

## ПОВРЕЖДЕНИЕ МОЗГА ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА БЕЛКА ПАННЕКСИНА 1

© 2024 г. М. А. Николаенко<sup>1</sup>, М. В. Гуляев<sup>1</sup>, А. А. Волкова<sup>1,2</sup>, Л. Р. Горбачева<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова  
Минздрава России, Москва, Россия

\* E-mail: gorbi67@mail.ru

Поступила в редакцию 06.08.2024 г.

После доработки 11.10.2024 г.

Принята к публикации 14.10.2024 г.

Сахарный диабет, наряду с ишемией, входит в десятку патологий, являющихся причиной смертности населения планеты, по последним данным ВОЗ. Данные клинических исследований выявили высокий риск инсульта и инфаркта у пациентов, страдающих диабетом. Вместе с тем в настоящее время нет четкого представления об участии белка паннексина 1 (Panx1) в ишемии мозга на фоне диабета. В представленном исследовании с использованием линии мышей с нокаутом гена Panx1 на моделях стрептозотоцин-вызванного диабета и фотоиндуцированной ишемии было изучено влияние белка Panx1 на выраженность ишемического поражения мозга и системное воспаление у мышей на фоне сочетания ишемии мозга и диабета. Установлено, что в условиях экспериментального диабета нокаут гена Panx1 значительно снижает размер ишемического очага, стабилизирует вызванное ишемией повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, снижает количество ошибок животных в сенсомоторном тесте и уровень нейтрофилов в крови. Важно отметить, что нокаут Panx1 проявляет протекторное действие только на фоне сахарного диабета, не оказывая значимого воздействия на выраженность ишемического поражения мозга у мышей без стрептозотоцин-вызванного диабета. Нокаут гена Panx1 также не влиял на выраженность гипергликемии у животных в этой модели диабета. Можно предположить, что эффективность лечения инсульта в сочетании с сахарным диабетом может быть повышена включением в комплексную терапию блокаторов паннексиновых каналов как нового направления лечения таких тяжелых заболеваний.

*Ключевые слова:* диабет, ишемия, паннексин 1, фототромбоз, нокаут, воспаление

**DOI:** 10.31857/S08698139241000105, **EDN:** VREWNE

### ВВЕДЕНИЕ

Инсульт является одной из основных причин смертности населения планеты, составляя 11% от общего числа смертей за 2020 г. [1]. К настоящему времени сахарный диабет (СД) также вошел в список десяти основных причин смертности населения [2]. При этом СД дает двукратный избыточный риск для широкого спектра сосудистых за-

болеваний, включая инсульт [3]. Данные клинических исследований указывают на повышение риска неблагоприятного краткосрочного исхода инсульта у больных на фоне диабета [4], что свидетельствует о необходимости дополнительного обследования и коррекции фармакотерапии с учетом наличия данного заболевания у пациентов с инсультом. На данный момент отсутствуют специфические терапевтические подходы для лечения последствий ишемического инсульта, осложненного диабетом, а признанные методы терапии инсульта ограничены тромболизом. Поэтому остается актуальной как для фундаментальной, так и для клинической медицины задача поиска новых мишеней коррекции такого состояния.

Одной из таких мишеней могут быть открытые в 2000 г. каналы, сформированные белком паннексином-1 (Panx1). В физиологических условиях эти каналы участвуют в транспорте нуклеотидов как из нейронов и астроцитов, так и из эндотелия сосудов и эритроцитов в условиях недостатка кислорода [5]. Данные литературы свидетельствуют о вовлечении данного белка в ряд патологических реакций при ишемии, таких как нарушение ионного гомеостаза, потенцирование глутаматной эксайтотоксичности, кальциевой перегрузки клеток [6]. Однако данные экспериментов *in vivo* не дают однозначного ответа об участии Panx1 в ишемическом повреждении головного мозга. Было показано, что нокаут Panx1 не влиял на выраженность повреждения мозга в модели окклюзии средней мозговой артерии (МСАО) у мышей [7]. В то же время были продемонстрированы протекторные эффекты как блокады канала Panx1 инъекциями мефлохина и пробеницида, так и системного нокаута гена данного белка в модели кратковременной МСАО на мышах, что выражалось в уменьшении очага повреждения, нейровоспаления, реактивности микроглии и сенсомоторного дефицита, уменьшении отека за счет снижения экспрессии аквапорина-4 и повышения выживаемости нейронов [8, 9]. В работе Freitas-Andrade с соавт. сообщалось о проявлении протекторного действия нокаута данного белка только у самок мышей в модели постоянной МСАО, что авторы связывают с вовлечением Panx1 в передачу сигнала от эстрогеновых рецепторов типа  $\beta$ . При этом у самок линии дикого типа, на основе которой был сделан тотальный нокаут, общая экспрессия Panx1 в условиях ишемии была выше, чем у самцов [10].

Таким образом, несмотря на существующие данные о вовлеченности каналов, формируемых Panx1, в развитие ишемического поражения, эксперименты на животных с использованием модели МСАО не дают однозначного представления о протекторной роли блокады комплекса Panx1 или нокаута гена данного белка. Сами авторы исследований отмечают, что противоречивость полученных результатов в значительной степени может быть связана с использованием различных экспериментальных подходов к моделированию ишемического инсульта. В связи с этим становится очевидным, что для всестороннего исследования участия каналов Panx1 в развитии ишемического поражения мозга необходимо использовать различные модели данной патологии. В этом отношении фотоиндуцированная ишемия является одной из наиболее перспективных моделей ишемического инсульта ввиду малоинвазивности и высокой воспроизводимости четко заданной локализации ишемического очага [11].

Наряду с ишемией, в десятку патологий, являющихся причиной смерти населения планеты, по последним данным ВОЗ, входит СД. Пациенты, страдающие диабетом, входят в группу риска развития инсульта и инфаркта. В литературе мы не обнаружили данных о вовлечении Panx1 в развитие ишемического поражения мозга на фоне СД. Однако было показано, что экспрессия Panx1 была повышена как в мозге крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, так и в культуре нейронов через 24 ч после воздействия среды с высокой концентрацией глюкозы. Обработка культуры пробенцидом, блокирующим каналы Panx1, в гипергликемических условиях снижала содержание активной каспазы-1 и уровень секреции IL-18, повышала жизнеспособность нейронов. В качестве механизма, посредством которого каналы Panx1 вносят вклад в воспаление на фоне повышенного уровня глюкозы, авторы рассматривают паннекс-

син-зависимую активацию рецепторных белков инфламмасом NLRP. АФК, продукция которых повышается при гипергликемии, могут увеличивать проводимость поры канала Panx1. В то же время окислительный стресс, сопровождающий диабет, индуцирует появление молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMPs), которые проникают в клетку через расширенную пору канала и активируют рецепторные белки NLRP, опосредуя сборку инфламмасом [12]. Наличие в литературе данных о протекторной роли блокады каналов Panx1 в нейронах на фоне гипергликемии указывает на возможность участия данного белка в диабет-индуцированных изменениях физиологических процессов в нервной ткани.

Несмотря на то, что каналы Panx1 представляют собой перспективную и активно изучаемую мишень коррекции патологий, нами не обнаружено данных о его роли в ишемии мозга на фоне СД, в связи с чем представляется актуальной задача выяснения его роли в условиях сочетания этих патологий.

Цель работы – изучить влияние нокаута гена Panx1 на последствия ишемии головного мозга у мышей в модели стрептозотоцин-индуцированного диабета.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Объект исследования*

Эксперименты были проведены на самцах мышей линии C57BL/6J и родственной линии с нокаутом гена паннексина-1 (Panx1<sup>-/-</sup>) (любезно предоставлены Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск [13]) массой 20–35 г в возрасте 10–12 недель. Животных содержали в условиях вивария с контролируемой температурой 22 °С и режимом освещения 12 ч свет (9:00–21:00)/12 ч темнота без ограничения доступа к воде.

### *Использованные вещества и препараты*

Во всех процедурах с наркотизированными животными, кроме магнитно-резонансной томографии (МРТ), в качестве общей анестезии использовали смесь коммерческих препаратов «Золетил100 ©» (VirbacSanteAnimale, Франция) и «Ксила ©» (Interchemiewerken «DeAdelaar» B.V., Нидерланды) в дозах 35 и 3.5 мг/кг (в/б) соответственно. Во время проведения МРТ использовали ингаляционный наркоз (Изофлуран, Laboratorios Karizoo, Испания). Для моделирования диабета был использован неселективный токсичный алкилирующий агент стрептозотоцин (Sigma Aldrich Co., США). В качестве фотосенсибилизатора при моделировании ишемического инсульта использовали 0.15%-ный раствор бенгальского розового (БР, Sigma Aldrich Co., США). Для измерения проницаемости гематоэнцефалического барьера использовали 2.4%-ный раствор красителя Эванса синего (ЭС, Sigma Aldrich Co., США), а также диметилсульфоксид (ДМСО) (MPBiochemicals, Франция). При оценке соотношения числа нейтрофилов и лимфоцитов препарат фиксировали метанолом (FisherChemical, Германия) и окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, Россия).

### *Моделирование ишемии мозга на фоне сахарного диабета*

Животных случайным образом разделяли на 4 группы, по  $\geq 5$  животных в каждой: две группы без диабета, дикого типа (WT) и с нокаутом гена паннексина-1 (KO), и две группы со стрептозотоцин-индуцированным диабетом тех же линий (WTd и KOd). Животных содержали в условиях вивария с контролируемой температурой 22 °С и режимом освещения 12 ч свет (9:00–21:00)/12 ч темнота без ограничения доступа к воде и к стандартному комбикорму, за исключением дней измерения уровня глюкозы, когда за 3 ч до измерения животным ограничивали доступ к корму. У всех животных до начала эксперимента определяли базовый уровень глюкозы в крови, массу тела,

соотношение нейтрофилов и лимфоцитов в мазке крови. Диабет индуцировали серией внутрибрюшинных инъекций стрептозотоцина, растворенного в натрий-цитратном буфере (рН 4.5) в дозе 55 мг/кг, ежедневно в течение 5 последовательных дней. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили растворитель в эквивалентном объеме. Уровень глюкозы у животных измеряли с помощью глюкометра Diacont Classic 2598 (OK Biotech Co., Ltd., Тайвань) на 8-, 10-, 12- и 16-й дни. Критерием развития устойчивой гипергликемии был уровень глюкозы 16.7 мМ (300 мг/дл) на момент последнего измерения (перед катетеризацией яремной вены) [14]. Каплю крови для анализа в глюкометре отбирали пункцией латеральной вены хвоста с помощью иглы 27G. Животных взвешивали ежедневно в первые две недели с первой инъекции стрептозотоцина и ежедневно после операции катетеризации яремной вены. Животным ограничивали доступ к корму на 4–6 ч в вечернее время в дни инъекций стрептозотоцина и измерения концентрации глюкозы.

На 13-й день после первой инъекции стрептозотоцина всем животным проводили операцию введения полиуретанового катетера во внутреннюю яремную вену для последующего моделирования ишемического инсульта посредством фототромбоза (ФТ) по ранее описанной методике [15]. Через двое суток после катетеризации с помощью стереотаксической установки устанавливали лазер ( $\lambda$  532 нм, диаметр апертуры 3 мм, величина освещенности на поверхности черепа 55–60 лк, Viacho, Китай) так, чтобы он светил в область сенсомоторной коры ( $ML = -2.2$  мм,  $AP = 0$  мм [16]). В качестве фотосенсибилизатора использовали 0.15%-ный раствор бенгальского розового (БР, Sigma, США), который вводили внутривенно через катетер в дозе 10 мг/кг в течение 15 с (объем введения не превышал 300 мкл), и через 3 минуты включали лазерную установку на 5 мин.

#### *Измерение объема ишемического поражения головного мозга*

Объем повреждения головного мозга, вызванного ишемией, оценивали с помощью МРТ через 48 ч после фототромбоза на томографе BRUKER BioSpec 70/30 USR (Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл, на основе T2-взвешенных изображений. Область сканирования 16 срезов толщиной 0.4 мм составила 18 x 18 мм<sup>2</sup>, матрица сканирования – 180 x 180, общее время сканирования для каждого животного не превышало 30 мин. Изображения серий фронтальных срезов мозга анализировали в программе ImageJ (National Institutes of Health, США). Чтобы скорректировать вычисляемый объем с учетом отека поврежденного полушария, вводили множитель 1/к. Степень отека ипсилатерального повреждению полушария (к) подсчитывали по формуле  $k = d^*(\sum A_{\text{ипсилат.}}/\sum A_{\text{контралат.}})$ , где  $\sum A_{\text{ипсилат.}}$  и  $\sum A_{\text{контралат.}}$  – сумма площадей ипсилатерального и контралатерального полушария в серии срезов толщиной d. Объем поражения определяли по формуле  $(d^*\sum A)/k$ , где  $\sum A$  – сумма площадей области повреждения в серии срезов толщиной d.

#### *Измерение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)*

Для измерения проницаемости ГЭБ через сутки после ФТ животным внутривенно через катетер вводили 2.4%-ный раствор витального красителя Эванса синего (ЭС, Sigma, США) в дозе 80 мг/кг (объем введения не превышал 150 мкл). Далее через сутки проводили транскардиальную перфузию гепаринизированным физиологическим раствором (40 ед/мл) по стандартной методике [17] для выведения крови и красителя ЭС из кровеносного русла. Проницаемость ГЭБ оценивали по предложенной ранее методике, определяя содержание ЭС в гомогенате выделенных полушарий мозга животных после экстракции красителя в ДМСО (MPBiochemicals, Франция) на термошейкере (48 ч, 37 °С) и центрифугирования (9000 g, 25 мин) с последующим определением оптической плотности ( $\lambda$  620 нм) полученного экстракта [18]. На основе калибровочного графика рассчи-

тывали концентрацию красителя в образце (массу красителя, содержащуюся в 100 мг ткани мозга) и вычисляли его относительное содержание в ипсилатеральном полушарии (в контралатеральном полушарии данный показатель был принят за 100%) [14].

#### *Тест «Решетка»*

Для оценки неврологического статуса непосредственно перед и через двое суток после фототромбоза проводили сенсомоторный тест «Решетка» [19]. На 5-минутной видеозаписи подсчитывали два параметра: общую двигательную активность животного, оцениваемую как число шагов, которые мышшь совершает задней ипсилатеральной конечностью –  $n$  общ., и число случаев свободного проскальзывания лап мышши в ячейки –  $n$  (моторные ошибки). Вычисляли число моторных ошибок, нормированное на 100 шагов животного, по формуле ( $n/n$  общ.  $\times$  100), результаты представляли в виде разности соответствующих показателей до и после индукции ишемии: ( $n$  после/ $n$  общ. –  $n$  до/ $n$  общ.)  $\times$  100.

#### *Оценка воспалительного статуса животных*

Для оценки системного воспаления определяли процентное соотношение нейтрофилов в мазках крови из латеральной хвостовой вены у мышши исследуемых групп. Референсными значениями для взрослых мышши линии C57BL/6J считали: сегментоядерные нейтрофилы: 8–20%, лимфоциты 76–91% [20]. Каплю крови наносили на предметное стекло и делали тонкий мазок пластиковым шпательем. После высушивания на воздухе препарат фиксировали метанолом (FisherChemical, Германия) и высушивали в химическом шкафу с вытяжкой, а затем окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 7 мин. Затем стекла промывали водой, удаляя остатки красителя. Число лимфоцитов и нейтрофилов подсчитывали на микроскопе (ЛОМО, Россия) вручную с помощью программы WBC Counter (Kazuoyoshi Sasaoka, Япония). Для каждого мазка подсчет клеток продолжали до достижения общего числа лейкоцитов 100, после чего рассчитывали процент нейтрофилов, поскольку именно его увеличение отражает выраженность воспалительного процесса.

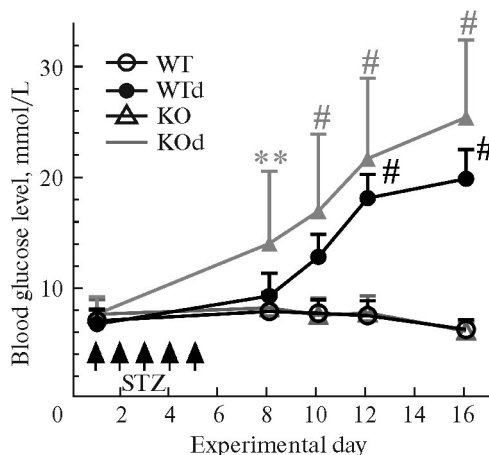
#### *Статистический анализ*

Статистический анализ был выполнен с использованием программы GraphPadPrism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения полученных данных определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непарного  $t$ -теста или трехфакторного дисперсионного анализа. Множественные сравнения проводили с помощью апостериорного теста Шидака. Для исключения выпадающих значений использовали метод ROUT. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

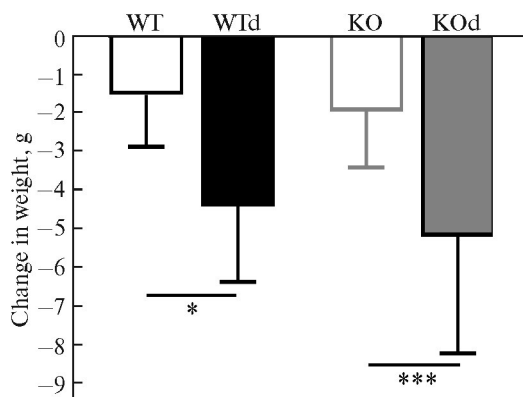
### *Динамика развития стрептозотоцин-вызванного диабета у мышши*

Используемый нами протокол введения стрептозотоцина приводил к развитию диабета у животных на 10–12-й день эксперимента, что подтверждалось стойким повышением уровня глюкозы (рис. 1). Концентрация глюкозы в крови мышши КО уже на 8-й день достигала  $13.9 \pm 6.6$  мМ, что значимо отличалось от исходных показателей и от значений у контрольной группы животных. Стойкая гипергликемия (содержание глюкозы в крови выше 16 мМ) у мышши с нокаутом гена *Panx1* развивалась на 10-й день, а у животных дикого типа на 12-й, на что указывает наличие достоверных отличий измеряемого показателя в сравнении с 1-м днем эксперимента.



**Рис. 1.** Динамика изменения уровня глюкозы в крови у мышей исследуемых групп. WT – дикий тип (без диабета), Panx1 KO – нокаут гена паннексина 1 (без диабета), WTd, KOd – соответствующие группы мышей с экспериментальным диабетом. WT  $n = 7$ , WTd  $n = 9$ , KO  $n = 18$ , KOd  $n = 15$ . Данные представлены в виде средних  $\pm$  стандартное отклонение. Трехфакторный ДА, апостериорный тест Шидака, различия достоверны: \*\* –  $p < 0.01$ , # –  $p < 0.0001$  (по сравнению с той же группой в 1-й день эксперимента).

Наряду с гипергликемией, другим симптомом, характерным для СД, является снижение массы тела, поэтому данный параметр оценивали регулярно наряду с изменением концентрации глюкозы. Было установлено, что при 2-недельном диабете снижение массы тела составило  $4.43 \pm 1.97$  г у животных дикого типа ( $n = 9$ ) и  $5.23 \pm 3.04$  г у мышей с нокаутом гена Panx1 ( $n = 15$ , рис. 2). Снижение массы тела наблюдали и у контрольных групп ( $1.5 \pm 1.4$  г и  $1.97 \pm 1.46$  г у дикого типа,  $n = 6$ , и нокаутов по Panx1,  $n = 17$  соответственно), однако оно было статистически значимо ниже, чем в группах соответствующего генотипа с диабетом. При этом ни в контроле, ни при диабете между животными, нокаутными по Panx1 и с полноценной экспрессией данного белка в изменении уровня глюкозы в крови и массы тела, статистический анализ не выявил значимых различий.



**Рис. 2.** Изменение массы тела у мышей исследуемых групп в последний день эксперимента в сравнении с первым днем. WT – дикий тип (без диабета,  $n = 6$ ), KO – нокаут гена паннексина 1 (без диабета,  $n = 17$ ); WTd ( $n = 9$ ), KOd ( $n = 15$ ) – соответствующие группы мышей с сахарным диабетом. Данные представлены в виде средних  $\pm$  стандартное отклонение. Трехфакторный ДА, апостериорный тест Шидака, различия достоверны: \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

*Влияние нокаута гена  $Panx1$  на развитие поражения мозга при фототромбоз-вызванной ишемии у мышей на фоне диабета*

Размер очага повреждения является основным показателем тяжести ишемии. В результате анализа T2-взвешенных изображений было установлено, что нокаут гена  $Panx1$  в 1.5 (1.2–1.7) раза снижал размер очага у животных на фоне 2-недельного диабета (рис. 3). Следует отметить, что у контрольных животных, которым не вводили стрептозотцин, нокаут гена  $Panx1$  не влиял на размер ишемического очага (рис. 3), не было достоверных отличий и в выраженности ишемического повреждения (всех измеряемых параметров за исключением теста «Решетка») у мышей при сравнении групп дикого типа с диабетом и без него.

Площадь экстравазации красителя эванса синего (ЭС) может применяться для оценки размера повреждения мозговой ткани при ишемии наряду с МРТ-методом [21]. Изменения, наблюдаемые при оценке экстравазации ЭС, были сопоставимы с результатами МРТ (рис. 4). Так, в условиях 2-недельного диабета площадь экстравазации у мышей с нокаутом гена  $Panx1$  ( $n = 14$ ) была в 1.8–2 раза меньше, чем у мышей дикого типа ( $n = 8$ ).

*Влияние нокаута гена  $Panx1$  на индуцированное ишемией нарушение ГЭБ у мышей на фоне диабета*

Нокаут гена  $Panx1$  также существенно изменял фототромбоз-вызванное нарушение ГЭБ у мышей при 2-недельном диабете. При этом проницаемость ГЭБ у животных дикого типа была в 3.8 раза выше, чем у животных, нокаутных по гену  $Panx1$  (рис. 4b).

*Влияние нокаута гена  $Panx1$  на развитие фототромбоз-вызванного нарушения сенсомоторного статуса у мышей на фоне диабета*

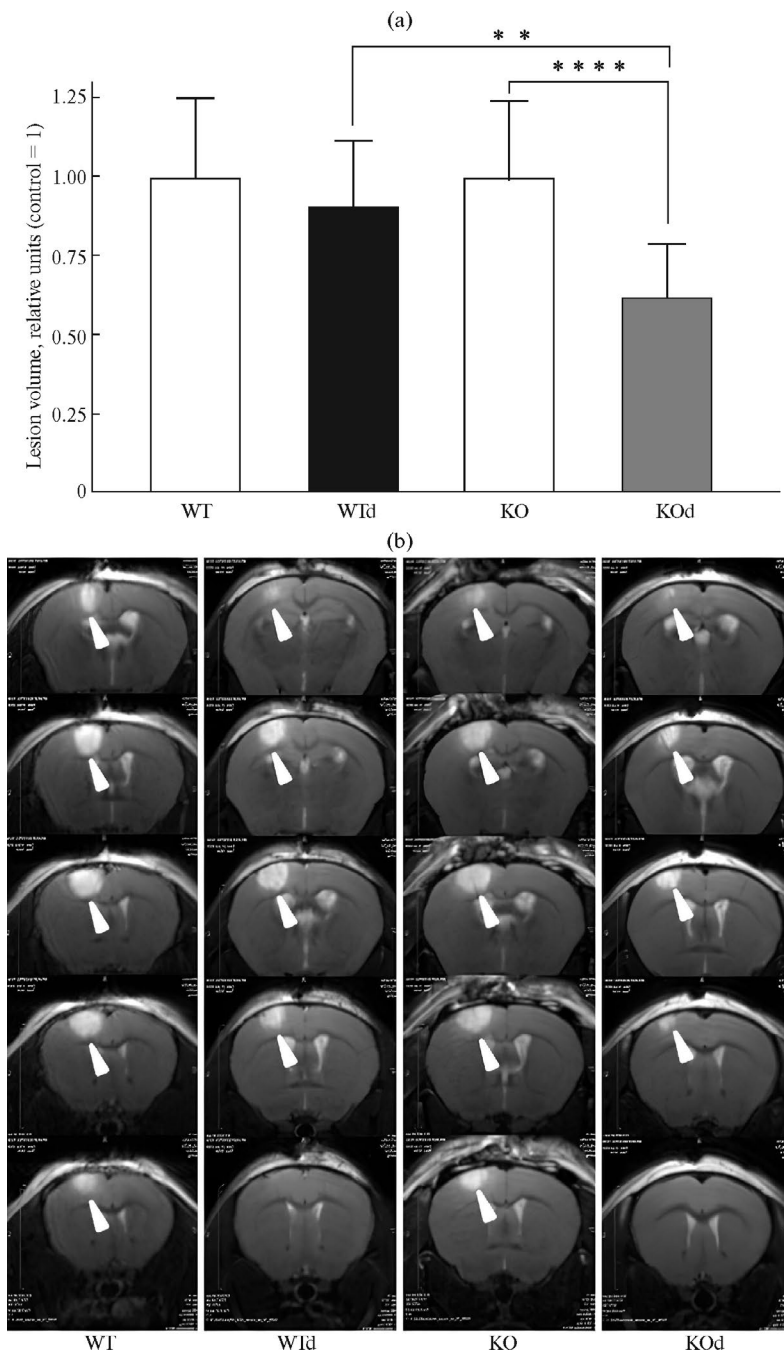
Оценка сенсомоторного статуса животных при моделировании ишемии коры больших полушарий в области пре- и постцентральной извилины является комплексным показателем выраженности ишемического повреждения. В нашей работе индукция ишемии приводила у животных всех групп к значимому увеличению числа моторных ошибок в тесте «Решетка». Нокаут гена  $Panx1$  приводил к почти 3-кратному снижению количества моторных ошибок у животных на фоне 2-недельного диабета (рис. 5).

*Влияние нокаута гена  $Panx1$  на развитие воспаления, вызванного фотоиндуцированной ишемией, у мышей на фоне диабета*

В качестве показателя системного воспаления в данном исследовании оценивали долю нейтрофилов в периферической крови с использованием окрашивания по Романовскому – Гимзе. Уровень нейтрофилов на фоне диабета до ФТ показал, что у группы с нокаутом гена  $Panx1$  ( $n = 15$ ) количество нейтрофилов было значимо ниже, чем у животных дикого типа ( $n = 9$ ) (рис. 6a). При этом изолированное действие диабета не вызывало значимого повышения уровня нейтрофилов по сравнению с данным показателем в контрольной группе (дикий тип без диабета).

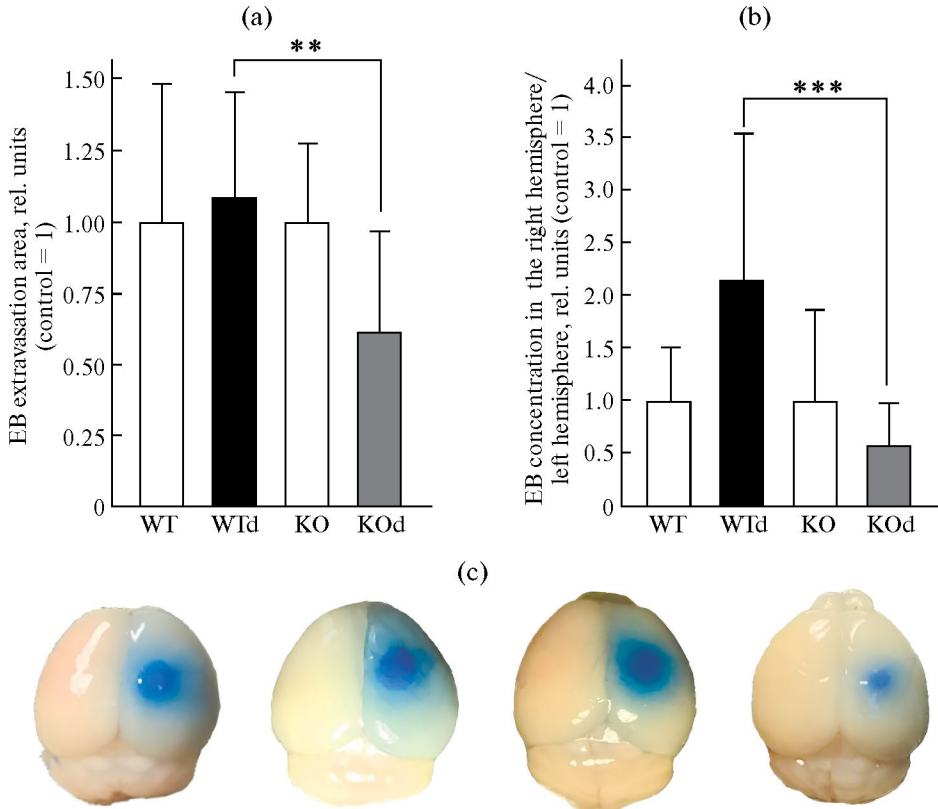
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапия сочетанных патологий сопряжена с многочисленными трудностями, часто связанными со сложной системой взаимодействия повреждающих факторов различной природы и механизмов их патогенеза. Больных СД относят к группе риска возникновения инфарктов и инсультов, занимающих лидирующую позицию в списке причин смертности населения планеты, что, безусловно, требует пристального внимания со стороны исследователей и клиницистов. В представленной работе предпринята попытка выявить вовлечение белка паннексина 1 в ишемическое повреждение мозга на фоне СД у мышей. Ранее



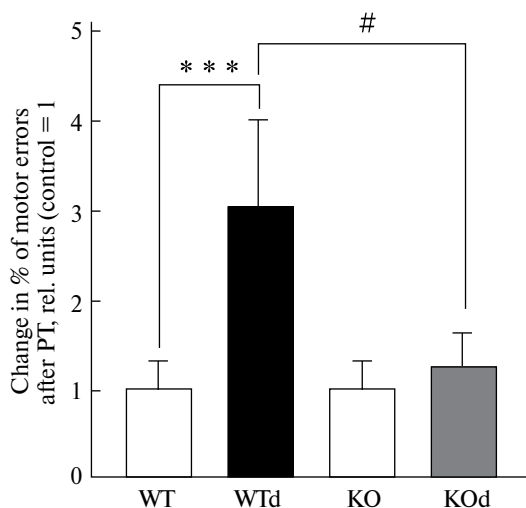
**Рис. 3.** Вызванное фотоиндуцированной ишемией повреждение мозга у мышей дикого типа и с нокаутом гена *Panx1* на фоне диабета. (a) – объем ишемического очага поражения после фототромбоза у мышей дикого типа и с нокаутом гена *Panx1* на фоне диабета (данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1)), (b) – наглядные T2-взвешенные МРТ-изображения повреждения мозга у исследуемых групп животных. WT  $n = 11$ , WTd  $n = 7$ , KO  $n = 21$ , KOd  $n = 13$ . Различия достоверны: \*\* –  $p < 0.01$ .



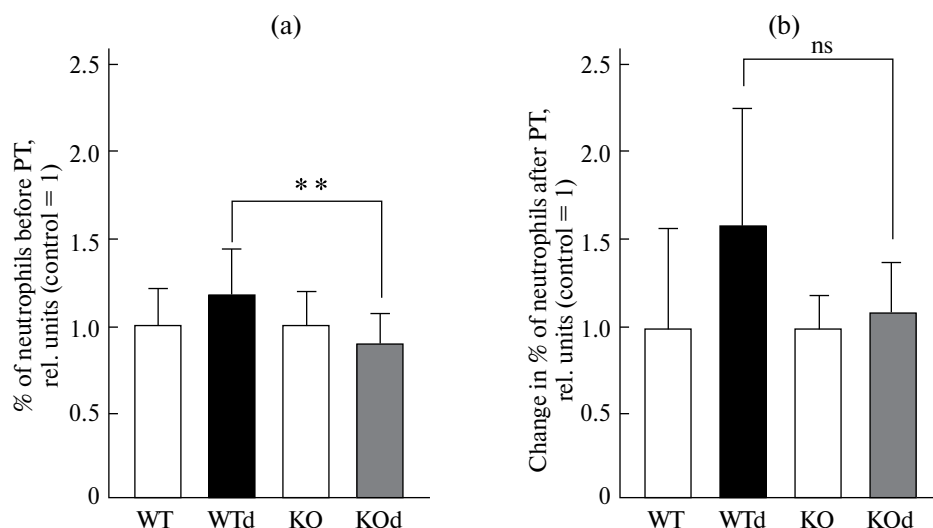


**Рис. 4.** Оценка экстравазации красителя Эванса синего (ЭС) и проницаемости ГЭБ после фотоиндуцированной ишемии у мышей дикого типа (WTd) и с нокаутом гена *Panx1* (KOd) на фоне диабета. (а) – сравнение экстравазации ЭС у изучаемых групп животных (WT  $n = 5$ , WTd  $n = 8$ , KO  $n = 16$ , KOd  $n = 14$ ), (б) – сравнение проницаемости ГЭБ у изучаемых групп животных (WT  $n = 9$ , WTd  $n = 4$ , KO  $n = 21$ , KOd  $n = 9$ ), (в) – наглядные фотографии головного мозга после фототромбоза, введения ЭС через сутки и перфузии на вторые сутки после ишемического повреждения у мышей. Данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1). Различия достоверны: \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

исследования роли паннексина 1 и сформированных им каналов для такого сочетания не проводились. Для моделирования диабета у мышей нами была выбрана стрептозотоциновая модель СД 2-го типа. Развитие диабета у мышей мы наблюдали на 10–12-й день введения стрептозотоцина, что согласуется с данными литературы [14]. Выбор проблемы стрептозотоцин-вызванного диабета у мышей, нокаутных по гену *Panx1*, был основан на том, что моделирование экспериментального диабета у таких животных ранее не было изучено. В настоящем исследовании показано, что характер нарастания уровня глюкозы в крови у животных дикого типа и с нокаутом гена *Panx1* в целом был сходным, однако первые значимые признаки гипергликемии были обнаружены у мышей, нокаутных по гену *Panx1*, на 8-й, а у мышей дикого типа – на 12-й день эксперимента. В литературе также нет однозначного указания на характер участия паннексина в регуляции метаболизма глюкозы. Например, было показано, что фармакологическая блокада *Panx1* и тканеспецифичный нокаут целевого гена ухудшали поглощение глюкозы адипоцитами в ответ на инсулин, а в экспериментах *in vivo* приводили к тяжелой инсулинорезистентности у мышей



**Рис. 5.** Сенсомоторный статус животных исследуемых групп, оцененный с помощью теста «Решетка». Изменение доли (в процентах) моторных ошибок на 100 шагов животного после ФТ по сравнению с показателями до ФТ у мышей дикого типа (WTd,  $n = 8$ ) и с нокаутом гена *Panx1* (KOd,  $n = 13$ ) на фоне диабета. WT  $n = 5$ , KO  $n = 16$ . Данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1). Различия достоверны: \*\*\* –  $p < 0.001$ ; # –  $p < 0.0001$ .



**Рис. 6.** Оценка уровня нейтрофилов у мышей дикого типа (WTd) и с нокаутом гена *Panx1* (KOd) на фоне диабета. (a) – сравнение доли нейтрофилов у экспериментальных групп с диабетом до фототромбоза (WT  $n = 5$ , WTd  $n = 9$ , KO  $n = 17$ , KOd  $n = 15$ ), (b) – изменение уровня нейтрофилов на последнем дне эксперимента по сравнению с первым днем (24 ч после фототромбоза на фоне диабета, WT  $n = 6$ , WTd  $n = 9$ , KO  $n = 16$ , KOd  $n = 13$ ). Данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1). Различия достоверны: \*\* –  $p < 0.01$ .

с ожирением [22]. Вместе с тем согласно другим данным, нокаут гена *Panx2* увеличивал тяжесть диабета за счет увеличения чувствительности  $\beta$ -клеток к сигналам апоптоза, в то время как *Panx1* не оказывал существенного влияния на выраженность диабета [23].

Наблюдаемое нами снижение массы тела у животных, которым вводили стрептозотозин, что является одним из симптомов диабета, также подтверждает развитие патологии у животных в выбранной нами модели стрептозотозин-вызванного диабета.

Индукция ишемии у животных исследуемых групп на фоне экспериментального диабета сопровождалась развитием очага поражения мозга у мышей дикого типа большего размера по сравнению с животными, не экспрессирующими ген белка паннексина 1. Снижение размера ФТ-индуцированного ишемического очага у мышей с нокаутом *Panx1* по сравнению с животными дикого типа свидетельствует о вовлечении данного белка в патогенез инсульта у мышей только на фоне диабета, поскольку при изолированной фотоиндуцированной ишемии у мышей дикого типа и с нокаутом *Panx1* отличий не было обнаружено. Основным известным на данный момент механизмом вовлечения каналов *Panx1* в индуцированные гипергликемией процессы в мозге является активация белков NLRP1, рецепторов к молекулярным фрагментам, ассоциированным с повреждениями (DAMPs), проникновение которых в клетку может быть опосредовано каналом *Panx1* [12]. У нокаутных животных, вероятно, данный повреждающий фактор был исключен, и на фоне 2-недельного диабета мы наблюдали уменьшение размера ишемического очага у животных в сравнении с мышами с полноценной экспрессией данного белка. Изучению особенностей влияния экспериментального диабета на выраженность ишемии посвящены единичные исследования. Так, стрептозотозин-вызванный диабет у мышей усугублял ишемический инсульт, повышая ферроптоз в клетках мозга, что было вызвано повышением экспрессии липокалина 2 (LCN2) в нейтрофилах, инфильтрация которых была повышена у животных с диабетом [24]. В указанной работе исследователи использовали для индукции ишемии модель окклюзии средней мозговой артерии, возможно, что отсутствие выраженного увеличения очага поражения у животных дикого типа на фоне диабета в настоящем исследовании связано с особенностями используемой нами модели фототромбоза.

Ранее нами и другими авторами продемонстрировано значимое повышение проницаемости ГЭБ при фототромбоз-вызванной ишемии [15], в настоящем исследовании мы оценили проницаемость ГЭБ через сутки после индукции ишемии у исследуемых групп мышей. Нокаут гена *Panx1* практически в 4 раза снижал повышение данного показателя у животных в условиях диабета, что согласуется с полученными нами данными по объему ишемического очага у этих групп мышей. Ранее нами показано, что блокада канала *Panx1* в культивируемых астроцитах крыс снижает тромбин- и липополисахарид-вызванную активацию клеток [25], что может свидетельствовать о возможной роли белка паннексина 1 в регуляции проницаемости ГЭБ, одним из компонентов которого выступают астроциты.

Логичным следствием протекторного действия нокаута *Panx1* в моделируемом нами на мышах сочетании ишемии и экспериментального диабета была стабилизация сенсомоторного статуса мышей в отсутствие белка *Panx1*. Безусловно, что снижение размера очага ишемического повреждения в области сенсомоторной коры и стабилизация барьерной функции ГЭБ приведут к снижению числа моторных ошибок в используемом нами тесте «Решетка», что мы и наблюдали у нокаутных по гену *Panx1* животных.

Известно, что не только диабет 2-го типа, но и диабет 1-го типа сопряжен с повышением провоспалительного статуса организма, на что указывает нарастание уровня провоспалительных цитокинов (TNF-альфа, IL-6), С-реактивного белка в крови таких пациентов, а также изменение хемотаксиса иммунокомпетентных клеток, например, нейтрофилов [26–28]. Повышенный уровень TNF- $\alpha$  наблюдался у крыс со стрептозотозин-вызванным диабетом, что указывает на повышение провоспалительного статуса [29].

В нашей работе группы с нокаутом гена *Panx1* демонстрировали значимо более низкий уровень нейтрофилов по сравнению с животными дикого типа, что согласуется с имею-

щимися данными о способности Panx1 опосредовать повышение подвижности нейтрофилов посредством секреции АТФ, который активирует пуринергические рецепторы на их мембране [29], вследствие чего у животных, не имеющих белка Panx1 в тканях, снижена способность рекрутировать лейкоциты к месту очага поражения. Тем не менее уровень нейтрофилов у животных дикого типа и с нокаутом гена Panx1 без диабета (контрольные группы) не различался, что еще раз свидетельствует о проявлении эффекта нокаута Panx1 именно на фоне диабет-вызванной перестройки физиологических процессов.

При этом изолированное действие диабета не вызывало значимого повышения уровня нейтрофилов по сравнению с данным показателем в контрольной группе, что подтверждает характеристику СД как медленно прогрессирующего воспалительного заболевания хронического характера. Это согласуется с данными о том, что число лейкоцитов у мышей было увеличено на 62–86% в модели СД2, вызванного с помощью 15 недель высокожировой диеты, однако в модели СД1 при остром подъеме уровня глюкозы, индуцированном D-маннугептулозой и глюкозой, изменений не наблюдалось [29]. Также интересно, что несмотря на повышение уровня лейкоцитов в кровотоке, у них была обнаружена сниженная фагоцитарная способность в отношении бактерий, и у животных наблюдали сниженный бактериальный клиренс на фоне инфекций [30]. Индукция ишемии на фоне диабета не приводила к значимому возрастанию доли нейтрофилов, при этом доля нейтрофилов у мышей с нокаутом Panx1 ниже показателей в группе дикого типа. Это также можно объяснить нарушением сигнального пути внеклеточного АТФ, в котором ключевую роль играют каналы Panx1, поэтому в отсутствие этого белка не происходило резкого увеличения секреции АТФ на фоне воспаления, и пуриновые рецепторы на поверхности нейтрофилов не были активированы.

Таким образом, результаты представленного исследования впервые демонстрируют вовлечение белка паннексина 1 в ишемическое повреждение мозга, вызванное сочетанным действием 2-недельного диабета и фототромбоза у мышей. Молекулярные механизмы обнаруженного протекторного действия нокаута белка Panx1 у мышей в условиях фотоиндуцированной ишемии на фоне экспериментального диабета еще предстоит исследовать. Однако полученные нами данные позволяют предположить, что эффективность терапии сочетанных с СД патологий может быть повышена включением в фармакологический комплекс препаратов блокаторов паннексиновых каналов как нового направления лечения таких тяжелых заболеваний.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л. Р. Г. и М. А. Н.), сбор данных (М. А. Н., М. В. Г., А. А. В.), обработка данных (М. А. Н., М. В. Г., Л. Р. Г.), написание и редактирование манускрипта (М. А. Н., Л. Р. Г., А. А. В.).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 24-75-00164). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 23/2021 от 13 декабря 2021 г.).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Campbell BCV, De Silva D, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA* (2019) Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 70.  
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
2. *Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee* (2021) *IDF DIABETES ATLAS* [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation.
3. *Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J* (2010) Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375: 2215–2222.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9)
4. *Bloomgarden Z, Chilton R* (2021) Diabetes and stroke: An important complication. *J Diabetes* 13(3): 184–190.  
<https://doi.org/10.1111/1753-0407.13142>
5. *Bennett MVL, Garré JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Sáez JC* (2012) Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487: 3–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.042>
6. *De Freitas PHM, da Silva Ferreira NC, Fioravante-Rezende JG, de Menezes Santos L, Luiz Alves A, Rozental R* (2019) Dispelling myths about connexins, pannexins and P2X7 in hypoxic-ischemic central nervous system. *Neurosci Lett* 695: 76–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.044>
7. *Bargiotas P, Antje K, Hormuzdi SG, Ridder DA, Herb A, Barakat W, Penuela S, von Engelhardt J, Monyer H, Schwaninger M* (2011) Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): 20772–20777.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1018262108>
8. *Cisneros-Mejorado A, Gottlieb M, Cavaliere F, Magnus T, Koch-Nolte F, Scemes E, Pérez-Samartín A, Matute C* (2015) Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates postischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 35(5): 843–850.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.262>
9. *Xiong X-X, Gu L-J, Shen J, Kang X-H, Zheng Y-Y, Yue S-B, Zhu S-M* (2014) Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting HMGB1 release and attenuating AQP4 expression in mice. *Neurochem Res* 39(1): 216–224.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-013-1212-z>
10. *Freitas-Andrade M, Bechberger JF, MacVicar BA, Viau V, Naus CC* (2017) Pannexin1 knockout and blockade reduces ischemic stroke injury in female, but not in male mice. *Oncotarget* 8(23): 36973–36983.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16937>
11. *Labat-gest V, Tomasi S* (2013) Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. *J Vis Exp* (76): 50370.  
<https://doi.org/10.3791/50370>
12. *Meng XF, Wang XL, Tian XJ, Yang ZH, Chu GP, Zhang J, Li M, Shi J, Zhang C* (2014) Nod-like receptor protein 1 inflammasome mediates neuron injury under high glucose. *Mol Neurobiol* 49(2): 673–684.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-013-8551-2>
13. *Battulin N, Kovalzon VM, Korablev A, Serova I, Kiryukhina OO, Pechkova MG, Bogotskoy KA, Tarasova OS, Panchin Y* (2021) Pannexin 1 Transgenic Mice: Human Diseases and Sleep-Wake Function Revision. *Int J Mol Sci* 22(10): 5269.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22105269>
14. *Furman BL* (2021) Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* 1(4): e78.  
<https://doi.org/10.1002/cpz1.78>
15. *Galkov M, Gulyaev M, Kiseleva E, Andreev-Andrievskiy A, Gorbacheva L* (2020) Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: Characteristics and new aspects of their application. *J Neurosci Methods* 329: 108457.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108457>
16. *Franklin KBJ, Paxinos G* (2001) *Mouse brain in stereotaxic coordinates*. London. Acad Press.
17. *Wu J, Cai Y, Wu X, Ying Y, Tai Y, He M* (2021) Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation. *Bio Protoc* 11(5): e3988.  
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3988>

18. Kim GW, Lewén A, Copin J, Watson BD, Chan PH (2001) The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience* 105(4): 1007–1018. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00237-8)
19. Baskin YK, Dietrich WD, Green EJ (2003) Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Methods* 129: 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(03\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00212-7)
20. Santos E, Cunha de Oliveira D, Hastreiter A, Silva G, Beltran J, Tsujita M, Crisma A, Neves S, Fock R, Borelli P (2016) Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz J Veter Res Animal Sci* 53: 138. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>
21. Knezic A, Broughton BRS, Widdop RE, McCarthy CA (2022) Optimising the photothrombotic model of stroke in the C57Bl/6 and FVB/N strains of mouse. *Sci Rep* 12(1): 7598. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11793-6>
22. Adamson SE, Meher AK, Chiu YH, Sandilos JK, Oberholtzer NP, Walker NN, Hargett SR, Seaman SA, Peirce-Cottler SM, Isakson BE, McNamara CA, Keller SR, Harris TE, Bayliss DA, Leitinger N (2015) Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Mol Metab* 4(9): 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.06.009>
23. Berchtold LA, Miani M, Diep TA, Madsen AN, Cigliola V, Colli M, Krivokapic JM, Pociot F, Eizirik DL, Meda P, Holst B, Billestrup N, Størling J (2017) Pannexin-2-deficiency sensitizes pancreatic  $\beta$ -cells to cytokine-induced apoptosis *in vitro* and impairs glucose tolerance *in vivo*. *Mol Cell Endocrinol*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.001>
24. Wang H, Wang Z, Gao Y, Wang J, Yuan Y, Zhang C, Zhang X (2024) STZ-induced diabetes exacerbates neurons ferroptosis after ischemic stroke by upregulating LCN2 in neutrophils. *Exp Neurol* 377: 114797. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114797>
25. Babkina II, Mazeeva VV, Morozova MP, Gorbacheva LR (2024) Effect of probenecid on astrocyte activation *in vitro*. *Bulletin of RSMU* 1: 40–48. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2024.00526>
26. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K (2007) Relationship between serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in diabetes mellitus type 1 children. *Centr Eur J Immunol* 32 (3): 124–128.
27. Vinolo MA, Ferguson GJ, Kulkarni S, Damoulakis G, Anderson K, Bohlooly YM (2011) SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One* 6: e21205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021205>
28. Sina C, Gavrilova O, Förster M, Till A, Derer S, Hildebrand F (2009) G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol* 183: 7514–7522. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900063>
29. Dallak M, Al-Ani B, Abdel Kader DH, Eid RA, Haidara MA (2019) Insulin Suppresses Type 1 Diabetes Mellitus-Induced Ventricular Cardiomyocyte Damage Associated with the Inhibition of Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Rats. *Pharmacology* 104(3–4): 157–165. <https://doi.org/10.1159/000500898>
30. Adamson SE, Leitinger N (2014) The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett* 588(8): 1416–1422. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.009>
31. Pettersson US, Christoffersson G, Massena S, Ahl D, Jansson L, Henriksnäs J, Phillipson M (2011) Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *6(7): e22480*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022480>

---

**Brain Damage in Photoinduced Ischemia under Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice with Pannexin 1 Protein Gene Knockout****M. A. Nikolaenko<sup>1</sup>, M. V. Gulyaev<sup>1</sup>, A. A. Volkova<sup>1,2</sup>, and L. R. Gorbacheva<sup>1,2,\*</sup>**<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*<sup>2</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia**\*e-mail: gorbi67@mail.ru*

Diabetes mellitus (DM), along with ischemia, is one of the top ten causes of death in the global population, according to the latest World Health Organization (WHO) data. Clinical research data have revealed a high risk of stroke and heart attacks in patients with diabetes. However, there is still a lack of understanding of the involvement of pannexin 1 (Pnx1) protein in cerebral ischemia combined with DM. In the presented study, we used the Pnx1 gene knockout mice in models of streptozotocin-induced diabetes and photoinduced ischemia to investigate the effect of the Pnx1 on the severity of ischemic brain damage and systemic inflammation in mice with a combination of cerebral ischemia and diabetes. It has been found that under conditions of experimental diabetes, the knockout of the Pnx1 gene significantly reduces the size of the ischemic lesion, stabilizes the ischemia-induced increase in the blood-brain barrier permeability, reduces the number of errors in the sensorimotor test and the level of neutrophils in the blood. It is important to note that the Pnx1 knockout exhibits a protective effect only in the presence of diabetes mellitus, without significantly affecting the severity of ischemic brain injury in mice without streptozotocin-induced diabetes. Pnx1 knockout also did not affect the severity of hyperglycemia in animals in this diabetes model. It can be assumed that the efficacy of the treatment for pathologies combined with diabetes mellitus can be enhanced by incorporating pannexin channel blockers into the complex therapy, representing a novel approach to addressing these serious conditions.

*Keywords:* diabetes, ischemia, pannexin 1, photothrombosis, knockout, inflammation