

**М. В. Шмидт**<sup>1,2</sup>✉, **А. В. Смирнов**<sup>1,2</sup>, **И. Н. Тюренков**<sup>1</sup>,  
**Ю. И. Великородная**<sup>1,2</sup>, **Д. А. Бакулин**<sup>1</sup>, **Л. С. Быхалов**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

<sup>2</sup> Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

✉ schmidtmv80@gmail.com

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА КЛОТО В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ПЕРВОГО ТИПА

**Аннотация. Цель исследования.** Анализ взаимосвязей между характером и степенью патоморфологических изменений и экспрессией белка Клото в различных отделах головного мозга при экспериментальном воспроизведении стрептозотоцининдуцированного сахарного диабета.

Моделирование стрептозотоцининдуцированного СД длительностью 6 месяцев проводилось на 30 белых беспородных лабораторных крысах-самках в возрасте 12 месяцев. Достоверное снижение иммуногистохимической экспрессии БК в нейронах и эпендиоцитах головного мозга, даже при отсутствии заметных патоморфологических изменений, позволяет рассматривать БК как многообещающий маркер ранних церебральных осложнений сахарного диабета, а его дефицит играет, по-видимому, существенную роль в развитии диабетической энцефалопатии.

**Ключевые слова:** белок Клото, сахарный диабет, диабетическая энцефалопатия

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 24-25-00247

**M. V. Shmidt**<sup>1,2</sup>✉, **A. V. Smirnov**<sup>1,2</sup>, **I. N. Ttyurenkov**<sup>1</sup>,  
**Yu. I. Velikorodnaya**<sup>1,2</sup>, **D. A. Bakulin**<sup>1</sup>, **L. S. Bykhalov**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

<sup>2</sup> Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia

✉ schmidtmv80@gmail.com

## FEATURES OF KLOTRO PROTEIN EXPRESSION IN THE RAT BRAIN IN EXPERIMENTAL MODELING OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

**Abstract. Purpose of the study.** Analysis of the correlation between the nature and degree of pathomorphological changes and Klotho protein expression in various parts of the brain during experimental reproduction of streptozotocin-induced diabetes mellitus.

An experimental study was carried out on 30 white outbred laboratory female rats at the age of 12 months. Modeling streptozotocin-induced DM lasting 6 months. A significant decrease in the immunohistochemical expression of Klotho protein in neurons and ependymocytes of the brain, even in the absence of noticeable morphological changes, allows us to consider Klotho protein as marker of early cerebral complications of diabetes mellitus, and its deficiency plays a significant role in the development of diabetic encephalopathy.

**Keywords:** Klotho protein, diabetes mellitus, diabetic encephalopathy

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the RSF grant No. 24-25-00247

На сегодняшний день сахарный диабет (СД) считается эпидемическим заболеванием и одной из ведущих причин смертности во многих странах мира. СД отрицательно влияет на качество и

продолжительность жизни больных из-за большого количества осложнений [1]. В связи с ростом смертности и заболеваемости диабетом и его негативным влиянием практически на все органы

и ткани существует потребность в поиске биомаркеров ранней диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза данного заболевания.

Белок Клото (БК), обнаруженный в результате исследований механизмов старения, был верифицирован как антивозрастной белок и назван в честь богини Клото, которая пряла нить жизни согласно греческой мифологии [1]. БК является важным ко-рецептором для фактора роста фибробластов, может подавлять окислительный стресс и регулировать ионные каналы и транспортеры [2]. Исследователи выделяют три относительно независимых пула БК: мозговой – вырабатываемый клетками различных отделов головного мозга; цереброспинальный – продуцируемый сосудистыми сплетениями и сывороточный – синтезируемый почками [3, 4].

Показано, что мыши, несущие дефектный ген БК, начинают быстро стареть, у них отмечаются атрофия кожи, остеопороз, атеросклероз, эмфизема и когнитивные нарушения [3, 5]. Уровни белка Клото в головном мозге и СМЖ человека также уменьшается с возрастом и при болезни Альцгеймера [6, 7]. Повышение экспрессии гена БК у трансгенных мышей, наоборот, увеличивает продолжительность их жизни, улучшает память и способность к обучению [3].

При СД БК защищает клетки от ускоренного старения и разрушения, вызванных окислительным стрессом, воспалением, нарушениями фосфатного и кальциевого обмена. Значительное снижение продукции БК выявлялось как у диабетиков, так и животных с экспериментальным сахарным диабетом. Подчеркивается, что такое снижение уровня БК существенно влияет на процессы формирования диабетической нефропатии, ишемической болезни сердца и цереброваскулярной патологии [1].

По литературным данным существует связь между обменом БК, гомеостазом глюкозы и секрецией инсулина. БК может снижать степень вазо- и нейропатических осложнений при возникновении сахарного диабета [1]. В связи с этим представляется чрезвычайно важной информация о взаимосвязи между характером и распределением БК в структурных образованиях головного мозга и степенью нейродегенеративных изменений при церебральных осложнениях СД.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение взаимосвязей между характером и степенью экспрессии белка Клото в со-

судистых сплетениях и различных структурах головного мозга с выраженностью патоморфологических изменений при экспериментальном воспроизведении сахарного диабета 1-го типа.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование проведено на 30 белых беспородных лабораторных крысах-самках в возрасте 12 месяцев.

Моделирование стрептозотоцинуцированного СД длительностью 6 месяцев проводили по ранее описанной методике [8]. В качестве позитивного контроля использовали крыс без СД (интактных) той же партии животных. Забор тканей головного мозга проводили у наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно) животных. Материал фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали тионином по методу Ниссля.

Белок Клото (БК) выявляли с помощью иммуногистохимического исследования с использованием первичных антител к белку Клото в соответствии с инструкциями производителя (разведение 1 : 100) (Cloud-Clone Corp., КНР) и визуализирующей полимерной системы детекции с DAB (Elabsciences, КНР).

Для визуальной оценки интенсивности окраски срезы докрашивали гематоксилином. Интенсивность экспрессии на срезах оценивали с помощью программы анализа изображений ImageJ 1.54d. Определяли относительную площадь, занимаемую иммунопозитивным материалом в поле зрения микроскопа. Фотодокументирование осуществляли цифровой фотокамерой Olympus (Япония).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA).

Различия между группами оценивали по критерию Манна – Уитни (Mann – Whitney, U-test) и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами ранее микроскопическое исследование структур головного мозга экспериментальных животных на данной модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета продемонстрировало наличие умеренных нейродегенеративных изменений в полях гиппокампа (CA1, CA3).

В то же время в структурах неокортекса дистрофические изменения носили более интенсивный характер, с наибольшим количеством поврежденных нейронов в моторных и соматосенсорных отделах церебральной коры [9].

В группе интактных животных наиболее выраженная иммуногистохимическая экспрессия БК фиксировалась в структурах лимбической системы, различных функциональных отделах неокортекса, а также сосудистых сплетениях головного мозга. БК выявлялся преимущественно в плазмолемме и цитоплазме нейронов и в меньшей степени нейроглии.

Незначительное количество БК обнаруживалось также в нейропиле и белом веществе. В СА1 и СА3 гиппокампа иммунопозитивное окрашивание носило относительно мономорфный характер, в то время как в церебральной коре наблюдалось неравномерное распределение иммунопозитивного материала: преобладали клетки с умеренной экспрессией белка в цитоплазме с наличием отдельных интенсивно окрашенных клеток. Цитоплазматическая экспрессия носила

неоднородный, зернистый вид. Характерной чертой являлось формирование более крупных, интенсивно окрашенных гранул преимущественно в перинуклеарной области.

В группе животных с экспериментальным стрептозотоцинининдуцированным сахарным диабетом иммуногистохимическое исследование продемонстрировало достоверное снижение относительной площади БК во всех исследуемых структурах головного мозга (см. табл.). При этом даже в областях с отсутствием каких-либо значимых нейродегенеративных изменений (СА1 поле гиппокампа), или наличием слабых признаков повреждения (СА3 поле гиппокампа), фиксировалось заметное уменьшение концентрации БК с преобладанием слабо позитивных и БК-негативных нейронов.

В различных функциональных отделах неокортекса также снижалась экспрессия БК в сохраненных нейронах, а в поврежденных клетках наблюдалось либо слабое, как правило, гомогенное иммунопозитивное окрашивание перикариона, либо его полное отсутствие (рис. 1).

**Относительная площадь экспрессии белка Клото в различных функциональных отделах головного мозга при моделировании СД ( $M \pm m \%$ )**

Структуры головного мозга	Интакт	СД
СА1 поле гиппокампа	0,91 ± 0,11	0,41 ± 0,03*
СА3 поле гиппокампа	1,50 ± 0,14	0,63 ± 0,04*
Моторная кора	0,90 ± 0,08	0,55 ± 0,08*
Соматосенсорная кора	1,15 ± 0,12	0,47 ± 0,02*
Аудиторная кора	1,03 ± 0,06	0,43 ± 0,05*

\* Показатели статистически значимо отличаются от группы интакт при  $p < 0,05$ ; Критерий Манна – Уитни.

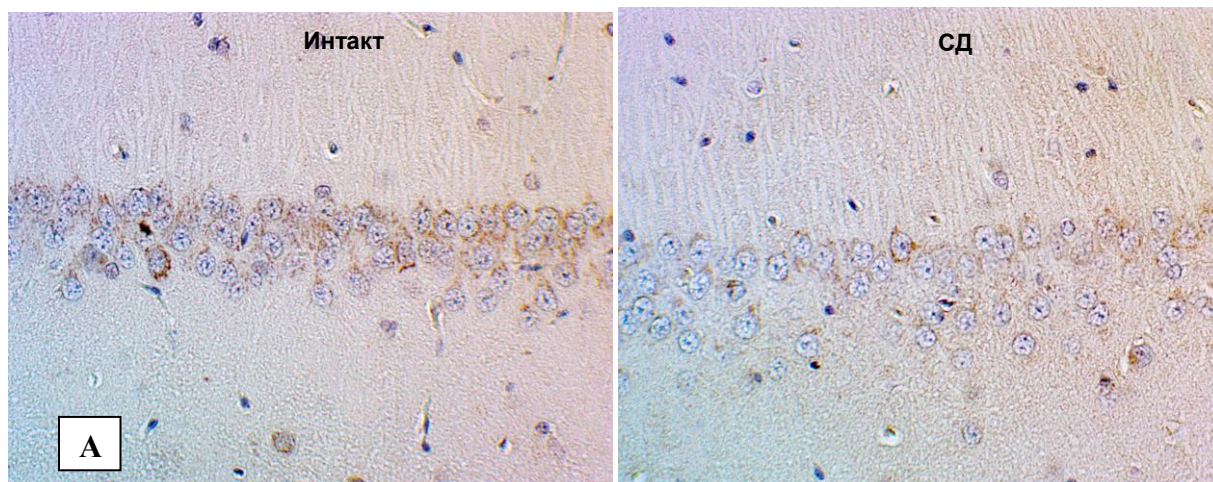
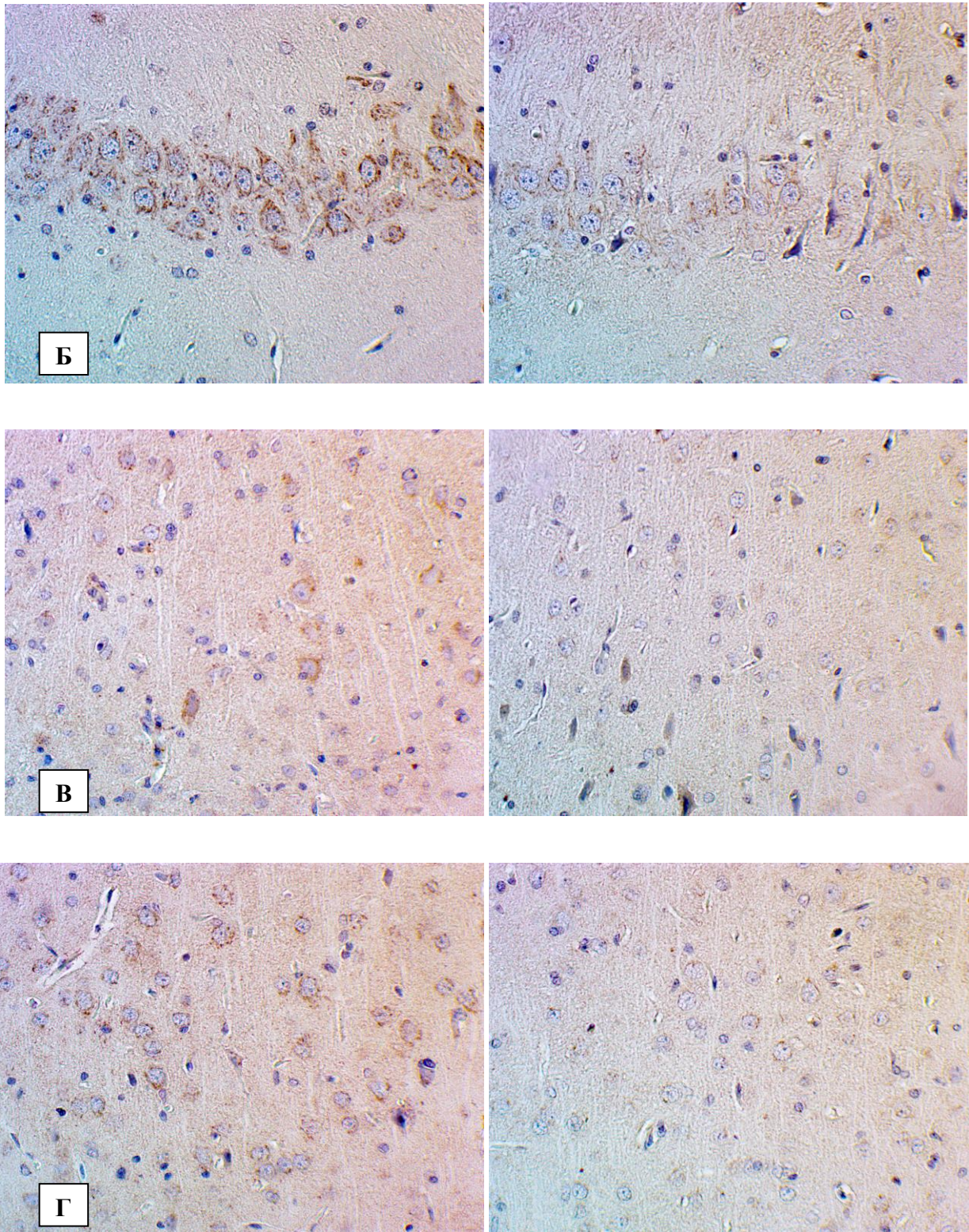


Рис. 1. Снижение экспрессии БК в структурах головного мозга при экспериментальной диабетической энцефалопатии: А – СА1 поле гиппокампа;





*Рис. 1. Снижение экспрессии БК в структурах головного мозга при экспериментальной диабетической энцефалопатии:  
Б – СА3 поле гиппокампа; В – моторная кора; Г – соматосенсорная кора. Иммуногистохимическое исследование, антитела против БК, докраска гематоксилином. Увеличение  $\times 400$*

В хориоидальных сплетениях интактных животных БК визуализировался преимущественно в клетках эпандимы, в виде иммунопозитивных

цитоплазматических гранул. В группе животных с экспериментальным СД 1-го типа отмечалось умеренное уменьшение интенсивности окраши-



вания (рис. 2). Преобладали эндимиоциты со слабой и средней экспрессией БК, и лишь в единичных клетках отмечалось выраженное окрашивание цитоплазмы. По результатам морфометрического исследования относительная площадь

иммунопозитивного материала в сосудистых сплетениях головного мозга составила ( $14,08 \pm 1,15$ ) % в группе интактных животных и ( $8,26 \pm 1,19$ ) % при моделировании стрептозотоциндуцированного сахарного диабета ( $p = 0,028$ ).

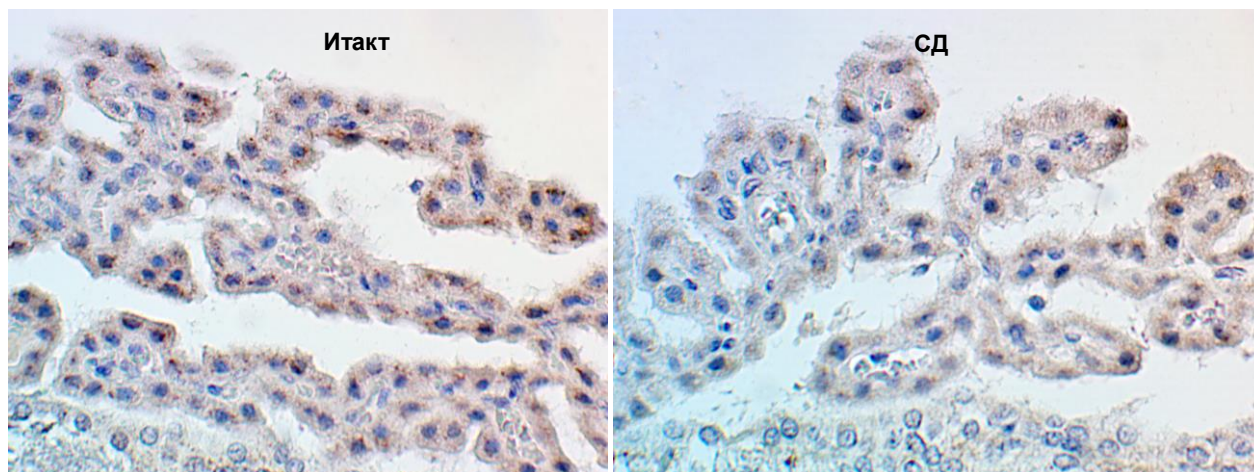


Рис. 2. Умеренное снижение экспрессии БК в эндиминальных клетках сосудистых сплетений головного мозга при экспериментальной диабетической энцефалопатии. Иммуногистохимическое исследование, антитела против БК, докраска гематоксилином. Увеличение  $\times 400$

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о корреляции уровня экспрессии БК со степенью патоморфологических изменений в структурах головного мозга крыс при экспериментальном моделировании СД 1-го типа. По результатам иммуногистохимического исследования можно сделать вывод, что данная модель СД сопровождается значимым снижением экспрессии БК как в веществе головного мозга, так и сосудистых сплетениях, и, возможно, в цереброспинальной жидкости. Достоверное снижение иммуногистохимической экспрессии БК в структурах головного мозга, даже в отсутствие выраженных патоморфологических изменений, демонстрирует тот факт, что БК является маркером ранних церебральных осложнений сахарного диабета.

По данным литературы, БК обеспечивает регуляцию абсорбции глюкозы, улучшает чувствительность к инсулину, снижает окислительный стресс и подавляет воспаление, что значительно снижает тяжесть проявлений СД [1], поскольку нейровоспаление рассматривается как важнейший патогенетический механизм повреждения функций нейронов при диабетической энцефалопатии [10]. Следовательно, наблюдаемый в нашем эксперименте дефицит нейрональной и эндиминальной фракций БК играет, по-видимому, существенную роль в развитии диабетической энцефалопатии. С другой стороны, усиление экс-

прессии белка, особенно на ранней стадии заболевания, будет способствовать профилактике церебральных осложнений СД, а также замедлению или прекращению их прогрессирования.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Haina Zhang, Lou Yu, Gai Yun. Reduced Serum Levels of Klotho are Associated with Mild Cognitive Impairment in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2023;16:129–137.
2. Sarah M. Clinton, Matthew E. et al. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Res*. 2013;1527:1–14. doi: 10.1016/j.brainres.2013.06.044.
3. Прохорова Т. А., Бокина И. С., Савушкина О. К. и др. Белок  $\alpha$ -клото при нейродегенеративных и психических заболеваниях. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2019;1:80–88.
4. Shun-Ai Li, Masami Watanabe, Hiroshi Yamada et al. Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. *Cell structure and function*. 2004;29:91–99.
5. Kenneth Lim, Arnoud Groen, Guerman Molostvov et al. Klotho expression in human tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 100(10):E1308–1318. doi: 10.1210/jc.2015-1800.
6. Li D., Jing D., Liu Z. et al. Enhanced Expression of Secreted – Klotho in the Hippocampus Alters Nesting Behavior and Memory Formation in Mice. *Front*.

- Cell. Neurosci.* 2019;13:133. doi: 10.3389/fncel.2019.00133.
7. Zhou H.-J., Li H., Shi M.-Q. et al. Effect of Klotho against Ischemic Brain Injury Is Associated with Inhibition of RIG-I/NF- $\kappa$ B Signaling. *Front. Pharmacol.* 2017;8:950. doi: 10.3389/fphar.2017.00950.
  8. Тюренокв И. Н., Смирнов А. В., Бакулин Д. А. и др. Морфологические особенности миокарда при экспериментальном СД и его фар-макологической коррекции мексаргином. *Волгоградский научно-медицинский журнал.* 2022; 4:25–29.
  9. Шмидт М. В., Смирнов А. В., Тюренокв И. Н. и др. Особенности экспрессии BDNF в головном мозге крыс при экспериментальном моделировании сахарного диабета 1 типа. *Волгоградский научно-медицинский журнал.* 2023;3:58–63.
  10. Смирнов А. В., Бисинбекова А. И., Бакулин Д. А. и др. Морфофункциональные изменения первичной соматосенсорной коры головного мозга при экспериментальном сахарном диабете 1-го типа. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* 2024;21(1):146–152.

## REFERENCES

1. Haina Zhang, Lou Yu, Gai Yun. Reduced Serum Levels of Klotho are Associated with Mild Cognitive Impairment in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity.* 2023;16:129–137.
2. Sarah M. Clinton, Matthew E. et al. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Res.* 2013;1527:1–14.
3. Prohorova T. A., Boksha I. S., Savushkina O. K. et al. Klotho protein in neurodegenerative and mental diseases. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry.* 2019;1:80–88. (In Russ.).
4. Shun-Ai Li, Masami Watanabe, Hiroshi Yamada et al. Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. *Cell structure and function.* 2004;29:91–99.
5. Kenneth Lim, Arnoud Groen, Guerman Molostvov et al. Klotho expression in human tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2015; 100(10):E1308-18. doi: 10.1210/jc.2015-1800.
6. Li D., Jing D., Liu Z. et al. Enhanced Expression of Secreted – Klotho in the Hippocampus Alters Nesting Behavior and Memory Formation in Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 2019;13:133.
7. Zhou H.-J., Li H., Shi M.-Q. et al. Effect of Klotho against Ischemic Brain Injury Is Associated with Inhibition of RIG-I/NF- $\kappa$ B Signaling. *Front. Pharmacol.* 2017;8:950.
8. Tyurenkov I. N., Smirnov A. V., Bakulin D. A. et al. Morphological features of the myocardium in experimental diabetes mellitus and its pharmacological correction with mefargin. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Volgograd Medical Scientific Journal.* 2022;4:25–29. (In Russ.).
9. Shmidt M. V., Smirnov A. V., Tyurenkov I. N. et al. Features of BDNF expression in the rat brain in experimental modeling of type 1 diabetes mellitus. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Volgograd Medical Scientific Journal.* 2023;3:58–63. (In Russ.).
10. Smirnov A. V., Bisinbekova A. I., Bakulin D. A. et al. Morphofunctional changes in the primary somatosensory cortex in experimental diabetes mellitus type 1. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Volgograd State Medical University.* 2024;21(1):146–152. (In Russ.).

## Информация об авторах

**Максим Вячеславович Шмидт** – кандидат медицинских наук, доцент, [schmidtmv80@gmail.com](mailto:schmidtmv80@gmail.com)

**Алексей Владимирович Смирнов** – доктор медицинских наук, профессор, [alexeysmirnov.volggmu@gmail.ru](mailto:alexeysmirnov.volggmu@gmail.ru)

**Иван Николаевич Тюренокв** – чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, [fibfuv@mail.ru](mailto:fibfuv@mail.ru)

**Юлия Ивановна Великородная** – научный сотрудник, [alta-u@mail.ru](mailto:alta-u@mail.ru)

**Дмитрий Александрович Бакулин** – кандидат медицинских наук, доцент, [fibfuv@mail.ru](mailto:fibfuv@mail.ru)

**Леонид Сергеевич Быхалов** – доктор медицинских наук, профессор, [leonby-vgd@yandex.ru](mailto:leonby-vgd@yandex.ru)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 14.05.2024; одобрена после рецензирования 14.06.2024; принята к публикации 20.06.2024.

## Information about authors

**Maksim V. Shmidt** – candidate of Medical Sciences, Associate Professor, [schmidtmv80@gmail.com](mailto:schmidtmv80@gmail.com)

**Alexey V. Smirnov** – Doctor of Medical Sciences, Professor, [alexeysmirnov.volggmu@gmail.com](mailto:alexeysmirnov.volggmu@gmail.com)

**Ivan N. Tyurenkov** – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, [fibfuv@mail.ru](mailto:fibfuv@mail.ru)

**Yulia I. Velikorodnaya** – researcher, [alta-u@mail.ru](mailto:alta-u@mail.ru)

**Dmitry A. Bakulin** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, [fibfuv@mail.ru](mailto:fibfuv@mail.ru)

**Leonid Sergeevich Bykhalov** – Doctor of Medical Sciences, Professor, [leonby-vgd@yandex.ru](mailto:leonby-vgd@yandex.ru)

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted 14.05.2024; approved after reviewing 14.06.2024; accepted for publication 20.06.2024.