других заболеваний сердечно-сосудистой системы. В результате возникающих при ожирении атеросклеротических изменений в сосудах нарушается микро- и макроциркуляция крови, что приводит к нарушению функционирования нервной, выделительной, опорно-двигательной и других систем организма [1–3]. В основе этого лежит нарушение функций эндотелиальных клеток, что, как полагают, связано со снижением биодоступности

оксида азота (NO). NO — липофильная молекула, которая свободно диффундирует через липидный бислой мембраны и выполняет функции вторичного посредника, регулирующего важнейшие биохимические процессы в клетках эндотелия сосудов. Его биосинтез из L-аргинина осуществляется конститутивными изоформами NO-синтазы — эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS), а также индуцибельной изоформой фермента (iNOS). Для функциональной активности eNOS и nNOS, которые, в отличие от iNOS, постоянно присутствуют во многих типах клеток и тканей, требуются кислород, Ca²⁺/кальмодулин и ряд кофакторов. Активация eNOS и nNOS гормонами, в том числе инсулином, вызывает стимуляцию NO-чувствительных цитозольных гуанилатциклаз, которые катализируют образование вторичного посредника цГМФ, что приводит к запуску внутриклеточных цГМФ-

зависимых каскадов и к релаксации гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов [4, 5].

Установлено, что в условиях метаболического синдрома и СД2 экспрессия и функциональная активность eNOS и pNOS в различных тканях снижаются, что приводит к нарушению функционирования NO-синтазной системы в эндотелии сосудов и развитию атеросклероза, диабетической кардиомиопатии и ангиопатии [6]. Однако изменения функциональной активности eNOS и pNOS при экспериментальном ожирении, вызванном высокожировой диетой, практически не изучены, что крайне актуально в условиях широкого распространения ожирения, связанного с избыточным потреблением высококалорийной жирной пищи.

Лечение животных с генетическими моделями ожирения и СД2 с помощью инъекционного инсулина частично или полностью предотвращает дисфункции эндотелиальных клеток и атеросклеротические изменения в сосудах [2, 7]. Это связывают с тем, что повышение в кровотоке уровня инсулина — гормона, стимулирующего eNOS и pNOS, в условиях инсулиновой резистентности, характерной для метаболического синдрома и СД2, восстанавливает активность инсулиновой сигнальной системы и регулируемых через нее NO-зависимых сигнальных каскадов в эндотелиальных клетках. В последние годы для коррекции метаболического синдрома и СД2, а также болезни Альцгеймера, которую часто называют сахарным диабетом 3-го типа, стали использовать интраназальный способ доставки инсулина (ИИ) [8]. В условиях снижения чувствительности тканей к инсулину повышение его концентрации в мозге приводит к восстановлению инсулиновой и сопряженных с ней сигнальных систем мозга, что препятствует развитию нейродегенеративных процессов, улучшает центральную регуляцию периферического метаболизма [1, 9]. Можно предположить, что в основе терапевтического действия ИИ лежит его влияние на NO-синтазную систему мозга (прямое действие) и на активность eNOS и pNOS в периферических тканях (опосредованное действие). Однако такие исследования до настоящего времени не проводились.

Цель работы состояла в идентификации изменений активности общей NO-синтазы и ее конститутивных изоформ в мозге, миокарде и скелетных мышцах крыс с ожирением, вызванным высокожировой диетой, а также в изучении влияния на активность этих ферментов длительного лечения крыс инсулином в условиях интраназального способа его введения.

Материалы и методы

В экспериментах использовали самцов крыс породы Wistar (возраст 5 месяцев), которых разделили на две группы — контрольных животных (группа К, $n=12$), которые находились на стандартном рационе, и крыс с экспериментальным ожирением (группа Ож, $n=12$), которые получали обогащенную жиром диету. Крыс группы Ож в течение 120 сут кормили свиным салом натошак из расчета 10–12 г на кг веса тела [10]. Через 60 сут группу К разделили на две группы К+Буф ($n=6$) и К+ИИ ($n=6$), группу Ож — на группы Ож+Буф ($n=6$) и Ож+ИИ ($n=6$). Крысы из групп К+ИИ и Ож+ИИ в течение 60 сут получали лечение инсулином, который вводили интраназально, как описано ранее [11, 12]. Кристаллический инсулин (Sigma, США) в концентрации 24 IU/мл растворяли в 0,1 М цитратном буфере (рН 4.5) и вводили крысам интраназально один раз в день. Для этого животных переворачивали на спину и вводили в каждую ноздрю по 10 мкл раствора инсулина (в общей сложности каждая крыса получала 0,48 IU инсулина в сутки). Группам К+Буф и Ож+Буф вместо раствора инсулина интраназально вводили цитратный буфер в том же объеме. По окончании эксперимента (через 120 сут) животных наркотизировали и подвергали декапитации, извлекая ткани для определения в них активности NO-синтаз. Для характеристики ожирения оценивали количество накопленного у животных абдоминального, эпидидимального и бурого жира. Для оценки толерантности к глюкозе использовали глюкозотолерантный тест (ГТТ), для чего крысам внутривентриально вводили раствор глюкозы (2 г/кг) и измеряли ее концентрацию в течение 120 мин [13].

Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, полученной из хвостовой вены крыс, используя тест-полоски One Touch Ultra (США) и глюкометр Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Концентрацию инсулина в сыворотке крови измеряли с помощью набора Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция). Для оценки чувствительности тканей к инсулину использовали индекс HOMA-IR (homeostasis model assessment — insulin resistance), который рассчитывали по формуле $(G \times I)/22,5$, где концентрация глюкозы натошак (G) выражена в мМ, а концентрация инсулина (I) — в $\mu\text{IU}/\text{мл}$. Концентрацию триглицеридов, общего холестерина и холестерина, связанного с ЛПНП и ЛПВП измеряли с помощью наборов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Россия).

В экспериментах по определению активности NO-синтаз использовали (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина дигидрохлорид (BH_4), флавиномононуклеотид (FMN), флавинадениндинуклеотид

(FAD), NADPH, каталазу из печени быка (3940 IU/мг белка), кальмодулин, L-аргинин, EDTA, EGTA, дитиотреитол, а также моноклональные антитела, специфичные к участку 1185–1205 eNOS и участку 251–270 pNOS, полученные из фирмы «Sigma» (США).

Активность NO-синтазы определяли в гомогенатах тканей согласно методу [14] на основе реакции $1.5 \text{ NADPH} + 0.5 \text{ H}^+ + 2\text{O}_2 + \text{L-аргинин} = 1.5 \text{ NADP} + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{L-цитруллин} + \text{NO}$ с учетом того, что для превращения 1 моль L-аргинина в 1 моль L-цитруллина и 1 моль NO требуется окислить 1,5 моль NADPH. Для получения гомогенатов ткани мозга (кору больших полушарий, гиппокамп, стриатум, гипоталамус), желудочки сердца, отделенные от предсердий и сердечных клапанов, а также скелетные мышцы задних конечностей гомогенизировали с помощью Политрона в охлажденном (4°C) 25 mM Tris-HCl буфере (pH 7,8), содержащем 1 mM EDTA, 1 mM EGTA и ингибиторы протеаз (в соотношении 10:1). Полученный гомогенат фильтровали через четыре слоя марли и немедленно использовали для определения активности NO-синтаз. Реакционная смесь (конечный объем 2 мл) для определения общей активности NO-синтаз содержала 40 mM Tris-HCl (pH 7,8), 3 mM дитиотреитола, 0,85 MgCl₂, 1 мкМ кальмодулина, 1 mM L-аргинина, 4 мкМ FAD, 4 мкМ FMN, 4 мкМ ВН₄, 10 IU/мл каталазы, 0,1 mM NADPH. Реакцию начинали добавлением гомогената (содержание белка 100–200 мкг) и проводили при температуре 25°C в течение 15 мин. Контролем служили пробы без L-аргинина. Скорость окисления NADPH

при участии NO-синтаз определяли спектрофотометрически по снижению поглощения при длине волны 340 нм, используя коэффициент экстинкции 6.22 mM⁻¹ см⁻¹. Активность фермента выражали в пкмоль NADP за 1 мин на 1 мг белка. В отсутствие антител определяли общую активность NO-синтаз, в то время как активность eNOS и pNOS рассчитывали путем вычитания активности NO-синтаз в присутствии специфичных антител к eNOS или pNOS (преинкубация гомогената в течение 10 мин в разведении 1:1000) из общей активности фермента, измеренной в отсутствие антител.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Данные представлены в виде $M \pm SD$ нескольких независимых экспериментов. Различия между значениями активности NO-синтаз у различных групп животных оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

У крыс с экспериментальным ожирением (Ож+Буф) были достоверно повышены масса тела и жировой ткани, уровень глюкозы и индекс НОМА-IR, который в конце эксперимента в полтора раза превышал таковой в группе К+Буф (табл.). У животных была нарушена толерантность к глюкозе, что выражалось в достоверном повышении уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки в ГТТ в сравнении с группой К + Буф ($7,6 \pm 0,6$ mM против $5,4 \pm 0,4$ mM, $P < 0,05$). В группе Ож + Буф был нарушен липидный обмен, на что указывает повышение уровня триглицеридов, общего холесте-

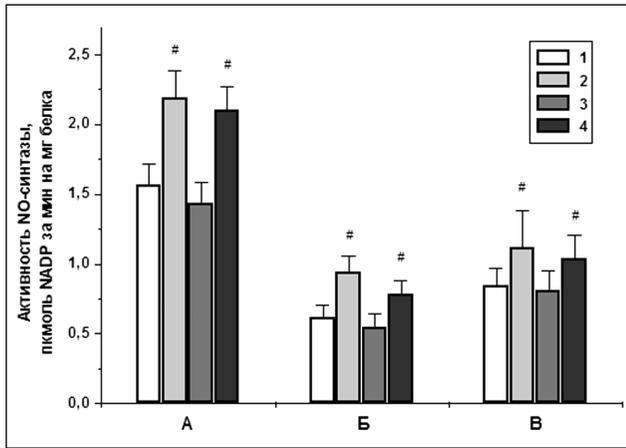
Таблица

МАССА ТЕЛА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ И У КОНТРОЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ДЛИТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ ИИ

Показатели	К + Буф, n = 6	К + ИИ, n = 6	Ож + Буф, n = 6	Ож + ИИ, n = 6
Масса тела, г	353 ± 13	328 ± 13	400 ± 17*	393 ± 19
Эпидидимальный жир, г	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3	2.6 ± 0.3*	2.3 ± 0.3
Абдоминальный жир, г	3.2 ± 0.4	2.8 ± 0.4	6.1 ± 1.3*	5.7 ± 0.8
Бурый жир, г	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2*	0.8 ± 0.2
Глюкоза (натощак), mM	4.1 ± 0.2	4.5 ± 0.3#	5.4 ± 0.6*	4.7 ± 0.3#
Инсулин, μIU/мл	5.6 ± 1.1	4.1 ± 0.5#	6.4 ± 1.0	5.9 ± 0.6
НОМА-IR	1.01 ± 0.21	0.80 ± 0.08#	1.53 ± 0.27*	1.23 ± 0.16#
Триглицериды, mM	0.74 ± 0.07	0.70 ± 0.07	1.23 ± 0.14*	1.21 ± 0.18
Общий холестерин, mM	4.53 ± 0.32	5.26 ± 0.34#	5.84 ± 0.32*	5.79 ± 0.41
Холестерин-ЛПВП, mM	2.71 ± 0.28	2.83 ± 0.15	2.50 ± 0.19	2.68 ± 0.21
Холестерин-ЛПНП, mM	1.64 ± 0.06	1.88 ± 0.20#	2.69 ± 0.27*	2.43 ± 0.34
Соотношение холестерин-ЛПНП/ЛПВП	0.61 ± 0.06	0.66 ± 0.05	1.08 ± 0.07*	0.90 ± 0.08#

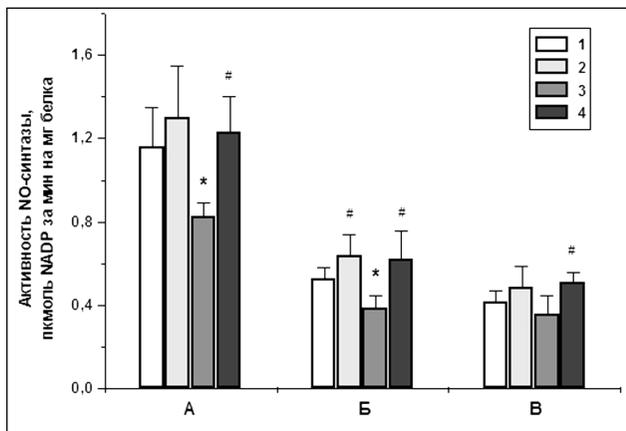
Примечание: Все показатели измерены при окончании эксперимента. *Различия между группами К+Буф и Ож+Буф достоверны при $P < 0.05$, # различия между группами К+Буф и К+ИИ или между группами Ож+Буф и Ож+ИИ достоверны при $P < 0.05$.

Рисунок 1. Общая активность NO-синтаз (А) и активность эндотелиальной (Б) и нейрональной (В) изоформ фермента в тканях мозга контрольных крыс и животных с экспериментальным ожирением и влияние на них длительной обработки интраназальным инсулином



Примечание: 1 — группа К+Буф; 2 — группа К+ИИ; 3 — группа Ож+Буф; 4 — группа Ож+ИИ. Активность NO-синтаз выражена в пкмоль NADP за 1 мин на 1 мг белка. * Различия между группами К+Буф и Ож+Буф достоверны при $P < 0,05$, # различия между группами К+Буф и К+ИИ или между группами Ож+Буф и Ож+ИИ достоверны при $P < 0,05$.

Рисунок 2. Общая активность NO-синтаз (А) и активность eNOS (Б) и nNOS (В) в миокарде контрольных крыс и животных с ожирением и влияние на них длительной обработки ИИ

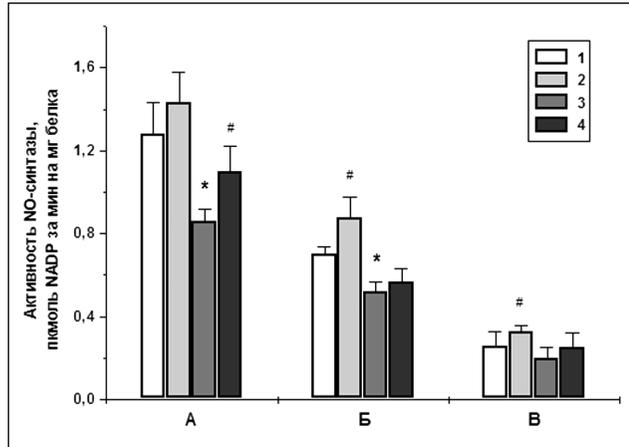


Примечание: 1 — группа К+Буф; 2 — группа К+ИИ; 3 — группа Ож+Буф; 4 — группа Ож+ИИ. Активность NO-синтаз выражена в пкмоль NADP за 1 мин на 1 мг белка. * Различия между группами К+Буф и Ож+Буф достоверны при $P < 0,05$, # различия между группами К+Буф и К+ИИ или между группами Ож+Буф и Ож+ИИ достоверны при $P < 0,05$.

на, холестерина-ЛПНП и соотношения холестерин-ЛПНП/ЛПВП на 66, 29, 64 и 77 %, соответственно. Эти данные свидетельствуют о развитии у крыс группы Ож+Буф инсулиновой резистентности и дислипидемии. Лечение животных с помощью ИИ в течение двух месяцев (суточная доза 0,48 IU/крысу) существенно не влияло на массу тела и жировой ткани, а также на показатели липидного обмена, но при этом улучшало гликометаболические показатели. Это выражалось в снижении уровня глюкозы и инсулина натощак и индекса НОМА-IR (табл.), а также в частичном восстановлении толерантности к глюкозе — через 60 и 120 мин после нагрузки уровень глюкозы снижался в сравнении с таковым группой Ож+Буф на 29 и 19 %, соответственно. Обработка контрольных крыс ИИ приводила к повышению у них уровня глюкозы, снижению уровня инсулина и индекса НОМА-IR, а также к подъему уровня общего холестерина и холестерин-ЛПНП (табл.). Полученные данные свидетельствуют о том, что гиперактивация инсулиновой системы мозга при введении гормона здоровым животным может приводить к изменению у них ряда метаболических показателей.

В тканях мозга крыс с ожирением не было выявлено заметных изменений активности как общей NO-синтазы, так и конститутивных изоформ фермента (рис. 1). В миокарде крыс группы Ож+Буф достоверно снижались активность общей NO-синтазы и eNOS, в то время как активность nNOS сохранялась (рис. 2). Сходная картина наблюдалась в скелетных мышцах крыс с ожирением, где активность общей NO-синтазы и eNOS была снижена в сравнении с контролем на 33 и 26 %, в то время как активность nNOS практически не менялась (рис. 3). Эти данные согласуются с тем, что в условиях метаболического синдрома и СД2, предшественником и составным компонентом которых является ожирение, наибольшие изменения микро- и макроциркуляции происходят в сердечной мышце, в то время как в мозге они выявляются только при длительном и тяжелом течении заболеваний. Выявленное нами значительное ослабление активности eNOS в скелетных мышцах в условиях ожирения свидетельствует о том, что NO-сигнальные каскады в этой ткани могут нарушаться уже на ранних стадиях развития метаболического синдрома и СД2. Причиной этого, как мы полагаем, является развивающаяся при ожирении и характерная для метаболического синдрома и СД2 резистентность мышечных тканей к инсулину [15] и усиление деградации конститутивных изоформ NO-синтазы в протеосомах [16]. Следствием снижения активности NO-синтаз

Рисунок 3. Общая активность NO-синтаз (А) и активность eNOS (Б) и nNOS (В) в скелетных мышцах контрольных крыс и животных с экспериментальным ожирением и влияние на них длительной обработки ИИ



Примечание: 1 — группа К+Буф; 2 — группа К+ИИ; 3 — группа Ож+Буф; 4 — группа Ож+ИИ. Активность NO-синтаз выражена в пкмоль NADPH за 1 мин на 1 мг белка. * Различия между группами К+Буф и Ож+Буф достоверны при $P < 0,05$, # различия между группами К+Буф и К+ИИ или между группами Ож+Буф и Ож+ИИ достоверны при $P < 0,05$.

в скелетных мышцах являются нарушение их кровоснабжения, окислительно-восстановительного баланса, запуск дегенеративных и воспалительных процессов.

Длительное лечение ИИ крыс с ожирением полностью восстанавливало активность общей NO-синтазы и eNOS в миокарде (рис. 2). В скелетных мышцах лечение крыс ИИ частично восстанавливало активность общей NO-синтазы, в то время на активность eNOS оно практически не влияло, вследствие чего она оставалась сниженной в сравнении с контролем (рис. 3). В мозге крыс группы Ож+ИИ активность как общей NO-синтазы, так и ее конститутивных изоформ превышали их значение в контроле (рис. 1). Эти данные указывают на частичное или полное восстановление активности NO-синтаз в миокарде и скелетных мышцах крыс с ожирением, длительное время леченных ИИ, а также на способность ИИ при его длительном введении гиперактивировать NO-сигнальные пути в мозге. В этой связи следует отметить, что при обработке ИИ контрольных животных, получавших стандартную диету, во всех изученных тканях наблюдали повышение активности NO-синтаз, причем активность eNOS повышалась во всех изученных тканях, а в мозге также повышалась активность общей NO-синтазы и nNOS (рис. 1–3).

Установлено, что в условиях метаболического синдрома и СД2 концентрация инсулина в мозге,

в отличие от периферии, снижается, что, наряду с развивающейся инсулиновой резистентностью, в значительной степени нарушает функциональную активность зависимых от инсулина сигнальных каскадов в ЦНС [17]. На основании этого мы полагаем, что в основе положительного влияния ИИ на активность NO-синтаз в мозге и периферических тканях крыс с ожирением лежит повышение концентрации гормона в мозге и восстановление функционирования инсулиновой сигнальной системы, в первую очередь в гипоталамических нейронах. Это, в свою очередь, самым непосредственным образом влияет на активность других гормональных и нейромедиаторных систем, включая лептиновую, меланокортиновую, серотониновую, контролирующую важнейшие биохимические и физиологические процессы в ЦНС и на периферии [18, 19].

Таким образом, нами установлено, что при ожирении, вызванном высокожировой диетой, в миокарде и скелетных мышцах крыс снижается активность общей NO-синтазы и eNOS, в то время как активность nNOS существенно не меняется. В мозге контрольных крыс и животных с ожирением достоверных различий в активности NO-синтаз выявлено не было. Длительное лечение животных с помощью ИИ приводило к частичному (скелетные мышцы) или полному (миокард) восстановлению активности NO-синтаз, и повышало активность фермента в мозге выше ее уровня у контрольных животных. Показано также, что введение ИИ здоровым животным приводит к повышению у них активности общей NO-синтазы и конститутивных изоформ фермента, в наибольшей степени в мозге. Полученные данные указывают на терапевтический потенциал длительного лечения ИИ на микро- и макроциркуляцию крови в ЦНС и в периферических органах и тканях в условиях ожирения, что может быть использовано для предотвращения кардиомиопатии, нейропатии, энцефалопатии и других патологий, функционально связанных с нарушением кровообращения, с высокой частотой развивающихся у пациентов с избыточным весом, метаболическим синдромом и СД2.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14–15–00413).

Список литературы

1. Bourgoin F, Bachelard H, Badeau M et al. Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am J Physiol.* 2008;295(3):1044–1055. doi: 10.1152/ajpheart.00516.2008.
2. Kearney MT, Duncan ER, Kahn M, Wheatcroft SB. Insulin resistance and endothelial cell dysfunction:

- studies in mammalian models. *Exp Physiol.* 2008;93(1):158–163.
3. Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(6):754–764.
4. Anfossi G, Massucco P, Mattiello L et al. Insulin influences the nitric oxide cyclic nucleotide pathway in cultured human smooth muscle cells from corpus cavernosum by rapidly activating a constitutive nitric oxide synthase. *Eur J Endocrinol.* 2002;147(5):689–700.
5. Li H, Jamal J, Plaza C et al. Structures of human constitutive nitric oxide synthases. *Acta Crystallogr.* 2014;70:2667–2674. doi: 10.1107/S1399004714017064.
6. Carnicer R, Crabtree MJ, Sivakumaran V, Casadei B, Kass DA. Nitric oxide synthases in heart failure. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(9):1078–1099. doi: 10.1089/ars.2012.4824.
7. Zecchin HG, Bezerra RM, Carvalheira JB et al. Insulin signalling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance — the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia.* 2003;46(4):479–491.
8. Benedict CI, Frey WH 2nd, Schiöth HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Exp Gerontol.* 2011;46(2–3):112–115. doi: 10.1016/j.exger.2010.08.026.
9. Toda N, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012;32(3):569–578. doi: 10.3233/JAD-2012-120670.
10. Srinivasan K1, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005;52(4):313–320.
11. Shpakov AO, Chistyakova OV, Derkach KV et al. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur J Biol.* 2012;7:33–47.
12. Шпаков АО, Деркач КВ, Чистякова ОВ, Мойсеев ИВ, Сухов ИБ, Бондарева ВМ. Влияние интраназального инсулина и серотонина на функциональную активность аденилатциклазной системы в миокарде, яичниках и матке крыс с пролонгированной неонатальной моделью сахарного диабета. *Журн эвол биохим физиол.* 2013;49(2):118–127.
13. Деркач КВ, Шпакова ЕА, Жарова ОА, Шпаков АО. Метаболические изменения у крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида, производного N-концевого участка меланокортинового рецептора 4-го типа. *Доклады Академии наук.* 2014;458(1):102–105.
14. Stuehr DJ, Griffith OW. Purification, assay and properties of mammalian nitric oxide synthases. In: *Methods in Nitric Oxide Research* (Eds. M. Feelisch, J. S. Stamler). Chichester: John Wiley & Sons Inc. 1996:177–186.
15. Eghbalzadeh K, Brixius K, Bloch W, Brinkmann C. Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in “diabesity” — what about the relevance of exercise training interventions? *Nitric Oxide.* 2014;15:28–40. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.009.
16. Mezghenna K, Leroy J, Azay-Milhau J et al. Counteracting neuronal nitric oxide synthase proteasomal degradation improves glucose transport in insulin-resistant skeletal muscle from Zucker fa/fa rats. *Diabetologia.* 2014;57(1):177–186. doi: 10.1007/s00125-013-3084-9.
17. Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:161. doi: 10.3389/fendo.2014.00161.
18. Шпаков АО, Деркач КВ. Пептидергические сигнальные системы мозга при сахарном диабете. *Цитология.* 2012;54(10):733–741. [Shpakov AO, Derkach KV. The brain peptidergic signaling systems in diabetes mellitus. *Tsitologiya.* 2012;54(10):733–741. In Russian].
19. Шпаков АО. Сигнальные системы мозга, регулируемые инсулином, ИФР-1 и лептином, в условиях предиабета и сахарного диабета 2-го типа. *Цитология.* 2014;56(11):789–799. [Shpakov AO. The role of alterations in the brain signaling systems regulated by insulin, IGF-1 and leptin in the transition of impaired glucose tolerance to overt type 2 diabetes mellitus. *Tsitologiya.* 2014;56(11):789–799. In Russian].