

# Вплив низько- та високожирової дієти на структуру гіпокампа у нокаутних мишей ApoE-/-

Т. М. Коваленко<sup>1</sup>, І. О. Осадченко<sup>1</sup>, Д. Р. Шепілов<sup>1</sup>, К. Г. Сможаник<sup>1</sup>,  
Д. В. Муравйова<sup>2</sup>, Г. О. Ушакова<sup>2</sup>, Н. Марунгруанг<sup>3</sup>, О. Приходько<sup>3</sup>, Ф. Холеніус<sup>3</sup>,  
Г. Г. Скибо<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара;

<sup>3</sup>Лундський університет, Швеція;

e-mail: tnkovalenko@ukr.net, skibo@biph.kiev.ua

*Проведено морфологічні та біохімічні дослідження зони СА1 гіпокампа в аполіпопротеїн Е (ApoE)-дефіцитних мишей за умов споживання дієт (8 тиж) із низьким (НЖ) та високим (ВЖ) вмістом жирів. Використовували методи імуногістохімії, світлової та електронної мікроскопії, імуноферментного аналізу, а також морфометричної та статистичної обробки. Встановлено, що морфофункціональний стан нервових клітин гіпокампа ApoE-/- мишей значною мірою залежить від жирового вмісту дієти. У тварин на НЖ-раціоні спостерігався вищий ступінь нейрозапалення, ніж у контрольних та мишей, які споживали ВЖ-дієту, що проявлявся у розвитку реактивного астро- та мікрогліозу. Кількість неушкоджених пірамідних нейронів в зоні СА1 гіпокампа ApoE-/- мишей на НЖ-дієті достовірно зменшувалася порівняно з контролем і за умов ВЖ-дієти. У тварин на НЖ- і ВЖ-раціоні знижувалися щільність синаптичних терміналей, кількість мітохондрій у них, а також концентрації молекул клітинної адгезії. Можна припустити, що для процесів синаптогенезу та синаптичної пластичності критичним виявився не стільки жировий вміст дієти, скільки дефіцит ApoE. Ключові слова: ApoE-нокаутні миші, структура гіпокампа, низько- та високожирова дієти.*

## ВСТУП

Порушення ліпідного обміну в організмі є причиною низки патологічних станів, зокрема хронічного системного запалення, інсулінорезистентності, ожиріння, атеросклеротичного ураження судин, що в сукупності формують метаболічний синдром [1]. В свою чергу, це може спричинити деякі нейродегенеративні зміни, які здатні викликати когнітивні розлади та бути факторами ризику хвороб Альцгеймера і Паркінсона [2].

Аполіпопротеїн Е (ApoE) - це білок, який зв'язує і транспортує холестерин в організмі (особливо в ЦНС та печінці). Він є компонентом ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ). У головному мозку ApoE синтезується переважно астроцитами та меншою мірою мікроглією і нейронами.

Він відіграє вирішальну роль у підтриманні нервових функцій, діючи як трофічний фактор, а також як медіатор імунної відповіді під час процесів нейрогенезу й у відповідь на мозкове ушкодження. Крім того, ApoE бере участь у видаленні клітинних рештків, а також стимуляції регенерації нейронів [3,4]. Завдяки своїй ролі у підтриманні цілісності гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) та активації низки рецепторопосередкованих сигнальних шляхів, він здатен захищати нейрони від дегенеративних змін, зумовлених старінням або зловживанням їжі з високим вмістом жиру [5].

Дослідження фенотипових проявів дефіциту ApoE здійснюється на нокаутній мишиній моделі B6.129P2-Apoetm1Unc (ApoE-/-), гомозиготній за делецією гена

© Т.М. Коваленко, І.О. Осадченко, Д.Р. Шепілов, К.Г. Сможаник, Д.В. Муравйова, Г.О. Ушакова, Н. Марунгруанг, О. Приходько, Ф. Холеніус, Г. Г. Скибо

ApoE. Такі тварини є життєздатними і цілком здоровими, за винятком того, що з віком у них розвиваються гіперхолестеринемія та атеросклеротичні ураження внаслідок порушення кліренсу ліпопротеїнів. Якщо ApoE-/- мишей годувати дієтою з високим вмістом жирів, вміст холестерину в крові у них підвищується в 5-10 разів порівняно з тваринами дикого типу [2, 6].

Дефіцит ендогенної експресії ApoE призводить до дисбалансу холестеринового навантаження в макрофагах. Це стимулює секрецію цитокінів і протеаз, що викликає розвиток запалення та деградацію позаклітинного матриксу [7]. Lane-Donovan та співавт. [8] виявили зміни у регуляції циклофіліну А в лімфоцитах ApoE-/- мишей, що призводило до збільшення активності матричної металопротеїнази 9 та пошкодження ГЕБ. Порушення цілісності останнього здатне спричинити проникнення нейротоксичних агентів із крові у мозок, включаючи прозапальні цитокіни. Крім того, було показано, що високожирова дієта індукувала у ApoE-нокаутних мишей порушення антиоксидантного метаболізму, втрату синапсів у холін-, норадрен- і серотонінергічних проекціях, зміну вмісту нейромедіаторів, щільності дофамінових рецепторів, що проявлялося у зниженні пам'яті та навчання.

Однією із структур головного мозку, яка залучена до реалізації когнітивних функцій, є гіпокамп. Він бере участь у процесах навчання та консолідації пам'яті і є високо чутливим до дії різних пошкоджуючих факторів [8, 9]. Тому метою нашої роботи було оцінити морфологічні та біохімічні зміни нейронів і гліальних клітин в зоні CA1 гіпокампа ApoE-дефіцитних мишей за умов споживання дієт із низьким та високим вмістом жирів.

## МЕТОДИКА

*Дослідні тварини.* Експеримент проводили на базі Наукового центру здорового харчування

(Лундський університет, Швеція), морфологічні та біохімічні дослідження - в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України і Дніпровському національному університеті імені Олеся Гончара. Нами були використані самці мишей ліній C57BL/6 (n=10) та ApoE -/- (n=20) («Taconic Biosciences, Inc.», Данія) масою  $21,9 \pm 0,2$  г, яких у віці 7 тиж адаптували до середовища проведення експерименту протягом тижня (22°C, циклу 12 год світла/12 год темряви). Мишей віком 8 тиж було поділено на 3 групи по 10 особин у кожній: до I увійшли контрольні тварини лінії C57BL/6 (дикий тип), яких годували стандартною дієтою (RM1, «SDS», Данія), до II - миші, нокаутні за геном ApoE, які перебували на знежиреному раціоні харчування (12 % ккал) - низькожирова дієта (НЖ), до III групи - ApoE-/- миші з високожировою дієтою (ВЖ, 38 % ккал жирів).

Усі маніпуляції з тваринами були схвалені місцевим етичним комітетом (Лунд, Швеція; номер затвердження M114-15), а також здійснені відповідно до міжнародних принципів Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту і Ради про охорону тварин, які використовуються в наукових цілях.

*Підготовка матеріалу.* По закінченні 8 тиж годування мишей анестезували інгаляційно 2,5%-м ізофлураном («Abbott Scandinavia AB», Швеція) в киснево-повітряній суміші та фіксували транскардіальною перфузією 2%-м розчином параформальдегіду і 0,25%-м глютаральдегідом на 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,4). Після фіксації тварин декапітували, мозок обережно видаляли з черепної коробки, розділяли на дві гемісфери, одну з яких залишали дофіксуватися у тому самому фіксуючому розчині для імуногістохімії, а другу перекладали у фіксатор для електронної мікроскопії (4 % параформальдегіду та 2,5 % глютаральдегіду) при +4°C.

*Імуногістохімічне дослідження.* Зрізи гіпокампа, товщиною 50 мкм, отримували за допомогою вібротома Leica VT1000A

(«Leica Biosystems», Німеччина). Їх відмивали 0,1 М фосфатним буфером і поміщали у блокуючий розчин, що містив 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА, «Sigma-Aldrich», США) та 0,3% Тритон X-100 («Sigma-Aldrich», США). Для імунофлуоресцентного виявлення астроцитів застосовували поліклональні антитіла курей до специфічного астроцитарного маркера - гліального фібрилярного кислого білка (GFAP, 1:1500, «Abcam», Великобританія). Для ідентифікації клітин мікроглії використовували моноклональні антитіла кроля до маркерного білка Iba-1 (іонізована кальцій-зв'язуюча адапторна молекула 1, 1:500, «Wako», Японія). Інкубація з первинними антитілами тривала протягом 16 год при +4°C. Після відмивання зрізи інкубували із вторинними антикурячими антитілами, кон'югованими з барвником Alexa Fluor 647 (1:1000; «Invitrogen», США), антикролячими антитілами, кон'югованими із Alexa Fluor 488 (1:1000; «Invitrogen», США) протягом 1,5 год при кімнатній температурі. Потім зрізи відмивали, монтували на предметні скельця та заключали у середовище Fluorescence Mounting Media («Dako», Данія). Зображення тканини гіпокампа аналізували за допомогою конфокального мікроскопа FV1000-BX61WI («Olympus», Японія).

*Світлооптичне та електронно-мікроскопічне дослідження.* Фронтальні зрізи гіпокампів завтовшки 400 мкм отримували за допомогою чопера («McIlwain tissue chopper», Великобританія), залишали їх у тому самому фіксуєму розчині протягом 1,5 год та дофіксували у 1%-му розчині чотириоксиду осмію (OsO<sub>4</sub>) на 0,1 М фосфатному буфері протягом 1 год. Матеріал зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації і абсолютному ацетоні («MERK», Німеччина), заливали в смолу Epon-Araldit («Fluka», Швейцарія) [10]. Напівтонкі зрізи завтовшки 1 мкм отримували на ультрамікротомі LKB Bromma 8800 («LKB», Швеція), забарвлювали толуїдиновим синім та аналізували

на світлооптичному рівні за допомогою мікроскопів Olympus CX21 («Hitachi Ltd.», Японія) і Leica DM 1000 («Leica Microsystems», Німеччина). Для електронної мікроскопії ультратонкі зрізи (60-70 нм) середньої частини *stratum pyramidale* і *stratum radiatum* зони CA1 гіпокампа контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю. Зображення аналізували на мікроскопі JEM-100CX («Jeol», Японія) при збільшенні у 10000 разів.

*Імуноферментний аналіз.* Гіпокампи гомогенізували у буферному розчині (25 ммоль/л тріс-НСІ, 1 ммоль/л ЕДТА, 2 ммоль/л β-дитіотреїтолу, 0,2 ммоль/л фторид фенілметилсульфоніду, 0,01 % мертіолату; рН 7,4) у співвідношенні 100 мг тканини на 1 мл буфера. За допомогою диференційного ультрацентрифугування розділяли гіпокампальні протеїни на три фракції: 1) водорозчинну, що містила розчинну форму нейрональної клітинної молекули адгезії (NCAM); 2) мембранозв'язану, із мембранною формою NCAM; 3) цитоскелетну, що містила філаментний GFAP.

Визначення нейрон- та астроцитспецифічних протеїнів здійснювали методом конкурентного імуноферментного аналізу (ІФА). Використовували первинні кролячі поліклональні антитіла проти NCAM (розроблені проф. Г. Ушаковою) [11] і GFAP («Sigma», США), а також вторинні антикролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma», США). Для калібрування використовували очищені NCAM («Merck-Millipore», Німеччина) та GFAP («Boehringer Ingelheim», Німеччина). Концентрацію розчинної та мембранної форм NCAM, а також філаментного GFAP визначали за допомогою мікропланшетного фотометра Anthos 2010 («Biochrom Ltd.», Фінляндія) при довжині хвилі 492 нм і представляли у мікрограмах на 100 мг тканини.

*Морфометричний аналіз і статистична обробка результатів.* На напівтонких зрізах підраховували кількість нейронів, які мали чіткі ядра, на 1 мм довжини пірамідного

шару зони CA1 гіпокампа. На імунофлуоресцентно забарвлених зрізах визначали число астроцитів і мікрогліальних клітин на 1 мм<sup>2</sup> цієї зони, вимірювали площу астроцитів та кількість їх головних відростків. На ультратонких зрізах підраховували кількість синапсів та мітохондрій у синаптичних терміналях на 100 мкм<sup>2</sup> *stratum radiatum* зони CA1 гіпокампа.

Статистичну обробку цифрових результатів виконували за допомогою програми Statistica, версія 7 («StatSoft», США). Їх представляли у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  похибки середнього арифметичного ( $M \pm m$ ). Для оцінки статистичної вірогідності розбіжностей між вибірками використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. Відмінності вважали достовірними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кількість неушкоджених нейронів на 1 мм довжини пірамідного шару зони CA1

гіпокампа мишей дикого типу становила  $149,2 \pm 13,3$ . НЖ-дієта на тлі дефіциту ApoE викликала зниження цього показника на 25% ( $P < 0,001$ ). У групі з ВЖ-дієтою відносне число неушкоджених пірамідних нейронів становило  $147,7 \pm 6,0$ , що вірогідно не відрізнялося від контролю, проте майже на 25% було вищим, ніж у тварин з НЖ-дієтою ( $P < 0,001$ ; рис. 1).

У дослідних групах мишей GFAP-позитивні астроцити мали тонковідросчасту морфологію та розміщувалися в усіх шарах зони CA1 гіпокампа (рис. 2).

Кількість астроцитів на 1 мм<sup>2</sup> зони CA1 гіпокампа у контрольних тварин становила  $360,4 \pm 15,1$  клітин. У мишей, нокаутних за геном ApoE, які споживали ВЖ-дієту, не спостерігалось достовірного збільшення щільності астроцитів ( $376,8 \pm 15,4$  клітин/мм<sup>2</sup>). У ApoE-/- мишей із НЖ-раціоном число астроцитів підвищилося на 22 і 17% порівняно з I ( $P < 0,01$ ) та III ( $P < 0,05$ ) групами відповідно (рис. 3, а).

Подібна тенденція спостерігалася при

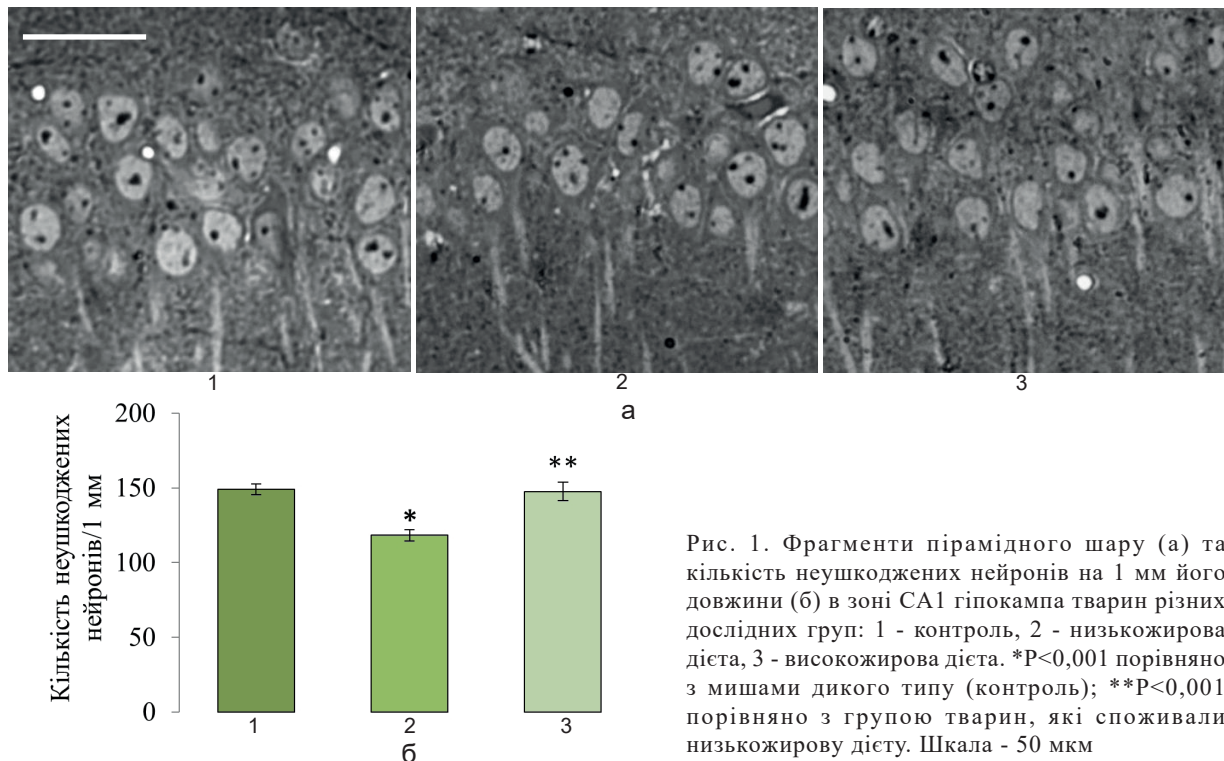


Рис. 1. Фрагменти пірамідного шару (а) та кількість неушкоджених нейронів на 1 мм його довжини (б) в зоні CA1 гіпокампа тварин різних дослідних груп: 1 - контроль, 2 - низькожирової дієти, 3 - високожирової дієти. \* $P < 0,001$  порівняно з мишами дикого типу (контроль); \*\* $P < 0,001$  порівняно з групою тварин, які споживали низькожирову дієту. Шкала - 50 мкм



дослідженні площі астрогліальних клітин залежно від типу харчування. У контрольних тварин цей показник становив  $130,2 \pm 6,3$  мкм<sup>2</sup>. У ApoE<sup>-/-</sup> мишей з НЖ-дієтою площа астроцитів збільшилася ( $188,2 \pm 7,2$  мкм<sup>2</sup>) і на 44,5 % ( $P < 0,001$ ) була вищою від контролю. При споживанні корму із високим

вмістом жирів площа GFAP-позитивних клітин була на рівні контрольної групи, що значно нижче ніж у тварин, які вживали НЖ-дієту ( $P < 0,001$ ; див. рис. 3, б). В окремих ділянках зони CA1 гіпокампа мишей з ВЖ-дієтою спостерігалися ознаки гіпертрофії астроцитарних клітин (див. рис. 2. 3).

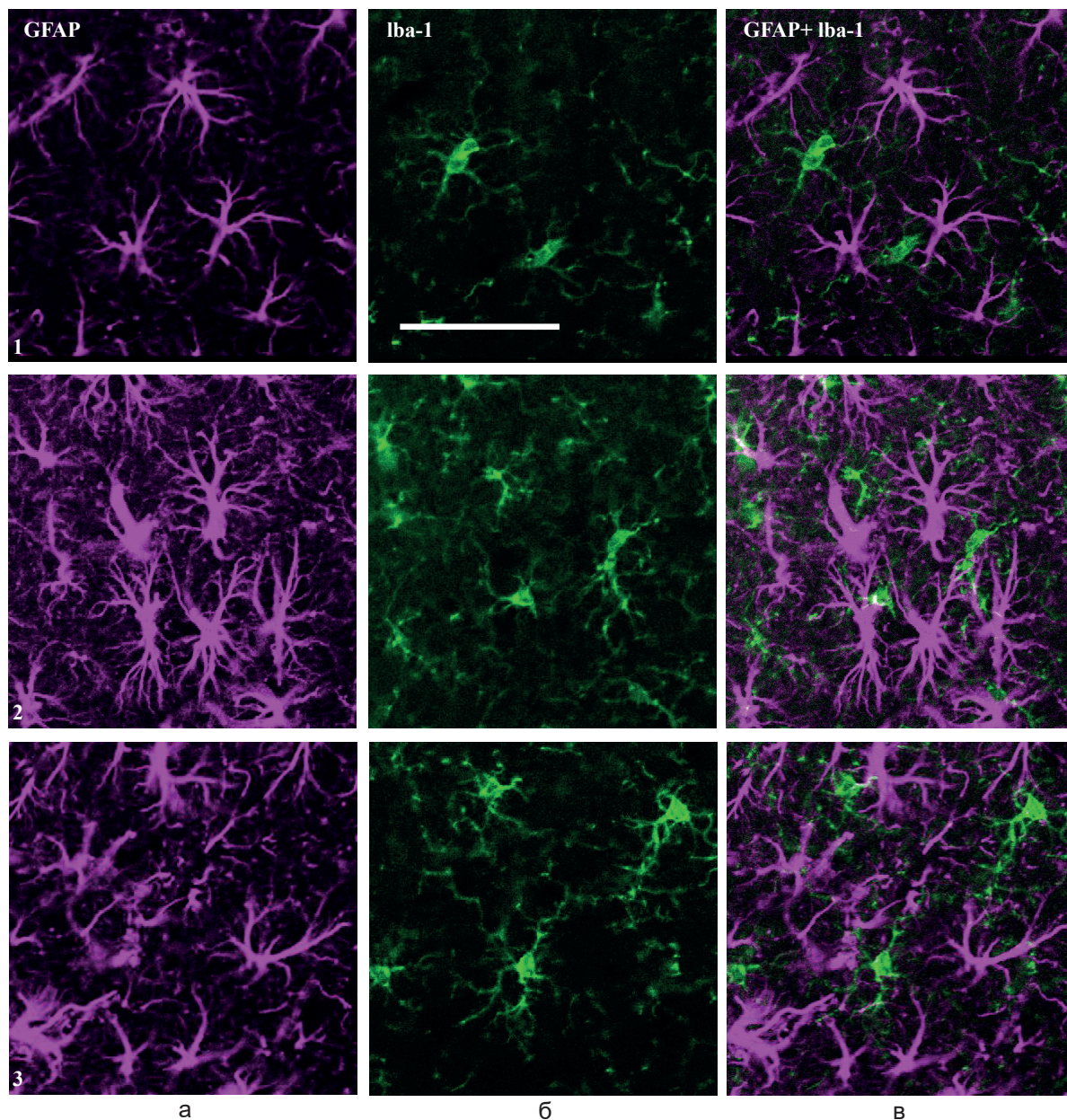


Рис. 2. Подвійне імунофлуоресцентне забарвлення гліальних клітин зони CA1 гіпокампа тварин різних дослідних груп: 1 - контроль, 2 - низькожирова дієта, 3 - високожирова дієта. GFAP-позитивні астроцити (а), Iba-1-позитивні мікрогліальні клітини (б) та їх поєднання (в). Шкала - 50 мкм

Астроцити зони СА1 гіпокампа контрольних мишей мали  $3,2 \pm 0,2$  головних відростки, у тварин II і III груп їх число збільшилося на 12,5 та 9 % відповідно (див. рис. 3, в).

В роботі Crisby та співавт. [12] кількість GFAP-позитивних астроцитів у нокаутних тварин була вірогідно вищою порівняно з контрольними. При високохолестериновому харчуванні число астроцитів у контролі збільшувалося до рівня АроЕ-мутантних мишей. Ці дві групи не мали відмінностей з АроЕ-/- тваринами, що споживали стандартну дієту.

Слід відмітити, що астроцити відіграють суттєву роль у забезпеченні гомеостазу нервової тканини за рахунок підтримання цілісності ГЕБ, функціонування синапсів і синаптогенезу, метаболізму нейромедіаторів

(глутамату, ГАМК), формування позаклітинного пулу  $K^+$  тощо. За умов впливу пошкоджуючих агентів астроглія реагує на них першою, реалізуючи специфічну захисну програму реактивного астрогліозу. Для цієї реакції характерна гіпертрофія та проліферація астроцитів, що супроводжується підвищенням синтезу білка проміжних філаментів - GFAP. Функціонально реактивний астрогліоз потрібний для посилення нейропротекції та трофічної підтримки нейронів, ізоляції зони пошкодження від решти тканини, перебудови ГЕБ і регенерації ділянки ураження. Часто астрогліоз вважають ознакою нейрозапалення [13]. Отримані нами результати вказують, що на фоні дефіциту АроЕ при НЖ-дієті розвивається реактивний астрогліоз в зоні СА1 гіпокампа мишей,

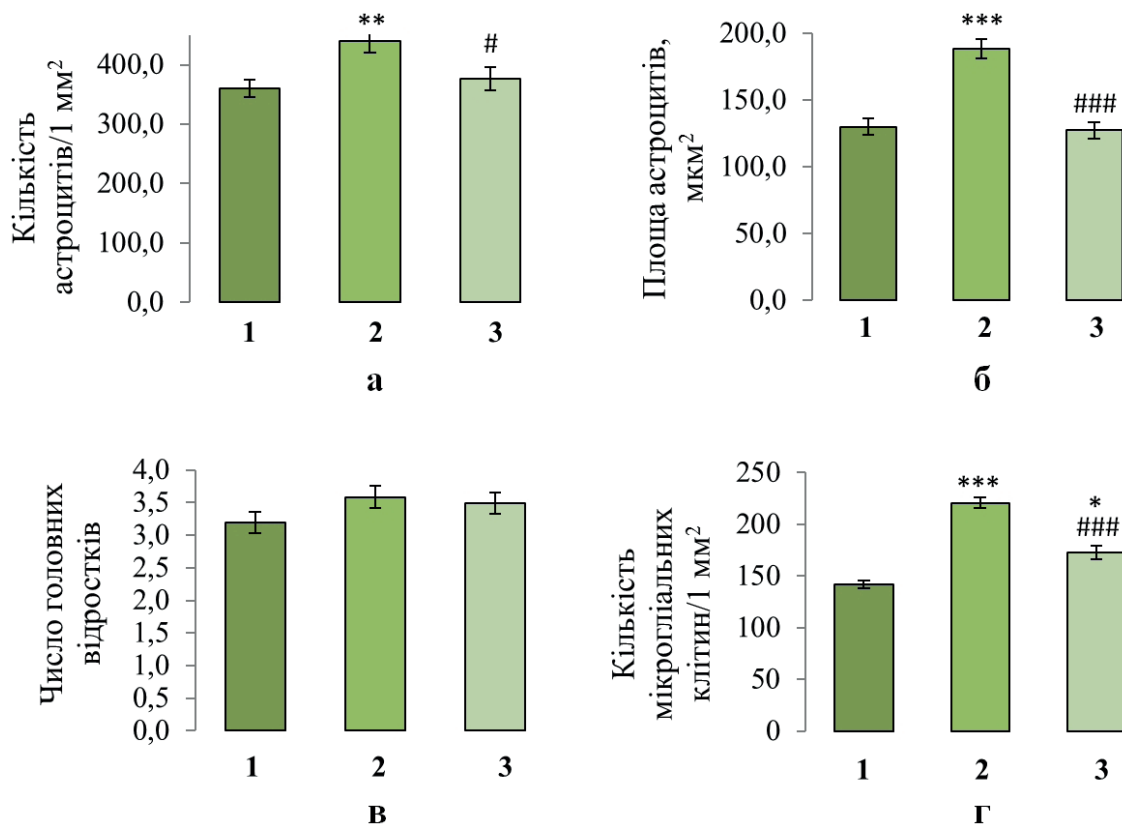


Рис. 3. Морфометричний аналіз гліальних клітин зони СА1 гіпокампа у тварин різних дослідних груп: 1- контроль, 2 - низькожирова дієта, 3 - високожирова дієта. Кількість астроцитів на 1 мм² зони СА1 гіпокампа (а), площа клітин астроглії (б), число головних астрогліальних відростків у перерахунку на одну GFAP-позитивну клітину (в), кількість Іба-1-позитивних клітин мікроглії (г) на 1 мм² зони СА1 гіпокампа. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  порівняно зі значеннями у мишей дикого типу (контроль); # $P < 0,05$ , ### $P < 0,001$  порівняно з групою тварин, які споживали низькожирову дієту

який проявлявся у достовірному підвищенні кількості GFAP-позитивних астроцитів та їх гіпертрофії, а також тенденції до збільшення числа головних відростків.

ВЖ-дієта сприяла підвищенню щільності Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин у гіпокампі АроЕ-дефіцитних мишей на 22% ( $P<0,05$ ) порівняно з диким типом. Найбільша кількість мікрогліальних клітин була у групі з НЖ-дієтою (на 56% більше, ніж у контролі, та на 28% більше, ніж у тварин з ВЖ-дієтою;  $P<0,001$ ; див. рис. 3, г).

Реакція як мікро- так і астрогліальних клітин є комплексною відповіддю на порушення ліпідного обміну в мозковій тканині. Famer та співавт. [6] показали, що дієта із високим вмістом холестерину індукуює збільшення кількості та активацію мікроглії, а також утворення медіаторів запалення. Однак у нашому дослідженні найбільше число Iba-1-позитивних клітин відзначалося в гіпокампі АроЕ-/- тварин із НЖ-дієтою.

Беручи до уваги отримані нами результати стосовно кількості життєздатних нейронів на одиницю довжини пірамідного шару зони СА1 гіпокампа, реактивного астрогліозу та числа мікрогліальних клітин на одиницю площі мозкової тканини, можна стверджувати, що найвищий ступінь ушкодження гіпокампа в АроЕ-мутантних мишей відбувався не стільки за умов ВЖ-дієти, скільки при НЖ-раціоні. Такий суперечливий висновок про менш виражений вплив ВЖ-харчування

на морфологічний стан нервової тканини підкріплюється результатами досліджень Goldman та співавт. [14]. На моделі хвороби Альцгеймера у мишей Tg2576 було виявлено, що ВЖ-дієта сприяла покращенню когнітивного функціонування через підтримання цілісності ГЕБ, морфології нервової тканини, попередження набряку шлуночків мозку.

Одним із факторів, що може впливати на запальний статус організму є зміна складу кишкової мікробіоти залежно від типу дієти. Рецептори TLR на поверхні моноцитів, макрофагів та інших клітин здатні розпізнавати й активуватися компонентами бактерій кишечника - ліпополісахаридами, пептидогліканом, протеїнами джгутиків. Це стимулює продукцію прозапальних цитокінів та хемокінів й може бути причиною системного запалення [15]. Нестача мікробіоти пригнічує декон'югацію жовчних кислот, що може призвести до підвищення вмісту холестерину в плазмі мишей [16]. Проте існують дані, що екзополісахариди бактерій, навпаки, мають гіпохолестеринемічні, антиоксидантні та імуномодуючі властивості. Це також може бути фактором впливу кишкового мікробіому на запальний статус організму.

На ультраструктурному рівні нами було проаналізовано зміни кількості синапсів, а також числа мітохондрій у синаптичних терміналях на одиницю площі *stratum radiatum* зони СА1 гіпокампа у різних групах

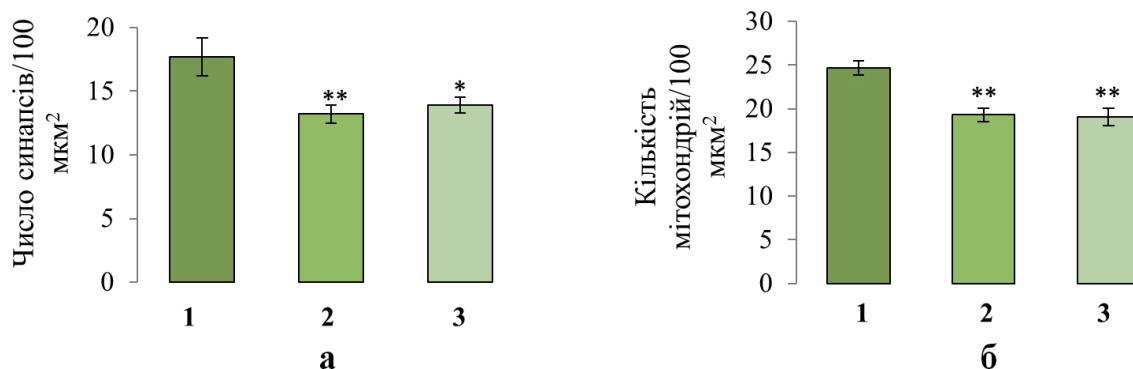


Рис. 4. Кількість синапсів (а) та мітохондрій у синаптичних терміналях (б) на 100  $\mu\text{m}^2$  *stratum radiatum* зони СА1 гіпокампа; 1 - контроль, 2 - низькожирова дієта, 3 - високожирова дієта. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  порівняно з мишами дикого типу (контроль)



тварин. Спостерігалось достовірне зменшення як синаптичної щільності, так і числа мітохондрій у ApoE-нокаутних мишей порівняно з диким типом незалежно від дієти (рис. 4).

У контрольних тварин кількість синапсів/100 мкм<sup>2</sup> площі мозкової тканини сягала  $17,7 \pm 1,5$ . У II та III дослідних групах зареєстровано зниження цього показника на 25% ( $P < 0,01$ ) і 21% ( $P < 0,05$ ) відповідно, що свідчить про зміни у синаптичній пластичності. Число мітохондрій у синаптичних терміналях II групи тварин зменшилося на 22% ( $P < 0,01$ ), а III - на 23% ( $P < 0,01$ ) порівняно з контролем. Це може вказувати на погіршення енергетичного забезпечення синаптичної передачі в цій ділянці гіпокампа.

Біохімічний аналіз вмісту нейрон- та астроцитспецифічних протеїнів, а саме мембранної та розчинної форм NCAM і фібрилярного GFAP, підтвердив направленість морфологічних змін у гіпокампі ApoE-/- мишей за умов НЖ- і ВЖ-дієт протягом 8 тиж. Відзначено збільшення фібрилярного GFAP на 32% при споживанні НЖ-дієти ( $P < 0,05$ ). GFAP залучений до реалізації багатьох процесів, зокрема, клітинної комунікації, функціонування ГЕБ, мієлінізації тощо [18,19]. Підвищення його концентрації пов'язують із розвитком реактивного астрогліозу, що був найбільш вираженим саме у тварин з НЖ-дієтою (рис. 5, а).

NCAM потрібні для росту нейрональних відростків, формування синапсів і перебудови їх контактів, для забезпечення динамічного навчання та підтримання пам'яті [19]. Оскільки мембранна форма NCAM є важливою для утримання гомофільного контакту між нейронами при формуванні синапсів, то зменшення мембранної та збільшення розчинної (цитозольної) форм свідчить про зниження синаптичної пластичності. Концентрація мембранної форми NCAM у гіпокампі мишей дикого типу становила  $56 \pm 0,93$  мкг/100 мг тканини (див. рис. 5, б). У мишей ApoE-/- за тривалої НЖ- і ВЖ-дієти вона знизилася на 17% ( $P < 0,19$ ) та 21%

( $P < 0,022$ ) відповідно. Цікаво, що це корелює зі зменшенням синаптичної щільності та кількості мітохондрій на одиницю площі зони CA1 гіпокампа ApoE-дефіцитних тварин. Вміст розчинної фракції NCAM був на однаковому рівні у контрольних і у тварин з ВЖ-дієтою (1,33 мкг/100 мг тканини) й на 18% нижчим із НЖ-дієтою (див. рис. 5, в).

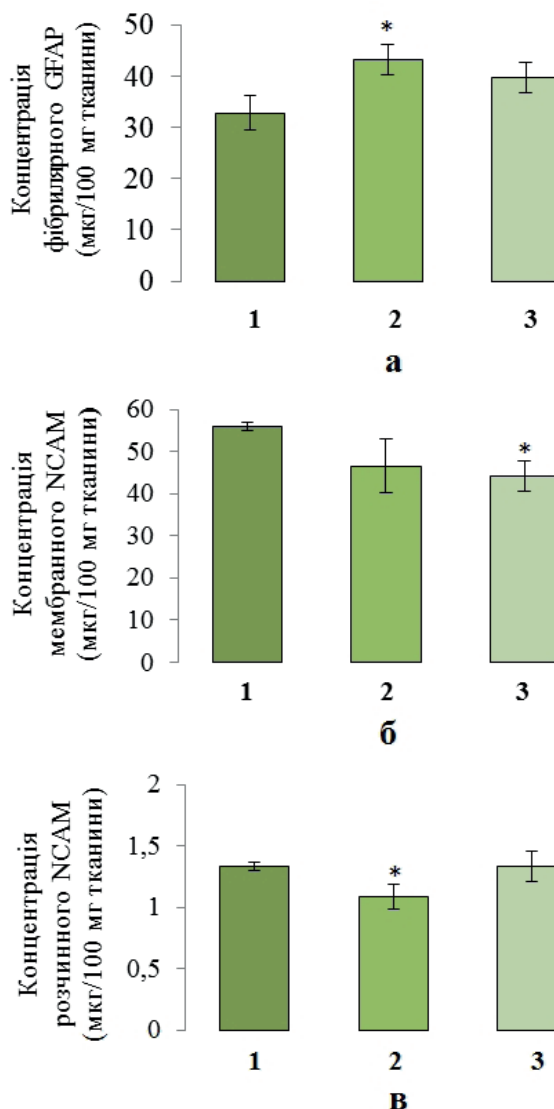


Рис. 5. Вміст нейрон- та астроцитспецифічних білків у гіпокампі тварин різних дослідних груп (мкг/100 мг тканини): 1- контроль, 2 - низькожирова дієта, 3 - високожирова дієта. Фібрилярний GFAP (а), мембранна (б) та розчинна (в) форми NCAM. \* $P < 0,05$  порівняно з мишами дикого типу (контроль)



Nunes та співавт. [20] порівнювали вміст стеролів у плазмі й мозку мишей дикого типу та тварин, нокаутних за геном АроЕ. Зокрема вони продемонстрували зменшення концентрації холестерину в мозку АроЕ-дефіцитних тварин порівняно з контролем на 31% ( $P < 0,0001$ ). Оскільки холестерин потрібний для процесів нейрональної активності, синаптичної пластичності та репарації ушкоджень нервової тканини, можна припустити, що його нестача є однією з причин змін у структурі гіпокампа тварин з НЖ- і ВЖ-дієтою, які ми спостерігали, а саме: зменшення кількості молекул клітинної адгезії, зниження кількості синаптичних терміналей та числа мітохондрій у них. Але на фоні дефіциту холестерину у молодих АроЕ-/- мишей (в нашому випадку, 8-16 тиж), імовірно, низький вміст жирних кислот, які надходять у мозок при НЖ-дієті, провокує більш виражені ушкодження гіпокампа, ніж при споживанні ВЖ-дієти.

## ВИСНОВКИ

Отримані результати показали, що морфофункціональний стан клітин гіпокампа АроЕ-/- мишей значною мірою залежить від жирового вмісту дієти. В АроЕ-дефіцитних тварин на НЖ-раціоні спостерігався вищий ступінь нейрозапалення, ніж у контрольній групі та у тварин з ВЖ-дієтою, який проявлявся розвитком реактивного астро- та мікрогліозу. Кількість неушкоджених пірамідних нейронів у зоні СА1 гіпокампа АроЕ-/- мишей при НЖ-дієті достовірно зменшувалася порівняно з контролем і значеннями у тварин, які були на ВЖ-харчуванні. Для процесів синаптогенезу та синаптичної пластичності критичним виявився не стільки жировий вміст дієти, скільки дефіцит АроЕ. У АроЕ-нокаутних мишей з НЖ- і ВЖ-раціоном у гіпокампі знижувалася щільність синапсів, кількість мітохондрій у синаптичних терміналях, а також концентрація молекул клітинної адгезії.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Т.Н. Коваленко, И.А. Осадченко, Д.Р. Шепилов, Е.Г. Сможаник, Д.В. Муравйова, Г.А. Ушакова, Н. Марунгруанг, Е.А. Приходько, Ф. Холениус, Г.Г. Скибо**

## ВЛИЯНИЕ НИЗКО- И ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ НА СТРУКТУРУ ГИППОКАМПА У НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ АРОЕ -/-

Проведены морфологические и биохимические исследования зоны СА1 гиппокампа у АроЕ-дефицитных мышей в условиях кормления диетами (8 недель) с низким (НЖ) и высоким (ВЖ) содержанием жиров. Использовали методы иммуногистохимии, световой и электронной микроскопии, иммуноферментного анализа, а также морфометрической и статистической обработки. Выявлено, что морфофункциональное состояние нервных клеток гиппокампа АроЕ-/- мышей в значительной степени зависит от жирового состава диеты. У животных на НЖ-рационе наблюдалась более высокая степень нейровоспаления, чем в контрольной и ВЖ-группах, что проявлялось в развитии реактивного астро- и микроглия. Количество неповрежденных пирамидных нейронов в зоне СА1 гиппокампа АроЕ-/- мышей на НЖ-диете достоверно уменьшалось по сравнению с контролем и ВЖ-группой. У животных на НЖ- и ВЖ-рационе было выявлено уменьшение плотности синаптических терміналей, количества митохондрий в них, а также концентрации молекул клеточной адгезии. Можно предположить, что для процессов синаптогенеза и синаптической пластичности критическим оказался не столько уровень жира в диете, сколько дефицит аполипопротеина Е.

Ключевые слова: АроЕ-нокаутные мыши, структура гиппокампа, низко- и высокожировая диеты.

**T.M. Kovalenko<sup>1</sup>, I.O. Osadchenko<sup>1</sup>, D.R. Shepilov<sup>1</sup>, K.G. Smozhanyk<sup>1</sup>, D.V. Muraviova<sup>2</sup>, G.O. Ushakova<sup>2</sup>, N. Marungruang<sup>3</sup>, O. Prykhodko<sup>3</sup>, F. Hallenius<sup>3</sup>, G.G. Skibo<sup>1</sup>**

## EFFECT OF LOW AND HIGH FAT DIETS ON THE HIPPOCAMPAL STRUCTURE IN APOE -/- KNOCKOUT MICE

The morphological and biochemical studies of the hippocampal CA1 area in ApoE-deficient mice under the conditions

of dietary intake (8 weeks) with low (LF) and high (HF) fat content were performed. Methods of immunohistochemistry, light and electron microscopy, immunoassay and morphometric as well as statistical analyses were used. It was revealed that the morpho-functional state of the nerve cells of the hippocampus ApoE-/- mice highly depends on the fat content of the diet. A higher degree of neuroinflammation was observed in the LF-group than in the control and HF-groups, which was manifested in reactive astro- and microgliosis. The number of undamaged pyramidal neurons in the CA1 area of the hippocampus ApoE-/- mice in the LF-group significantly decreased compared to the control group and the HF-group. In animals with LF- and HF-diet the density of synaptic terminals, the number of mitochondria in them, as well as the concentration of cellular adhesion molecules were decreased. It was suggested that synaptogenesis and synaptic plasticity in higher degree depended on the shortage of apolipoprotein E than on the fat content in the diet.

Key words: ApoE-knockout mice, hippocampal structure, low and high fat diets

<sup>1</sup>*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;*

<sup>2</sup>*Oles Honchar Dnipro National University;*

<sup>3</sup>*Lund University, Sweden;*

*e-mail: tnkovalenko@ukr.net, skibo@biph.kiev.ua*

## REFERENCES

1. Yaffe K. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA*. 2004 Nov 10;292(18):2237-42.
2. Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des*. 2008;14(4):338-51.
3. Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. 2012 Nov;5(6):746-55.
4. Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1801(8):806-18.
5. Janssen CI, Jansen D, Mutsaers MP, Dederen PJ, Geenen B, Mulder MT, Kiliaan AJ. The effect of a high-fat diet on brain plasticity, inflammation and cognition in female ApoE4-knockin and ApoE-knockout mice. *PLoS One*. 2016 May 12;11(5):e0155307.
6. Famer D, Wahlund LO, Crisby M. Rosuvastatin reduces microglia in the brain of wild type and ApoE knockout mice on a high cholesterol diet; implications for prevention of stroke and AD. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Nov 12;402(2):367-72.
7. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The ApoE(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med*. 2016 May 20;14(1):146.
8. Lane-Donovan C, Wong WM, Durakogluligil MS, Wasser CR, Jiang S, Xian X, Herz J. Genetic restoration of plasma ApoE improves cognition and partially restores synaptic defects in ApoE-deficient mice. *J Neurosci*. 2016 Sep 28;36(39):10141-50.
9. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*. 2010 Mar 30;2:12.
10. Weakley B. A beginner's handbook in biological electron microscopy. M.: Mir; 1975. [Russian].
11. Ushakova GA, Berezin VA, Skibo GG. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) distribution may predict the effect of neurotoxins on the brain. *Toxicol*. 1995;33(4):577-81.
12. Crisby M, Rahman SMA, Sylvén C, Winblad B, & Schultzberg M. (2004). Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice. *Neurosci Letters*. 2004 369(2): 87-92.
13. Verkhratsky A, Rodríguez JJ, Parpura V. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol*. 2013 Mar 1;8(2):149-58.
14. Elhaik Goldman S, Goetz D, Last D, Naor S, Liraz Zaltsman S, Sharvit-Ginon I, Cooper I. High-fat diet protects the blood-brain barrier in an Alzheimer's disease mouse model. *Aging Cell*. 2018 Oct;17(5): e12818.
15. Chan YK, Brar MS, Kirjavainen PV, Chen Y, Peng J, Li D, El-Nezami H. High fat diet induced atherosclerosis is accompanied with low colonic bacterial diversity and altered abundances that correlates with plaque size, plasma A-FABP and cholesterol: a pilot study of high fat diet and its intervention with *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) or telmisartan in ApoE-/- mice. *BMC Microbiology*. 2016 Nov 8;16(1): 264.
16. Kasahara K, Tanoue T, Yamashita T, Yodoi K, Matsumoto T, Emoto T, Hirata K. Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2017 Mar;58(3): 519-28.
17. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007 Jun;6(3):219-33.
18. Gómez-Pinedo U, Duran-Moreno M, Sirerol-Piquer S, Matias-Guiu J. Myelin changes in Alexander disease. *Neurologia*. 2018;33(8):526-33.
19. Cambon K, Hansen SM., Venero C, Herrero AI, Skibo G, Berezin V, Bock E, Sandi C. A synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation. *J Neurosci*. 2004 Apr 28;24(17):4197-204.
20. Nunes VS, Cazita PM, Catanozi S, Nakandakare ER, Quintão ECR. Decreased content, rate of synthesis and export of cholesterol in the brain of apoE knockout mice. *J Bioenergetics and Biomembranes*. 2018 Aug;50(4): 283-7.

*Матеріал надійшов  
до редакції 13.03.2019*