

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

ОСАДЧУК ЮЛІЯ СЕРГІЇВНА

УДК 616.8-091.81:611.814.1:[577.124.8+577.125.8]:57.084.1

**МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ВЕНТРОМЕДІАЛЬНОГО
ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ І ЙОГО КОРЕКЦІЇ**

За спеціальністю 222 – Медицина
Галузь знань 22 Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.
Осадчук Ю.С. _____

Науковий керівник: Чайковський Юрій Богданович
член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, професор

Київ – 2022

АНОТАЦІЯ

Осадчук Ю.С. **Морфо-функціональні зміни вентромедіального ядра гіпоталамуса за умов експериментального цукрового діабету 2 типу і його корекції.**- Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина. Галузь знань 22 Охорона здоров'я. – Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ, 2022.

Зміст анотації

Дисертація присвячена вирішенню актуального наукового завдання сучасної нейробіології вивченню морфо-функціональних змін у нейронах та нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамуса щурів із експериментальною моделлю цукрового діабету 2 типу, зокрема стресу ендоплазматичного ретикулуму нейронів, нейрогліозу, апоптозу й аутофагії нейронів та впливу комбінованого введення метформіну і натрію пропіонату на вказані процеси для подальшої перспективи розробки фармакологічних схем нейропротекції на тлі діабетичної енцефалопатії.

Ожиріння, метаболічний синдром (МС) та цукровий діабет 2 типу (ЦД2), визнані актуальною проблемою здоров'я населення у 21 столітті. Генетичні та молекулярні фактори, вплив середовища, харчування, поведінки, способу життя сприяють поглибленню МС до ЦД2 і розвитку ряду ускладнень, зокрема діабетичної нейропатії, енцефалопатії, що суттєво знижує якість життя пацієнтів, призводить до драматичних наслідків [104, 34, 15, 54]. Однак патогенетичні ланки пошкодження нейронів під впливом комбінованого порушення глюкозного та ліпідного гомеостазу залишаються не вивченими [21, 29]. Дослідження на тваринних моделях відкривають шлях до аналізу внутрішньоклітинних механізмів мозкової регуляції гомеостазу, перш за все гіпоталамічних структур, надають можливість досліджувати порушення центральної ланки на тлі несприятливого впливу ЦД2, і також окреслюють напрямки нових варіантів лікування [87].

Центром регуляції обміну речовин організму є гіпоталамус [50, 56, 62].

Головними структурами які визначають центральні механізми регуляції рівня глюкози та ліпідів для забезпечення енергетичного балансу відповідно потреб організму є нейрони: вентромедіального (VMH), латерального та аркуатного ядер. Дизрегуляція функцій гіпоталамічних ядер призводить до порушення метаболізму глюкози та розвитку ЦД2. Причиною вважають запалення нервової тканини низького ступеня, яке розповсюджується зокрема на гіпоталамус, виникнення резистентності нейронів гіпоталамуса до лептину та порушення нейрогенезу [21, 30, 133, 175]. Нейробіологічна основа лептинорезистентності залишається остаточно нез'ясованою і розглядається гіпотеза про шляхи формування стану: запалення в області гіпоталамічних ядер; порушення аутофагії нейронів; стрес ендоплазматичного ретикулула (ER) у нейронах [49, 57, 125, 152]. Стрес ER активує сигнальну систему у вигляді відгуку неструктурованих протеїнів (UPR) [42]. Тому, наше дослідження було присвячено вивченню структурних змін ER в нейронах VMH щурів, показників системи UPR, пов'язаними з дисбалансом внутрішньоклітинного гомеостазу, апоптозом й аутофагією нейронів на тлі експериментального ЦД2.

Для корекції порушень в нервовій тканині, викликаних ЦД2, ми обрали метформін – традиційний лікарський засіб, що вважається «золотим стандартом» лікування ЦД2 та натрію пропіонат (надалі, пропіонат) сіль пропіонової кислоти (коротколанцюгової жирної кислоти), яка є дієтичною добавкою і призначається як додатковий компонент лікування пацієнтів із нейродегенеративними (аутоімунними) захворюваннями [24, 64, 144]. Механізм впливу пропіонату на нейрони гіпоталамусу не відомий і активно вивчається. Вважається, що пропіонат, при надходженні у кишечник, стимулює імунні клітини, зокрема Т-лімфоцити стінки кишечника, викликає синтез нейромедіаторів, цитокінів, гормонів, які акцептуються нейроглією, що пригнічує демієлінізацію і опосередковано впливає на властивості нейронів [14, 45, 58, 144, 165].

Таким чином, вивчення структурно-функціональних змін в нейронах медіального гіпоталамусу на тлі ЦД2, є шляхом з'ясування патогенетичної ланки порушення внутрішньоклітинних механізмів центру регуляції гомеостазу. Дослідження стану нервової тканини на тлі комбінованого введення метформіну з пропіонатом призводить до розуміння доцільності використання вказаних препаратів для забезпечення нейропротекції на тлі ЦД2 та МС.

Метою роботи було вивчення морфо-функціональних змін нейронів та нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамусу за умов експериментального цукрового діабету 2 типу і його корекції.

Завдання дослідження:

1. Визначити найбільш ефективний шлях відтворення експериментальної моделі ЦД2 на щурах через вивчення біохімічних показників та спектру жирних кислот в тканинах тварин.

2. Дослідити ультраструктурні зміни нейронів та нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамусу (VMH) щурів із ЦД2 та за умов його корекції.

3. Вивчити функціональний стан ендоплазматичного ретикулуму нейронів VMH щурів із ЦД2 та за умов його корекції шляхом дослідження показників UPR-системи (протеїнів GRP78; PERK; ATF6; IRE-1).

4. Дослідити морфо-функціональні маркери нейроглії (Iba-1; GFAP ZO-1) в зоні VMH на тлі ЦД2 та за умов його корекції.

5. Вивчити морфо-функціональні маркери аутофагії (LC3; Beclin-1) й апоптозу (Bcl_xl; BAX; Caspase-3) в зоні VMH щурів із ЦД2 та за умов його корекції.

6. Сформулювати концепцію фармакологічного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нейронів і нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамусу для подальшої перспективи використання вказаних препаратів на тлі ЦД2.

Дисертаційне дослідження виконувалося на самцях здорових білих щурів, масою 160-180 грамів ($M+m = 176,8 \pm 8,3$) з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами (Протокол засідання Комісії з Біоетики НМУ, протокол № 157 від 18.04.2022 р.). Для вирішення першої задачі було проаналізовано вплив високо-жирової дієти (свинячий жир 45% + фруктоза 20% + медична жовч 1% + корм віварію 34%) протягом 3 місяців із подальшою однократною індукцією стрептозотоцином (25 мг/кг) внутрішньочеревинно, на організм щурів за біохімічними показниками сироватки крові та вмістом жирних кислот. Доведено, що вказані впливи викликають у щурів зміни (гіперглікемію, інсулінорезистентність, ожиріння, підвищення в тканинах насичених жирних кислот тощо), які співставні з аналогічними змінами в організмі людини із тривалим ЦД2 та розвинутими мікросудинними ускладненнями. Таким чином, наведена модель є патогенетично обґрунтованим підходом відтворення ЦД2, а також вивчення ушкоджень в нервовій тканині на тлі ЦД2 та їх фармакологічної корекції. Для вивчення впливу препаратів були сформовані 5 дослідних груп по 6 щурів в кожній: контрольна група (КГ); щури з експериментально індукованим ЦД2 (ЦД2); щури з ЦД2, які протягом 14 днів отримували внутрішньошлунково: метформін, розчинений у воді для ін'єкцій (GLUKOFAGE, Merck Sante, Франція) у дозі 60 мг/кг маси тіла (ЦД2+Мет); натрієву сіль пропіонової кислоти (PROPICUM®, Flexopharm Brain GmbH & Co, Німеччина), розчинену у воді для ін'єкцій у дозі 60 мг/кг маси тіла (ЦД2+Проп); щури з ЦД2 які одночасно отримували метформін (60 мг/кг маси тіла) та натрієву сіль пропіонової кислоти (60 мг/кг маси тіла) (ЦД2+Мет+Проп). Після закінчення введення препаратів тварин виводили із експерименту шляхом декапітації на тлі летальної дози тіопенталу натрію і забирали для дослідження біологічний матеріал.

Для вирішення другої задачі за допомогою електронної мікроскопії проводили вивчення ультраструктурних змін нейронів та нейроглії VMH на

тлі ЦД2. Виявили особливості змін нейронів, які характеризуються як стрес ендоплазматичного ретикулума (ЕР), вивчили та порівняли в дослідних групах кількісні морфологічні характеристики: відносну площу цистерн ЕР, відносну площу мембран ЕР, долю ЕР в клітині, площу перинуклеарного простору. Досліджували, як впливає введення препаратів на морфологічні характеристики нейронів та нейроглії.

Наступним кроком було вивчення шляхом вестерн-блот аналізу вмісту в нервовій тканині протеїнів, які відносяться до UPR-системи: шаперону GRP78 та його трансмембранних датчиків PERK; ATF6; IRE-1, а також ступеню їх експресії за кількістю мРНК. Вивчали розподіл в клітинах протеїну GRP78 в нейронах за допомогою імуногістохімічного (ІГХ) метода. Виявлені закономірності у сукупності із даними ультраструктурних досліджень надали можливість сформулювати концепцію змін нейронів VMH щурів на тлі ЦД2 та протективного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нервової тканини.

Дослідження морфо-функціональних особливостей нейроглії на тлі ЦД2 та за умов корекції проводили шляхом вивчення вмісту протеїнів Iba-1; GFAP, ZO-1 за допомогою вестерн-блот аналізу, дослідженням експресії протеїнів та аналізу ІГХ розподілу в тканині маркера мікроглії Iba-1. Виявили суттєве підсилення гліозу на тлі введення пропіонату. Завершальним етапом дослідження було вивчення маркерів аутофагії (LC3; Beclin-1) й апоптозу (Bcl_xl; BAX; Caspase-3) в зоні VMH щурів із ЦД2 шляхом визначення вмісту протеїнів, їх експресії та розподілу в клітинах. Проведений кореляційний аналіз показників та співставлення даних із результатами ультрамікроскопічних досліджень надали можливість висловити ряд гіпотез, які пояснюють реалізацію в нейронах важливого адаптаційного механізму - ERAD-системи – утилізації пошкоджених протеїнів в межах ЕР (англ., Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation), який, в свою чергу, може бути основою «переключення» внутрішньоклітинних механізмів із напрямку апоптозу на аутофагію. Що за умов стресу ЕР забезпечує нейронам

адаптацію, їх виживання, а також може бути підґрунтям ефективної фармакологічної корекції ушкодження нейронів VMH при ЦД2, що є основою встановлення функцій центрів регуляції гомеостазу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше вивчені морфологічні та функціональні ознаки стресу ER в нейронах VMH щурів на тлі експериментального ЦД2. Виявлено, що морфологічними ознаками стресу ER в нейронах на тлі ЦД2 є розширення цистерн, пікноз ядра, збільшення перинуклеарного простору тощо. Функціонально стрес ER характеризується зниженням в нейронах вмісту шаперону BiP/GRP78 та підвищенням вмісту UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK.

Вперше описаний стан нейрогліозу у VMH щурів на тлі ЦД2, через співставлення ультрамікроскопічних змін в нервовій тканині із підвищенням маркерів мікроглії Iba-1, астроглії GFAP і критичним зниженням маркера десмосом астроцитів ZO-1. Вперше висловлена гіпотеза про утворення аутофагосом в нейронах VMH щурів тлі ЦД2 із мембрани ER, що розкриває механізм реалізації ERAD-системи – утилізації пошкоджених протеїнів в межах ER (англ., Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation). Продемонстровано, що при введенні пропіонату суттєво підвищується вміст в нервовій тканині маркерів аутофагії LC3 та Beclin-1, збільшується кількість аутофагосом, що супроводжується суттєвим зменшенням площі цистерн ER.

Вперше висловлене припущення, що моделювання ЦД2 індукувало апоптотичну загибель нейронів через активацію мітоптозу. На тлі ЦД2 виявлене критичне зниження вмісту протиапоптичного протеїну Bcl-x1, підвищення Caspase-3 та маркеру пошкодження мітохондрій BAX-димеру, що за даними ультрамікроскопічних змін нейронів VMH супроводжується збільшенням пікнотичних ядер, набряком нейропілю, набряком та деструкцією мітохондрій.

Вперше сформована концепція змін нейронів VMH щурів на тлі ЦД2 та протективного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нервової тканини. На тлі ЦД2 в нейронах VMH виникає стрес ER: рівень

шаперону GRP78 зменшується в 2 рази, оскільки він секвеструється в цистерну ER та поєднується із місфолдінговими протеїнами для їх інактивації. Вміст трансмембранних UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK значно підвищується. Під дією метформіну або пропіонату шляхи ATF6, IRE1 активуються різною мірою, що сприяє синтезу GRP78, але зберігається підвищення PERK, який гальмує фолдінг в клітині. Комбіноване введення найбільш ефективно відновлює вміст в цитоплазмі GRP78, зменшує ATF6, IRE1, PERK і сприяє компенсації стресу ER.

Практичне значення отриманих результатів. Вперше доведено, що фармакологічна корекція метформіном у поєднанні із пропіонатом покращує стан нейронів VMH у щурів із ЦД2 й викликає компенсацію стресу ER, що може бути підґрунтям для подальшої перспективи використання вказаних препаратів і розробки схем нейропротекції. Вперше показаний ефективний вплив комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан гліюзу в нервовій тканині. Виявлено, що на тлі ЦД2 виникало 5-кратне підвищення показника мікроглії Iba1 та критичне зменшення маркера десмосом ZO-1. Поєднання препаратів знижувало рівень Iba1 на 45%, і підвищувало рівень ZO-1. Вперше показаний ефективний вплив комбінованого введення метформіну з пропіонатом на процеси апоптозу в нейронах VMH у щурів із ЦД2. Введення препаратів в 4,5 рази зменшувало рівень Caspase-3, в 13 разів підвищувало експресію Bcl-x1, що демонструвало більш ефективний антиапоптотичний механізм.

Вперше доведено, що монотерапія метформіном не запобігає виникненню енцефалопатії у щурів із ЦД2. На тлі лікування метформіном за допомогою ультрамікроскопічних досліджень виявили накопичення ліпофусцину, що є ознакою «старіння» клітини, пригнічення убіквілін-протеосомної системи та дегенерації нейронів. Вперше вивчений вплив пропіонату на стан нейронів VMH у щурів із ЦД2. Введення пропіонату поліпшує ультраструктуру, активує утворення аутофагосом, але при цьому максимально підсилює нейрогліоз.

Вперше показано, що харчове навантаження у складі високо-жирової дієти (45% жиру)+фруктоза протягом 3 місяців із подальшою однократною індукцією стрептозотоцином (25 мг/кг), викликає зміни ліпідного та вуглеводного метаболізму в організмі тварин співставні із аналогічними змінами в організмі людини із тривалим ЦД2 і розвинутими мікросудинними ускладненнями.

ВИСНОВКИ

1. Моделювання на щурах експериментального ЦД2 шляхом харчового навантаження (високо-жирова дієта (45% жиру)+фруктоза) протягом 3 місяців із подальшою однократною індукцією стрептозотоцином (25 мг/кг), викликає зміни ліпідного та вуглеводного метаболізму в організмі тварин (гіперглікемію, інсулінорезистентність, ожиріння, підвищення в печінці вмісту насичених жирних кислот тощо), співставні з аналогічними змінами в організмі пацієнтів із розвинутими мікросудинними ускладненнями на тлі ЦД2, що обґрунтовує використання моделі для дослідження порушень нервовій тканині та їх корекції.

2. На тлі ЦД2 в VMH за допомогою електронної мікроскопії виявлено значна кількість апоптотичних нейронів, набряк нейропілю та зміни ER: збільшення відносної площі цистерн в 2,25 рази ($p=0,024$), розширення перинуклеарного простору 44% ($p=0,038$). Введення препаратів зменшувало відносну площу цистерн ER: метформіну на 36% ($p=0,046$); пропіонату в 3 рази ($p=0,009$), а поєднання препаратів в 3,4 рази ($p=0,008$). Загальна доля ER у клітині зменшувалась після дії пропіонату на 66% ($p=0,03$); поєднання препаратів на 80% ($p=0,019$).

3. Функціональною ознакою стресу ER на тлі ЦД2 в нейронах VMH було зниження у 2 рази рівню GRP78 та підвищення трансмембранних протеїнів PERK, ATF6, IRE1. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом найбільш ефективно активувало ядерну транскрипцію GRP78, через сигнальні шляхи ATF6, IRE1, а також ефективно знижувало PERK, що

відновлювало синтез протеїнів і сприяло встановленню функції ER у нейронах.

4. На тлі ЦД2 в зоні VMH виявили ознаки нейрогліозу за підвищенням рівня Iba1 у 5,44 разів ($p=0,01$) та зниженням маркера десмосом ZO-1 на 89% ($p=0,002$). Рівень білка GFAP не змінювався в групі ЦД2. Введення пропіонату на тлі ЦД2 ще додатково призводило до активації гліальних структур і підвищувало рівень усіх маркерів: Iba1 на 63% ($p=0,035$), GFAP у 3 рази ($p < 0,001$) і ZO-1 до значень контролю. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом найбільш позитивно впливало на стан нейроглії: знижувався рівень Iba1, GFAP та підвищувався вміст ZO-1.

5. Відтворення ЦД2 не змінювало маркери аутофагії нейронів VMH, а введення метформіну з пропіонатом підвищувало вміст LC3 та Beclin-1. Максимальний рівень протеїнів спостерігали на тлі введення пропіонату: підвищувався Beclin-1 у 3 рази ($p=0,003$) та LC3 у 4 рази ($p= 0,002$), що відповідало ультрамікроскопічній картині збільшення кількості аутофагосом.

6. На тлі ЦД2 в нервовій тканині VMH рівень Caspase-3 був підвищений в 4,4 рази ($p=0,001$), BAX-димеру - в 5,7 разів ($p=0,003$), вміст протиапоптотичного протеїну Bcl-x1 було зменшено в 10 разів ($p= 0,002$), що відповідало ультрамікроскопічній картині збільшення кількості апоптотично пошкоджених нейронів. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом знижувало вміст Caspase-3 в 4,5 рази ($p=0,0001$), вміст BAX до значень контролю, а експресію Bcl-x1 підвищувало в 16 разів ($p=0,0005$) відносно ЦД2.

7. Сформована концепція зміни нейронів VMH щурів на тлі ЦД2 та протективного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нервової тканини. На тлі ЦД2 в нейронах VMH виникає стрес ER: рівень шаперону GRP78 зменшується в 2 рази, оскільки він секвеструється в цистерну ER та поєднується із місфолдінговими протеїнами для їх інактивації. Вміст трансмембранних UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK значно підвищується. Під дією метформіну або пропіонату шляхи ATF6, IRE1

активуються різною мірою, що сприяє синтезу GRP78, але зберігається підвищення PERK, який гальмує фолдінг в клітині. Комбіноване введення препаратів найбільш ефективно відновлює вміст в цитоплазмі GRP78, зменшує ATF6, IRE1, PERK і сприяє компенсації стресу ER.

Ключові слова: нейрони, стрес ендоплазматичного ретикулума, гіпоталамус, нейроглія, електронна мікроскопія, мозок, цукровий діабет, пропіонат, ультрамікроскопічні дослідження.

Summary

Osadchuk Yu.S. Morpho-functional changes of the ventromedial nucleus of hypothalamus under the condition of experimental type 2 diabetes mellitus and after its correction. – Thesis manuscript.

Thesis for acquiring the scientific degree of Doctor of Philosophy, specialty 222 – Medicine. Study Branch 22 Healthcare. – Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2022.

Contents

The PhD thesis is devoted to the important scientific problem of modern neurobiology, concerning the study of morpho-functional changes in neurons and glial cells of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) of rats with the experimental type 2 diabetes mellitus (T2DM), including the development of endoplasmic reticulum (ER) stress, neurogliosis, apoptosis and autophagy of neurons. In addition, the influence of combined administration of metformin and sodium propionate on abovementioned processes was investigated in order to develop the possible pharmacological schemes for the neuroprotection on the background of the development of diabetic encephalopathy.

Obesity, metabolic syndrome (MS) and type 2 diabetes mellitus are considered among the most urgent public health problems in the 21st century. Genetic, environmental and molecular factors, the influence of diet, behavior and lifestyle altogether contribute to the development of MS and T2DM, associated with a number of complications, including diabetic neuropathy and encephalopathy, which dramatically reduce the quality of life of patients [104, 34,

15, 54]. However, the pathogenetic mechanisms of the neuronal damage under the influence of the combination of impaired glucose and lipid homeostasis remain unexplored [21, 29]. Research on experimental animal models allow to analyze the intracellular mechanisms of cerebral regulation of homeostasis, especially in hypothalamic structures, and to study the impairments of central regulation on the background of diabetes mellitus, and also to elucidate the new trends in treatment options [87].

Hypothalamus is the center of regulation of metabolism [50, 56, 62]. The main structures of hypothalamus that are responsible for the central mechanisms of regulation of glucose and lipid metabolism to ensure the energy balance of the organism are neurons of ventromedial, lateral and arcuate nuclei. Dysregulation of the functional activity of the hypothalamic nuclei leads to the impaired glucose metabolism and, as a consequence, the development of T2DM. One of the reasons is the low-grade inflammation of the nervous tissue, in particular, the hypothalamus, the resistance of hypothalamic neurons to leptin and an impaired neurogenesis [21, 30, 133, 175]. The neurobiological basis of leptin resistance remains unclear. Therefore, there are several hypotheses of the development of this condition: an inflammation in the hypothalamic nuclei, disturbances in the process of neuronal autophagy, ER stress in neurons [49, 57, 125, 152]. ER stress activates the signaling way of unfolded protein response (UPR) [42]. Therefore, our study was devoted to the investigation of structural changes in ER of rat VMH neurons, the state of UPR system associated with an imbalance of intracellular homeostasis, apoptosis and autophagy of neurons on the background of experimental T2DM.

To correct the disturbances in the functioning of nervous tissue, caused by T2DM, we chose metformin – a well-known medication, that is considered the "gold standard" for the treatment of type 2 diabetes mellitus, and sodium propionate (here and throughout the text, propionate) – salt of propionic acid (short-chain fatty acid), which is a dietary supplement and an additional component for the treatment of patients with neurodegenerative autoimmune diseases [24, 64, 144]. The mechanism of propionate action on the hypothalamic

neurons is unknown and should be actively studied. It was reported, that propionate when entering the intestine, stimulates immune cells, including T-lymphocytes of the intestinal wall, causes the synthesis of neurotransmitters, cytokines, hormones that may influence glial cells, which inhibits the process of demyelination and indirectly affects the neuron functioning [14, 45, 58, 144, 165].

Thus, the study of structural and functional changes in the VMH neurons on the background of T2DM development, is the important step to elucidate the pathological process of the disturbances of intracellular mechanisms in the center of regulation of homeostasis. The investigation of the state of nervous tissue after combined administration of metformin and propionate may allow to substantiate the use of these drugs for neuroprotection on the background of T2DM and MS development.

The propose of the study was to determine the morpho-functional changes of neurons and glial cells of the ventromedial nucleus of the hypothalamus under experimental type 2 diabetes mellitus and after its possible correction by metformin and propionate. The following tasks were defined, according to the study purpose:

1. To determine the most effective way to reproduce the experimental model of T2DM in rats via monitoring the biochemical parameters and studying the spectrum of fatty acids in animal tissues.
2. To investigate ultrastructural changes of neurons and glial cells of the ventromedial nucleus of the hypothalamus rats with T2DM and after its correction by metformin and propionate.
3. To study the functional state of the endoplasmic reticulum of VMH neurons in rats with type 2 diabetes mellitus and under its correction by studying the parameters of UPR system (particularly, proteins GRP78, PERK, ATF6, IRE1).
4. To determine the functional markers of glial cells (Iba1, GFAP, ZO-1) in the VMH on the background of type 2 diabetes mellitus and after its correction.

5. To study the functional markers of autophagy (LC3, Beclin-1) and apoptosis (Bcl_xl, BAX, caspase-3) in the VMH of rats with T2MD and under the action of metformin and propionate.
6. To outline the molecular mechanisms of the pharmacological effect of combined administration of metformin and propionate on the state of neurons and glial cells of the ventromedial nucleus of hypothalamus in order to scientifically substantiate the use of these drugs on the background of T2MD.

The present study used male Wistar rats weighing 160-180 grams (176.8 ± 8.3 g). All experimental procedures with animals were carried out in accordance with national guidelines concerning animal welfare (Protocol 157 from 18/04/2022 of experiments on rats, approved by the Bioethics Committee of the Bogomolets National Medical University). To solve the first issue, the effect of high-fat diet (pre-melted fat from lard 45%, dry fructose 20%, medical bile acids 1%, standard rodent feed 34%) on rats was analyzed for 3 months, followed by a single injection of streptozotocin (at a dose 25 mg/kg) intraperitoneally based on biochemical parameters of blood serum and fatty acid content in different tissues. It was shown that high-fat diet caused changes in the organism of rats (hyperglycemia, insulin resistance, obesity, elevated content of saturated fatty acids etc.) that are comparable to similar changes in human organisms, that are developed on the background of chronic diabetes associated with microvascular complications. Thus, abovementioned way to induce diabetes mellitus in rats is an experimentally grounded approach to reproduce the development of T2DM, as well as to study the damage of nervous tissue on the background of T2DM and to test possible options for pharmacological correction. Subsequently, rats were divided into 5 experimental groups, each including 6 animals: 1) the control group (CG); 2) the group with experimentally induced type 2 diabetes mellitus (T2DM); 3) the group that received anti-hyperglycemic agent metformin dissolved in water for injection (GLUKOFAGE, Merck Sante, France) at a dose 60 mg/kg of b.w., for 14 days, orally on the background of T2DM (T2DM+Met); 4) the group that received sodium salt of propionic acid (PROPICUM®, Flexopharm Brain GmbH & Co,

Germany) dissolved in water for injection at a dose 60 mg/kg of b.w., for 14 days, orally on the background of T2DM (T2DM+Prop); 5) the group that received concurrently metformin (60 mg/kg of b.w., for 14 days, orally) and sodium salt of propionic acid (60 mg/kg of b.w., for 14 days, orally) on the background of T2DM (T2DM+Met+Prop). After administration of the drugs, the animals were removed from the experiment by decapitation on the background of a lethal dose of sodium thiopental and biological material was taken for study.

To solve the second issue, an electron microscopy was used to study the ultrastructural changes of neurons and glial cells in VMH on the background of T2DM. Firstly, the changes in neuronal cells with the signs of stress of the endoplasmic reticulum were detected. Secondly, quantitative morphological characteristics of ER, as relative area of ER cisterns, relative area of ER membranes, overall fraction of ER in the cell, and the area of perinuclear space in the VMH of experimental groups, were studied and compared between control and T2DM groups. Moreover, the influence of metformin and propionate on the morphological characteristics of neurons and glial cells was investigated.

The next step was to determine the protein content of the UPR system components: chaperone GRP78 and its transmembrane sensors (PERK, ATF6, IRE1), in the nervous tissue by Western blot analysis as well as their relative mRNA expression, that was detected by RT-PCR. In addition, the distribution of GRP78 protein in VMH neurons on the background of diabetes mellitus and after its correction was studied by immunohistochemical (IHC) staining. Identified patterns of the expression of UPR components in association with the revealed ultrastructural changes in VMH may be considered an experimental basis to interpret changes in VMH neurons of rats on the background of T2DM and to explain the neuroprotective effect of the combined administration of metformin and propionate.

An investigation of the morpho-functional changes of VMH glial cells on the background of T2MD and after the pharmacological correction was performed based on the determination of the content of Iba1, GFAP, ZO-1 proteins using

Western blot analysis, their mRNA expression and IHC studies of the distribution of microglial marker Iba1. It was found the development of gliosis on the background of the propionate administration. The final step of our research was to study the protein and mRNA levels of markers of autophagy (LC3, Beclin-1) and apoptosis (Bcl_xl, BAX, caspase-3) in the VMH of rats with T2DM and their distribution within cells. The correlation analysis of abovementioned parameters and its comparison with the results of ultramicroscopic studies provided the scientific basis to substantiate a number of hypotheses which could explain the involvement of an important adaptive mechanism in neurons, so-called ERAD-system (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation), that is responsible for the utilization of damaged proteins within ER, that, in turn, may represent the intracellular "switching" point from apoptosis to autophagy. In turn, this mechanism under ER stress condition ensures an adaptation and survival of neurons, and can serve the basis for effective pharmacological correction of VMH neuronal damage after T2DM development as well as for normalization of the functions of regulatory centers of homeostasis.

Scientific relevance. For the first time, morphological and functional signs of ER stress development in VMH neurons in rats were studied on the background of experimental T2DM. It was found that the morphological signs of T2DM-induced ER stress in neurons were the enlargement of ER cisterns, pyknosis of the nucleus, and an increase of the perinuclear space. Functionally, ER stress was characterized by a decreased content of BiP/GRP78 in neurons and an increased level of UPR sensors – ATF6, IRE1, PERK.

It was firstly described the state of an enhanced gliosis in VMH of rats on the background of type 2 diabetes mellitus, based on the comparison of ultramicroscopic changes in nervous tissue with an increase in markers of microglia (Iba1) and astroglia (GFAP) as well as a critical decrease in the tight junction protein of astrocytes (ZO-1). It was proposed for the first time the new hypothesis of autophagosome formation from the ER membranes in VMH neurons of rats with T2DM, which reveals the mechanism of the involvement of the ERAD

system for utilization of damaged proteins within ER. It has been shown that the administration of propionate significantly increased the content of autophagy markers LC3 and Beclin-1 in VMH, elevated the number of autophagosomes, that was accompanied by a significant reduction of the area of ER cisterns. It has been suggested that T2DM induced apoptotic neuronal death by the mechanism of mitoptosis activation. It has been shown the T2DM-induced significant decrease in the level of antiapoptotic protein Bcl-x1, an increase in caspase-3 and a marker of mitochondrial damage BAX-dimer levels, that were accompanied by an enlargement of pyknotic nuclei, neuropil edema, and destruction of mitochondria based on ultramicroscopic observations of VMH neurons.

In addition, the concept of destructive changes in rat VMH neurons on the background of T2DM and the molecular explanation of protective effect of the combined administration of metformin and propionate on the state of nervous tissue were proposed for the first time. T2DM caused ER stress in VMH neurons, that was confirmed by the 2-fold reduction of the level of chaperone GRP78, that can be explained by its sequestration into the ER cisterns and following combination with misfolded proteins in order to inactivate them. At the same time, the content of transmembrane UPR sensors ATF6, IRE1, PERK was significantly increased. After administration of metformin and/or propionate, the ATF6- and IRE1-associated pathways were activated by different extent, that led to promotion of the GRP78synthesis, while an increase in PERK level was indicated, inhibiting the folding process within the cell. Combined administration of metformin and propionate in the most effective way restored the content of GRP78 in the cytoplasm, as well as reduced ATF6, IRE1 and PERK levels, thus compensating ER stress.

Practical significance. For the first time, it was demonstrated that the pharmacological correction with metformin and propionate improved the state of VMH neurons in rats with T2DM and compensated ER stress, which may be considered a basis for the further use of these drugs for neuroprotective therapeutic schemes. The positive effect of the combined administration of metformin and

propionate on the state of gliosis in nervous tissue was shown for the first time. It was found a 5-fold increase in the content of microglial marker Iba1 and a critical decrease in the level of the marker of desmosomes ZO-1 on the background of diabetes mellitus. The combination of metformin and propionate reduced the level of Iba1 by 45%, and increased the level of ZO-1. For the first time, the modulating effect of the combined administration of metformin and propionate on the apoptotic processes in VMH neurons in rats with T2DM was discovered. Combined administration of drugs reduced the level of caspase-3 by 4.5 times, increased the expression of Bcl-x1 by 13 times, that altogether resulted in a more pronounced antiapoptotic effect.

For the first time, it has been shown that metformin monotherapy did not prevent the development of encephalopathy in rats with T2DM. After metformin treatment, ultramicroscopic studies revealed an accumulation of lipofuscin, that considered as a sign of cell "aging", an inhibition of the ubiquitin-proteasome protein degradation system and neuronal degeneration. The effect of propionate on the state of VMH neurons in rats with T2DM was investigated for the first time, and it was shown that propionate improved the ultrastructure on neurons, activated the formation of autophagosomes, however, this compound intensified neurogliosis.

Finally, it was shown that the high-fat dietary load (45% fat + 20% fructose) for 3 months, followed by a single injection of streptozotocin (25 mg/kg), caused significant changes in lipid and carbohydrate metabolism in animals, that were similar to those in humans with chronic diabetes mellitus and microvascular complications.

CONCLUSIONS

1. Experimental type 2 diabetes mellitus in rats was induced by high-fat dietary load (45% fat + 20% fructose) for 3 months, followed by a single injection of streptozotocin (25 mg/kg). T2DM led to impairments of lipid and carbohydrate metabolism in animals (hyperglycemia, insulin resistance, obesity, increased content of saturated fatty acids in the liver), that were comparable to those

developed in patients with microvascular complications on the background of chronic diabetes mellitus, which justifies the use of this experimental model to study diabetes-induced nervous tissue dysfunction and its possible correction.

2. Using electron microscopy, it was detected a significant number of apoptotic neurons, neuropil edema and the following changes in the ER of VMH on the background of T2DM: an increase in the relative area of cisterns by 2.25 times ($p = 0.024$) and an enlargement of the perinuclear space by 44% ($p = 0.038$). Administration of drugs reduced the relative area of ER cisterns: metformin – by 36% ($p = 0.046$), propionate – by 3 times ($p = 0.009$), and their combination – by 3.4 times ($p = 0.008$). The overall fraction of ER in the cell was decreased after propionate administration by 66% ($p = 0.03$) and after combination of drugs by 80% ($p = 0.019$).

3. As a functional sign of ER stress in VMH neurons on the background of T2DM was considered a 2-fold decrease in GRP78 level and an increase in the content of the UPR transmembrane proteins – PERK, ATF6, IRE1. Combined administration of metformin and propionate in the most effective manner led to the enhanced transcription of GRP78 mRNA, via activation of ATF6- and IRE1-associated signaling pathways, and effectively reduced PERK level, which restored protein synthesis and promoted the normalization of ER function in neurons.

4. T2DM-associated reliable signs of neurogliosis were found in the VMH area based on increased Iba1 levels by 5.44 times ($p = 0.01$) and decreased content of the desmosome marker ZO-1 by 89% ($p = 0.002$). The level of GFAP protein did not change in the T2DM group vs. control. Propionate administration to rats with T2DM led to the further glial activation, confirmed by an increased level of all markers: Iba1 – by 63% ($p = 0.035$), GFAP – by 3 times ($p < 0.001$) and ZO-1 – almost to control values. Combined administration of metformin and propionate exerted the pronounced positive effect on the state of neuroglia: the level of Iba1 and GFAP was decreased, while the content of ZO-1 was elevated.

5. T2DM did not influence the levels of markers of autophagy in VMH neurons, while the administration of metformin and propionate increased the

content of LC3 and Beclin-1. The maximum level of these proteins was observed after propionate administration: Beclin-1 was increased by 3 times ($p = 0.003$) and LC3 – by 4 times ($p = 0.002$), which corresponded to the ultramicroscopic observations showing an increased number of autophagosomes.

6. It was found that the level of caspase-3 was increased by 4.4 times ($p = 0.001$), BAX-dimer – by 5.7 times ($p = 0.003$), the content of antiapoptotic protein Bcl-xl was reduced by 10 times ($p = 0.002$) on the the background of type 2 diabetes mellitus in VMH. These observations altogether corresponded to the ultramicroscopic findings, where an increase in the number of apoptotically damaged neurons was detected. Combined administration of metformin and propionate reduced the content of caspase-3 by 4.5 times ($p = 0.0001$), the content of BAX – to control values, and increased the expression of Bcl-xl by 16-fold ($p = 0.0005$) compared with diabetes mellitus.

7. The concept explaining the destructive changes in the VMH neurons of rats with type 2 diabetes mellitus and elucidating neuroprotective effect of the combined administration of metformin and propionate on the state of nervous tissue were proposed. T2DM induced ER stress in VMH neurons that manifested in the reduction of the level of chaperone GRP78 by 2 times due to its sequestration into the ER cisterns and a physical interaction with misfolded proteins to inactivate them. The content of transmembrane UPR sensors ATF6, IRE1, PERK was significantly increased. Under the action of metformin or propionate, the ATF6- and IRE1-associated signaling pathways were activated by different extent, which induced the synthesis of GRP78, however, at the same time, an increase in PERK level was observed, that may inhibit protein folding in the cell. Combined administration of metformin and propionate most effectively restored the content of GRP78 in the cytoplasm, reduced ATF6, IRE1, PERK levels, thus, compensating the ER stress.

Key words: neurons, endoplasmic reticulum stress, hypothalamus, glial cells, electron microscopy, brain, diabetes mellitus, propionate, ultramicroscopic studies.

Список публікацій здобувача:

1. Осадчук Ю, Чайковський Ю, Натрус Л, Брюзгіна Т. Особливості зміни жирнокислотного складу тканин при різних моделях експериментального цукрового діабету 1 типу. Медична наука України. 2018;14(3-4):13-22. Available from: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2018.02>.

2. Натрус Л, Осадчук Ю, Лабудзинський Д, Чайковський Ю, Смирнов А. Патогенетичне обґрунтування шляхів моделювання експериментального цукрового діабету 2 типу. Медична наука України. 2019;15(3-4):10-8. Доступно з: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2019.02>.

3. Осадчук Ю, Довгань Р, Вершута О. Відмінності жирнокислотного вмісту тканин печінки та головного мозку щурів в експериментальній моделі цукрового діабету 2 типу. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2020;115(1):37-46. Доступно з: [https://doi.org/10.32345/USMYJ.1\(115\).2020.37-46](https://doi.org/10.32345/USMYJ.1(115).2020.37-46).

4. Natrus L, Osadchuk Y, Lisakovska OO, Labudzynskyi DO, Yulia GK, Chaikovsky YB. Effect of propionic acid on diabetes-induced impairment of unfolded protein response signaling and astrocyte/microglia crosstalk in rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Neural Plast*. 2022;2022:6404964. doi: 10.1155/2022/6404964.

5. Натрус ЛВ, Рижко ІМ, Черновол ПА, Брюзгіна ТС. винахідник. Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України власник. Спосіб оцінки механізмів ушкодження тканин при експериментальному цукровому діабеті 1-го типу у щурів. Патент 125810 UA, МПК G01N 33/49 (2006.01) B01D15/08 (2006.01). 2018 Берз 12.

6. Osadchuk Y, Lisakovska O, Shanchuk M, Shulha N, Labudzynskyi D, Chaikovsky Y. Propionate-induced activation of autophagy in ventromedial hypothalamic neurons of rats with type 2 diabetes mellitus. In: The 34th ECNP Congress Hybrid; 2021 Oct 2-5; Lisbon, Portugal. European

neuropsychopharmacology; 2021 Dec;53(Suppl.1):S176-7. Available from: doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.233.

7. Shanchuk M, Lisakovska O, Osadchuk Y, Shulha N, Natrus L. Effect of propionic acid on diabetes-induced impairment of unfolded protein response signaling in rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. In: The 34th ECNP Congress Hybrid; 2021 Oct 2-5; Lisbon, Portugal. European neuropsychopharmacology; 2021;53(Suppl.1):S187-8. doi 10.1016/j.euroneuro.2021.10.247.

8. Shulha N, Lisakovska O, Osadchuk Y, Shanchuk M, Natrus L. Protective effect of propionic acid on impairments of astrocyte-microglia crosstalk in ventromedial hypothalamus of rats with type 2 diabetes mellitus. In: The 34th ECNP Congress Hybrid; 2021 Oct 2-5; Lisbon, Portugal. European neuropsychopharmacology; 2021;53(Suppl.1):S186-7. doi:10.1016/j.euroneuro.2021.10.246.

9. Шульга НВ, Лісаковська ОО, Осадчук ЮС. Нейропротекторна дія пропіонової кислоти за умов порушення функціонування астроцитарного та мікрогліального пулів вентромедіального ядра гіпоталамуса у щурів з цукровим діабетом 2 типу. Annual Young Medical Scientists` Conference 2021; 2021 Лист 25-26; Київ, Україна.

10. Шанчук МО, Клись ЮГ, Осадчук ЮС. Фармакологічна корекція функціональних змін ендоплазматичного ретикулуму нейронів вентромедіального ядра гіпоталамуса на тлі розвитку цукрового діабету 2 типу у щурів. Annual Young Medical Scientists` Conference 2021; 2021 Лист 25-26; Київ, Україна.

11. Osadchuk YS, Chaikovsky YB, Cryvosheyeva OI, Natrus AS. Ultrastructural changes of endoplasmic reticulum in the hypothalamus of rats with T2DM after drugs administration. 42 Наукові читання імені О.О. Богомольця: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 140-річчю з дня народження академіка О.О. Богомольця; 2021; Kiev, Ukraine.

ЗМІСТ

НАЗВА РОЗДІЛУ (підрозділу, пункту)	Стор
АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП	27
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ШЛЯХИ ВИВЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ГОМЕОСТАЗУ НЕЙРОНІВ ГІПОТАЛАМУСУ ЗА УМОВ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО НАПРУЖЕННЯ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВПЛИВІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	37
1.1. Роль медіо-базального гіпоталамуса в розвитку та прогресуванні ожиріння, метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу	37
1.2. Регуляторні сигнальні шляхи та каскади, що активуються за умов стресу ендоплазматичного ретикулула	40
1.3. Аутофагія нейронів – як важливий адаптаційний механізм запобігання загибелі нейронів шляхом апоптозу	44
1.4. Роль вивчення нейроглії у патогенезі запалення нервової тканини	47
1.5. Пропіонова кислота – як потенційний засіб для нейропротекції	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	54
2.1. Відтворювання моделі ЦД2 та фармакологічна корекція стану	55
2.2. Оцінка біохімічних показників крові та вмісту жирних кислот в тканині	57
2.3. Дослідження за допомогою електронної мікроскопії	59
2.4. Імуногістохімічні дослідження	61
2.5. Виділення РНК, синтез кДНК та ПЛР-аналіз у реальному часі	63
2.6. Дослідження тканинних протеїнів методом Вестерн-блот аналізу	64
2.7. Статистичний аналіз	66
РОЗДІЛ 3. ШЛЯХИ ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ЦД2 НА ЩУРАХ ТА ОЦІНКА ЇЇ АДЕКВАТНОСТІ	67

РОЗДІЛ 4. СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ НЕЙРОНІВ ВЕНТРОМЕДІАЛЬНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ІЗ ЦД2 ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ	83
4.1. Ультроструктурні зміни ER у VMH щурів на тлі ЦД2 і після введення метформіну та пропіонату	83
4.2. Кількісні показники ультроструктурних змін ER у HVM щурів з ЦД2 після введення метформіну та пропіонату	89
РОЗДІЛ 5. ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ ТА UPR-СИСТЕМИ НЕЙРОНІВ HVM ЩУРІВ ІЗ ЦД2 ТА ЗА УМОВ ЙОГО КОРЕКЦІЇ	92
5.1. Імуногістохімічна оцінка експресії GRP78 у VMH	93
5.2. Кількісна оцінка маркерів стану UPR-системи	98
РОЗДІЛ 6. МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ МАРКЕРИ СТАНУ ГЛІЇ В ЗОНІ VMH ДЛЯ ОЦІНКИ НЕЙРОЗАПАЛЕННЯ НА ТЛІ ЦД2 ТА ЗА УМОВ ЙОГО КОРЕКЦІЇ	104
6.1. Імуногістохімічна оцінка вмісту Iba1 у VMH	105
6.2. Кількісна оцінка маркерів гліальної активності в зоні HVM на тлі ЦД2 та за умов його корекції	109
РОЗДІЛ 7. ФУНКЦІОНАЛЬНІ МАРКЕРИ АКТИВАЦІЇ АУТОФАГІЇ ТА АПОПТОЗУ НЕЙРОНІВ HVM ЩУРІВ ІЗ ЦД2 ТА ЗА УМОВ ЙОГО КОРЕКЦІЇ	113
7.1. Вивчення маркерів аутофагії в нейронах HVM на тлі ЦД2 та за умов його корекції	114
7.2. Вивчення маркерів апоптозу в нейронах HVM на тлі ЦД2 та за умов його корекції	121
Розділ 8. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	138
ВИСНОВКИ	152
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

СКОРОЧЕННЯ

РОЗШИФРОВКА СКОРОЧЕННЯ

Allox – аллоксан

ARK – аркуатне ядро гіпоталамусу

ATF6 (англ, activating transcription factor 6) – трансмембранний протеїн

BAX – регуляторний протеїн

Bim, Bik, Bak, – сімейство регуляторних протеїнів з доменом BH

Bcl_xl – регуляторний протеїн

Beclin-1 – регуляторний протеїн

BiP/GRP78 – шаперон ER

Caspase-3 – Каспаза-3 регуляторний протеїн

ECL - електрохемілюмінесценції

eIF2 α – еукаріотичний фактор ініціації 2 α

ERAD-система (англ, Endoplasmic-Reticulum-Associated protein degradation)

GFAP (англ, Glial Fibrillary Acidic Protein) – маркер астроцитів

HbA1 - глікозильований гемоглобін

HFD (англ, High Fat Diet) – високо жирова дієта

Iba-1 – маркер мікроглії

IRE1 (англ, Inositol-Requiring Enzyme-1) – регуляторний протеїн

L-FABP – регуляторний протеїн

LC3 – регуляторний протеїн

LHA – латеральне ядро гіпоталамусу

PERK (англ, PKR-like endoplasmic reticulum kinase) – регуляторний протеїн

PFA - параформальдегід

RER – гранулярний домен ендоплазматичного ретикулуму з рибосомами

SER – гладкий домен ендоплазматичного ретикулуму

STZ - стрептозотоцин

UPR (англ, Unfolded Protein Response) –відгук неструктурованих протеїнів

VMH – вентромедіальне ядро гіпоталамусу

ZO-1 (англ., Zonula Occludens-1) – маркер десмосом астроцитів

АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активні форми кисню
ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр
ДНК – дизооксирибонуклеїнова кислота
ЕГК клемп-тест (клемп-тест) – еуглікемічний гіперінсулінемічний тест
ЖК – жирні кислоти
ІР – інсулінорезистентність
ІГХ – імуногістохімія
КГ – контрольна група
кДНК – комплементарна ДНК
ЛПВЩ - ліпопротеїди високої щільності
ЛПНЩ - ліпопротеїди низької щільності
мРНК – матрична РНК
МС – метаболічний синдром
Мет – метформін
НЖК – насичені жирні кислоти
ННЖК – ненасичені жирні кислоти
ПЛР- Полімеразна ланцюгова реакція
ПНЖК - поліненасичені жирні кислоти
ПрК – пропіонова кислота
Проп – пропіонат, сіль пропіонової кислоти
СОП – стандарт операційних процедур
ЦД – цукровий діабет
ЦД2 – цукровий діабет 2 типу
ЦНС - Центральна нервова система
ЕР (ER) - ендоплазматичний ретикулум
ІТТ – тест толерантності до інсуліну

ВСТУП

Актуальність теми

Під час життєдіяльності в організмі постійно відбувається коливання гомеостатичних констант у вузьких фізіологічних межах, але при цьому, підтримка гомеостазу забезпечує вільне і незалежне від зовнішніх умов існування організму. Стійке відхилення якого-небудь гомеостатичного показника спричиняє розвиток захворювання. В більшості випадків, навіть найсучасніші терапевтичні розробки і схеми лікування, які направлені на відновлення зміненого гомеостатичного показника, не призводять до відновлення фізіологічного балансу. Тому проблема лікування величезної кількості захворювань, перш за все гіпоталамічного, метаболічного синдромів, вегетативних порушень, що супроводжуються стійким та тривалим відхиленням гомеостатичних констант, є надто актуальною.

Метаболічний синдром (МС) - це комплекс гомеостатичних зсувів патогенетично взаємопов'язаних через інсулінорезистентність зі зниженням толерантності до глюкози, дисліпідемією, артеріальною гіпертензією на фоні абдомінального ожиріння. Дослідники характеризують основну клінічну ознаку МС - абдомінальне ожиріння як пандемію ХХІ сторіччя, поширеність якого в світі становить 25-40%. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, понад 1 мільярд людей у всьому світі страждають від надмірної ваги або ожиріння [15, 34, 54, 104]. Було встановлено складний багатофакторний взаємозв'язок між ожирінням, МС та цукровим діабетом 2 типу (ЦД2), що полягає у сукупності пов'язаних патофізіологічних механізмів. Стан інсулінорезистентності, який є загальним зв'язком між ожирінням та МС, призводить до порушень метаболізму глюкози, дисліпідемії, високого кров'яного тиску, дисфункції ендотелію тощо [112]. Докладено значних зусиль для виявлення клітинних та молекулярних патогенетичних механізмів, що лежать в основі МС/ЦД2. Однак вони виявились складними, все ще обговорюються і залишаються повністю не дослідженими.

Більше того, сучасні профілактичні та терапевтичні варіанти корекції МС/ЦД2 в основному включають різноманітні харчові рекомендації та регулярні фізичні вправи, а також обмежуються окремим лікуванням таких симптомів, як гіпертонія, гіперглікемія та гіпертригліцеридемія, але в результаті не призводять до компенсації зсувів і одужанню. Так, нами були досліджена роль екзогенних впливів у вигляді вживання в їжу жирних кислот (ЖК), що викликає у пацієнтів зміни у вигляді МС та ЦД2 [122]. Ми прийшли висновку про відсутність прямої залежності між аліментарним вживанням продуктів-джерел ЖК і розвитком діабету, водночас виявили зв'язок експресії внутрішньоклітинного регуляторного протеїну L-FABP із перерозподілом вмісту ЖК у мембранах еритроцитів, як важливої ознаки ЦД2, що надає підставу вважати ендogenous клітинні механізми основою глибокого порушення ліпідного гомеостазу.

Центром регуляції обміну речовин організму є гіпоталамус. Хоча сьогодні визнано, що нейрорегуляторна мережа, яка контролює харчову поведінку, чутливість до периферичного інсуліну та метаболізму глюкози, і т.п., виходить за рамки медіо-базального гіпоталамусу і до нього приєднуються інші гіпоталамічні ядра, відділи заднього гіпоталамусу, вегетативні, парасимпатичні та симпатичні передгангліонарні нейрони мозку; головними структурами які визначають центральні механізми регуляції рівня глюкози та ліпідів для забезпечення енергетичного балансу відповідно потреб організму є нейрони: вентромедіального (VMH), латерального (LHA) та аркуатного (ARK) ядер [145]. Дизрегуляція функцій ядер гіпоталамусу може бути одним із основних механізмів порушення метаболізму глюкози та розвитку ЦД2 і пов'язана з існуванням запалення нервової тканини низького ступеня, що виникає в області гіпоталамічних ядер та порушенням нейрогенезу [35, 137, 145, 156].

Однією з причин порушення центральних механізмів, що підтримують гомеостаз, є зміна функціональних властивостей нейронів відповідних відділів гіпоталамусу. Використовуючи електрофізіологічний підхід, [80]

аналізували реакцію поодиноких нейронів переднього гіпоталамусу та преоптичної ділянки на термо-, пресо-, осмо- та глюкостимуляцію і виявили, що лише 19% нейронів досліджуваних структур є моносенсорними. А більшість (81%) нейронів є полісенсорними, тобто чутливими одночасно до коливання поєднаних вісцеральних стимулів, їх комбінації. Існування полісенсорних нейронів автори пояснювали відсутністю в організмі ізольованої зміни якогось одного гомеостатичного параметра, і тим фактом, що коливання будь-якої константи гомеостазу обов'язково пов'язано із зміною інших гомеостатичних параметрів [80]. Однак ця складна функціональна організація нейронів переднього гіпоталамусу поєднується з морфологічною однорідністю нейронів, що утворюють регуляторні центри. Тому можна припустити, що всі гомеостатичні зсуви, включаючи комбінацію гіперліпідемії та гіперглікемії, забезпечуються в нейронах гіпоталамусу на молекулярному рівні, впливаючи на регуляторні сигнальні шляхи та каскади, які формують внутрішньоклітинний гомеостаз, що і потребує подальшого вивчення.

При вивченні функціональних порушень гіпоталамічних нейронів, значна увага приділяється дослідженню сигнальних нейропептидів. Гормон лептин, який виробляється жировою тканиною, діє як аферентний сигнал до мозку, зокрема, до гіпоталамусу, де він координує енергетичний гомеостаз шляхом модуляції споживання їжі та витрат енергії [131]. Однією з патогенетичних причин розвитку ожиріння при МС є виникнення резистентності гіпоталамічних нейронів до лептину [35, 56, 72, 95, 96, 137]. В даний час існують три гіпотези, що пояснюють цей стан: зменшення транспортування лептину до мозку; порушення акцепції лептину таргетними нейронами - лептинорезистентність; дефектна ефекторна сигналізація в клітинах і нейронних ланцюгах.

Нейробиологічна основа лептинорезистентності залишається остаточно нез'ясованою і розглядається гіпотеза, яка визначає шляхи формування стану: запалення у ділянках гіпоталамічних ядер; порушення аутофагії

нейронів; стрес ендоплазматичного ретикулула (ER) [36, 49, 57, 76, 125,152], якій активує сигнальну систему у вигляді відгуку неструктурованих протеїнів (UPR) [25, 42, 138]. Тому, наше дослідження було присвячено вивченню структурних змін ER в нейронах VMH, процесу аутофагії, системі UPR та ERAD і пов'язаним з дисбалансом внутрішньоклітинного гомеостазу – апоптозом нейронів на тлі експериментального ЦД2 щурів та варіантах фармакологічної корекції.

Для корекції порушень в нервовій тканині, викликаних ЦД2, ми обрали метформін та пропіонат, який є призначається у якості дієтичної добавки пацієнтам із нейродегенеративними (аутоімунними) захворюваннями [24, 64, 94, 144]. Недоліки монотерапії метформіном обговорюються вже давно, але все ж таки він залишається найпопулярним препаратом зниження гіперглікемії [47, 54, 110, 129, 163]. Механізм впливу пропіонату на нейрони не відомий і активно вивчається. Вважається, що пропіонат, при надходженні у кишечник, стимулює імунні клітини, зокрема Т-лімфоцити стінки кишечника, викликає синтез нейромедіаторів, цитокінів, гормонів, які акцептуються нейроглією, що пригнічує демієлінізацію і опосередковано впливає на властивості нейронів [12, 14, 20, 22, 45, 58, 144, 158, 165].

Вивчення структурно-функціональних змін в гіпоталамічних нейронах є шляхом до розуміння тонких клітинних механізмів розвитку захворювання та безсумнівно дадуть корисну інформацію про потенційне використання ліків, спрямованих на компенсацію виявлених змін для лікування усіх клінічних проявів МС та ЦД2.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є фрагментом держбюджетної НДР на замовлення МОЗ України «Структурно-функціональні зміни нейронів медіо-базального гіпоталамусу при порушенні вуглеводного і ліпідного обміну» (№ держреєстрації 0119U101229, строк виконання 2019-2021), яка виконувалася на базі Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О.Богомольця, а також міжнародного

німецько-українського гранта The Federal Ministry of Education and Research finances (Funding code: 01DK20008)

Мета дослідження: вивчення морфо-функціональних змін нейронів та нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамуса за умов експериментального цукрового діабету 2 типу і його корекції. Для досягнення мети були вирішені наступні задачі:

1. Визначити найбільш ефективний шлях відтворення експериментальної моделі ЦД2 на щурах через вивчення біохімічних показників та спектру жирних кислот в тканинах тварин.
2. Дослідити ультраструктурні зміни нейронів та нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамуса (VMH) щурів із ЦД2 та за умов його корекції.
3. Вивчити функціональний стан ендоплазматичного ретикулулу нейронів VMH щурів із ЦД2 та за умов його корекції шляхом дослідження показників UPR-системи (протеїнів GRP78; PERK; ATF6; IRE-1).
4. Дослідити морфо-функціональні маркери нейроглії (Iba-1; GFAP ZO-1) в зоні VMH на тлі ЦД2 та за умов його корекції.
5. Вивчити морфо-функціональні маркери аутофагії (LC3; Beclin-1) й апоптозу (Bcl_xl; BAX; Caspase-3) в зоні VMH щурів із ЦД2 та за умов його корекції.
6. Сформувати концепцію фармакологічного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нейронів і нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамуса для подальшої перспективи використання вказаних препаратів на тлі ЦД2.

Об'єкт дослідження: зміни нейронів та нейроглії вентромедіального ядра гіпоталамуса щурів на тлі експериментально відтвореного ЦД2 та корекції метформіном, пропіонатом та їх комбінованого введення.

Предмет дослідження: морфометричні ультрамікроскопічні параметри нейронів; вміст у нервовій тканині протеїнів GRP78; Iba-1; Beclin-1; Bcl_xl; BAX; Caspase-3 та їх розподіл в тканині; ступінь експресії протеїнів GRP78;

PERK; ATF6; IRE-1; ZO-1; Iba-1; GFAP; LC3; Beclin-1; Bcl_xl; BAX; Caspase-3; біохімічні показники вуглеводного та ліпідного обміну в організмі щурів.

Методи дослідження: електронномікроскопічні дослідження із морфометричним розрахунком параметрів структур; імуногістохімічні дослідження; Вестерн-блот аналіз; ПЛР-реал тайм – вимірювання мРНК генів; біохімічні; газово-рідинна хроматографія; статистичний.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше вивчені морфологічні та функціональні ознаки стресу ЕР в нейронах VMH щурів на тлі експериментального ЦД2. Виявлено, що морфологічними ознаками стресу ЕР в нейронах на тлі ЦД2 є розширення цистерн, пікноз ядра, збільшення перинуклеарного простору тощо. Функціонально стрес ЕР характеризується зниженням в нейронах вмісту шаперону BiP/GRP78 та підвищенням вмісту UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK.

Вперше описаний стан нейрогліозу у VMH щурів на тлі ЦД2, через співставлення ультрамікроскопічних змін в нервовій тканині із підвищенням маркерів мікроглії Iba-1, астроглії GFAP і критичним зниженням маркера десмосом астроцитів ZO-1. Вперше висловлена гіпотеза про утворення аутофагосом в нейронах VMH щурів тлі ЦД2 із мембрани ЕР, що розкриває механізм реалізації ERAD-системи – утилізації пошкоджених протеїнів в межах ЕР (англ., Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation). Продемонстровано, що при введенні пропіонату суттєво підвищується вміст в нервовій тканині маркерів аутофагії LC3 та Beclin-1, збільшується кількість аутофагосом, що супроводжується суттєвим зменшенням площі цистерн ЕР.

Вперше висловлене припущення, що моделювання ЦД2 індукувало апоптотичну загибель нейронів через активацію мітоптозу. На тлі ЦД2 виявлене критичне зниження вмісту протиапоптотичного протеїну Bcl-xl, підвищення Caspase-3 та маркеру пошкодження мітохондрій BAX-димеру, що за даними ультрамікроскопічних змін нейронів VMH супроводжується

збільшенням пікнотичних ядер, набряком нейропілю, набряком та деструкцією мітохондрій.

Вперше сформована концепція змін нейронів VMH щурів на тлі ЦД2 та протективного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нервової тканини. На тлі ЦД2 в нейронах VMH виникає стрес ER: рівень шаперону GRP78 зменшується в 2 рази, оскільки він секвеструється в цистерну ER та поєднується із місфолдінговими протеїнами для їх інактивації. Вміст трансмембранних UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK значно підвищується. Під дією метформіну або пропіонату шляхи ATF6, IRE1 активуються різною мірою, що сприяє синтезу GRP78, але зберігається підвищення PERK, який гальмує фолдінг в клітині. Комбіноване введення найбільш ефективно відновлює вміст в цитоплазмі GRP78, зменшує ATF6, IRE1, PERK і сприяє компенсації стресу ER.

Практичне значення отриманих результатів. Вперше доведено, що фармакологічна корекція метформіном у поєднанні із пропіонатом покращує стан нейронів VMH у щурів із ЦД2 й викликає компенсацію стресу ER, що може бути підґрунтям для подальшої перспективи використання вказаних препаратів і розробки схем нейропротекції. Вперше показаний ефективний вплив комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан гліюзу в нервовій тканини. Виявлено, що на тлі ЦД2 виникало 5-кратне підвищення показника мікроглії Iba1 та критичне зменшення маркера десмосом ZO-1. Поєднання препаратів знижувало рівень Iba1 на 45%, і підвищувало рівень ZO-1. Вперше показаний ефективний вплив комбінованого введення метформіну з пропіонатом на процеси апоптозу в нейронах VMH у щурів із ЦД2. Введення препаратів в 4,5 рази зменшувало рівень Caspase-3, в 13 разів підвищувало експресію Bcl-x1, що демонструвало більш ефективний антиапоптотичний механізм.

Вперше доведено, що монотерапія метформіном не запобігає виникненню енцефалопатії у щурів із ЦД2. На тлі лікування метформіном за допомогою ультрамікроскопічних досліджень виявили накопичення

ліпофусцину, що є ознакою «старіння» клітини, пригнічення убіквілін-протеосомної системи та дегенерації нейронів. Вперше вивчений вплив пропіонату на стан нейронів VMH у щурів із ЦД2. Введення пропіонату поліпшує ультраструктуру, активує утворення аутофагосом, але при цьому максимально підсилює нейрогліоз.

Вперше показано, що харчове навантаження у складі високо-жирової дієти (45% жиру)+фруктоза протягом 3 місяців із подальшою однократною індукцією стрептозотоцином (25 мг/кг), викликає зміни ліпідного та вуглеводного метаболізму в організмі тварин співставні із аналогічними змінами в організмі людини із тривалим ЦД2 і розвинутими мікросудинними ускладненнями.

Впровадження.

Отримані результати були успішно впроваджені в навчальний процес на кафедрі патофізіології НМУ імені О.О. Богомольця, кафедрі гістології та ембріології НМУ імені О.О. Богомольця, кафедрі нормальної та патологічної фізіології Державного закладу «Луганський державний медичний університет». Наукові положення дисертації впроваджені в науково-дослідний процес Відділу хімії ензимів та біохімії Інституту біохімії ім. Палладіна НАН України.

Особистий внесок здобувача.

Дисертація є особистою науковою роботою здобувача. Вибір теми дисертації, напрямок дослідження, формулювання завдань, методологія роботи, а також висновки сформульовані спільно з науковим керівником член-кор. НАН України, проф. Чайковським Ю.Б. В

Здобувачкою особисто проведений аналіз літератури з проблеми та організовано експериментальне дослідження. Дисертанткою самостійно виконано відтворення на тваринній моделі експериментального ЦД2 шляхом харчового навантаження протягом 3 місяців, виконані усі біохімічні тести. Здобувачка самостійно за допомогою програми ImageJ виконала морфометричний аналіз структур нейронів за даними електронограм, при

цьому висловлює щирю вдячність за допомогу у виконанні досліджень електронної мікроскопії професору, д.мед.н. Стеченко Л.О., та молодшому н/співробітнику Кривошеєвій О.І. Дисертантка провела опис даних отриманих за допомогою ПГХ, але також висловлює щирю вдячність за допомогу в цьому професору, д.мед.н. Грабовому О.М. Авторка роботи опанувала методики Вестерн-блот дослідження протеїнів та самостійно виконала вказаний фрагмент, при цьому висловлює вдячність за допомогу в роботі над фрагментом д.мед.н. Тихомирову А.О., та к.біол.н. Лісаковський О.О. Дисертантка самостійно провела молекулярно-біологічні дослідження для вимірювання мРНК шляхом ПЛР-реал тайм і визначила експресію генів, але висловлює вдячність за консультації завідувачці лабораторії, к.біол.н. Клись Ю.Г. Авторка також висловлюють подяку професору Ніні Бабель (Центр трансплантаційної медицини та лабораторії імунної діагностики, із Університетська лікарня Рурського університету Бохум, Німеччина) за надану натрієву сіль пропіонової кислоти та поради щодо дозування.

Дисертанткою самостійно проведено статистичну обробку отриманих даних, написані розділи дисертації, інтерпретація, аналіз та узагальнення результатів. У наукових працях, опублікованих за матеріалами дисертації із співавторами, здобувачці належала провідна роль у формулюванні мети, завдань, методології дослідження та описі результатів. Дисертанткою підготовлені виступи на наукових форумах, опубліковані наукові роботи, самостійно оформлена дисертаційна робота.

Апробація результатів дисертації.

Результати досліджень, що висвітлені в дисертації були докладені у 6 доповідях: 3 доповіді (стендові, офф-лайн), на 34th ECNP Congress 2021, European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), 2-5 жовтня 2021 р. Лісабон. 1 доповідь на Наукових читаннях імені О.О. Богомольця: науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвячене 140-річчю з дня народження академіка О.О. Богомольця (24 травня 2021 р., Київ), та 2

доповіді на Науковій конференції «Annual Young Medical Scientists' Conference (AYMS Conf) – 2021», НМУ імені О.О.Богомольця, 2021.

Публікації

За темою дисертаційного дослідження опубліковано в 11 наукових роботах, з яких 1 стаття у журналі, який відноситься до першого квартілю бази SCOPUS відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, 3 статті в журналах включених до переліку наукових фахових видань України з присвоєнням категорії «Б» з наукового напрямку у фахових виданнях рекомендованих МОН України, 1 патенті і 6 тезах доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою, на 175 сторінках друкарського тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 5-х розділів власних досліджень, в т.ч. розділу обговорення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел. Робота ілюстрована 5 таблицями і 55 рисунками. Список літератури займає 22 сторінок та включає 181 джерело (170 латиницею та 11 кирилицею).

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ШЛЯХИ ВИВЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ГОМЕОСТАЗУ НЕЙРОНІВ ГІПОТАЛАМУСУ ЗА УМОВ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО НАПРУЖЕННЯ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВПЛИВІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Роль медіо-базального гіпоталамуса в розвитку та прогресуванні ожиріння, метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу

Під час життєдіяльності в організмі постійно відбувається коливання гомеостатичних констант у фізіологічних межах, але при цьому, підтримка гомеостазу забезпечує вільне і незалежне від зовнішніх умов існування організму. Стійке відхилення будь-якого гомеостатичного показника спричиняє розвиток захворювання. В більшості випадків, навіть найсучасніші терапевтичні розробки і схеми лікування, що направлені на відновлення зміненого гомеостатичного показника, не призводять до відновлення фізіологічного балансу. Тому проблема лікування величезної кількості захворювань, перш за все гіпоталамічного, метаболічного синдромів, вегетативних порушень, що супроводжуються стійким та тривалим відхиленням гомеостатичних констант, є надто актуальною.

Метаболічний синдром (МС) - це комплекс гомеостатичних зсувів патогенетично взаємопов'язаних через інсулінорезистентність зі зниженням толерантності до глюкози, дисліпідемією, артеріальною гіпертензією на фоні абдомінального ожиріння. Дослідники характеризують основну клінічну ознаку МС - абдомінальне ожиріння як пандемію ХХІ сторіччя, поширеність якого в світі становить 25-40%. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, понад 1 мільярд людей у всьому світі страждають від надмірної ваги або ожиріння [15, 34, 54, 104]. В останні роки було встановлено

складний багатофакторний взаємозв'язок між ожирінням, МС та цукровим діабетом 2 типу (ЦД2), що полягає у сукупності пов'язаних патофізіологічних механізмів. Стан інсулінорезистентності, який є загальним зв'язком між ожирінням та МС, призводить до порушень метаболізму глюкози, дисліпідемії, високого кров'яного тиску, дисфункції ендотелію та інших захворювань, яким притаманна підвищена активність запальних цитокінів [15, 112]. За останні роки було докладено значних зусиль для виявлення клітинних і молекулярних патогенетичних механізмів, що лежать в основі МС/ЦД2. Однак вони виявились складними, все ще обговорюються і залишаються повністю не дослідженими [31, 139].

Більше того, сучасні профілактичні та терапевтичні варіанти корекції МС/ЦД2 в основному включають різноманітні харчові рекомендації та регулярні фізичні вправи, а також обмежуються окремим лікуванням таких симптомів, як гіпертонія, гіперглікемія та гіпертригліцеридемія, але в результаті не призводять до компенсації зсувів і одужанню [17, 27, 41, 88, 153]. Так, нами була досліджена роль екзогенних впливів у вигляді вживання в їжу жирних кислот (ЖК), що викликає у пацієнтів зміни у вигляді МС та ЦД2 [122]. Ми прийшли висновку про відсутність прямої залежності між аліментарним вживанням продуктів-джерел ЖК і розвитком діабету, водночас виявили зв'язок експресії внутрішньоклітинного регуляторного протеїну L-FABP із перерозподілом вмісту ЖК у мембранах еритроцитів, як важливої ознаки ЦД2, що надає підставу вважати ендогенні клітинні механізми основою глибокого порушення ліпідного гомеостазу [146].

Центром регуляції обміну речовин організму є гіпоталамус [21, 30, 133, 175]. Хоча сьогодні визнано, що нейрорегуляторна мережа, яка контролює харчову поведінку, чутливість до периферичного інсуліну та метаболізму глюкози, і т.п., виходить за рамки медіо-базального гіпоталамусу і до нього приєднуються інші гіпоталамічні ядра, відділи заднього гіпоталамусу, вегетативні, парасимпатичні та симпатичні передгангліонарні нейрони мозку; головними структурами які визначають центральні механізми регуляції рівня

глюкози та ліпідів для забезпечення енергетичного балансу відповідно потреб організму є нейрони: вентромедіального (VMH), латерального (LHA) та аркуатного (ARK) ядер [21, 32, 153]. Дизрегуляція функції ядер гіпоталамуса може бути одним із основних механізмів порушення метаболізму глюкози та розвитку ЦД2 і пов'язана з існуванням запалення низького ступеня, що розповсюджується на гіпоталамус та порушенням нейрогенезу. [35, 50, 56, 62, 137].

Однією з причин порушення центральних механізмів, що підтримують гомеостаз, є зміна функціональних властивостей нейронів відповідних відділів гіпоталамусу. Використовуючи електрофізіологічний підхід, [80, 123] аналізували реакцію поодиноких нейронів переднього гіпоталамусу та преоптичної ділянки на термо-, пресо-, осмо- та глюкостимуляцію і виявили, що лише 19% нейронів досліджуваних структур є моносенсорними. А більшість (81%) нейронів є полісенсорними, тобто чутливими одночасно до коливання поєднаних вісцеральних стимулів, їх комбінації. Існування полісенсорних нейронів автори пояснювали відсутністю в організмі ізольованої зміни якогось одного гомеостатичного параметра, і тим фактом, що коливання будь-якої константи гомеостазу обов'язково пов'язано із зміною інших гомеостатичних параметрів [80]. Однак ця складна функціональна організація нейронів переднього гіпоталамусу поєднується з морфологічною однорідністю нейронів, що утворюють регуляторні центри [180]. Тому можна припустити, що всі гомеостатичні зсуви, включаючи комбінацію гіперліпідемії та гіперглікемії, забезпечуються в нейронах гіпоталамусу на молекулярному рівні, впливаючи на регуляторні сигнальні шляхи та каскади, які формують внутрішньоклітинний гомеостаз, що і потребує подальшого вивчення.

При вивченні функціональних порушень гіпоталамічних нейронів, значна увага приділяється дослідженню сигнальних нейропептидів [180]. Гормон лептин, який виробляється жировою тканиною, діє як аферентний сигнал до мозку, зокрема, до гіпоталамусу, де він координує енергетичний

гомеостаз шляхом модуляції споживання їжі та витрат енергії [35, 56, 72, 95, 96, 131, 137]. Однією з патогенетичних причин розвитку ожиріння при МС є виникнення резистентності гіпоталамічних нейронів до лептину [141]. В даний час існують три гіпотези, що пояснюють цей стан: зменшення транспортування лептину до мозку; порушення акцепції лептину таргетними нейронами - лептінорезистентність; дефектна ефекторна сигналізація в клітинах і нейронних ланцюгах.

1.2. Регуляторні сигнальні шляхи та каскади, що активуються за умов стресу ендоплазматичного ретикулума

Нейробиологічна основа резистентності нейронів гіпоталамусу до лептину залишається невизначеною і причину її виникнення пропоновано розглядати у наступних напрямках: запалення нервової тканини у області гіпоталамусу; порушення аутофагії нейронів; стрес ендоплазматичного ретикулума (ER) [28, 76], який активує сигнальну систему у вигляді відгуку неструктурованих протеїнів (UPR) [42, 49, 57, 76, 125, 152]. Слід також підкреслити особливе значення ER-реакційних молекул у біосинтезі інсуліну, гліконеогенезі, резистентності до інсуліну, непереносимості глюкози та їхньому впливі на функції гіпоталамусу [169].

ER є динамічною органелою, в гранулярній частині якого відбувається «фолдинг» - синтез, складання у вторинні та третинні структури переважної більшості секреторних та трансмембранних білків. В ході синтезу нової молекули протеїну, в цистерні ER, білки складаються в свої унікальні тривимірні форми. Саме тут, вони одночасно зазнають різні посттрансляційні модифікації, включаючи гліколізування і формування дисульфідних зв'язків [69]. Ці процеси в ER регулюються (каталізуються) важливими комплексами сигнальних молекул, шляхів, зокрема мережею шаперонів, гліколізуючих ферментів, оксидоредуктаз, які і забезпечують досконалий

механізм згортання і модифікації білків, що потрібні клітині. Іонне і електронне середовище ER оптимально підходить для відтворення системи регуляції та механізмів швидкого і ефективного згортання білків у кінцеві структури, оскільки у порівнянні з цитозолем, ER має набагато більш високу концентрацію кальцію і високий окислювально-відновний потенціал [130, 176]. Стабільність та дозрівання нейропептидів забезпечуються ключовими спеціалізованими ферментами - шаперонами [25] та механізмами «контролю якості продукції», завдяки яким деформовані білки в цитозолі підлягають протеосомній деградації [140].

Незважаючи на це, суттєві та тривалі навантаження на клітину можуть змінювати гомеостаз ER, що призводить до накопичення невірно зібраних білків, що стають для клітини потенційно токсичними та функціонального перенавантаження, який характеризується як – стрес ER [39, 93, 142, 143, 177,].

За цих умов, клітина активує набір філогенетично консервативних сигнальних шляхів, що реагують на стрес, так звану систему UPR (англ. Unfolded Protein Response) реакція білків на порушення фолдингу «місфолдинг», головна задача якої встановити зсув внутрішньоклітинного гомеостазу та повернути клітину до подальшої адекватної продукції протеїнів, таким чином, адаптувавши її до змінених умов [26, 166]. UPR опосередковуються трьома ER-трансмембранними медіаторами-датчиками: IRE-1 (inositol-requiring enzyme-1), PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), та ATF6 (activating transcription factor 6), які у великій кількості знаходяться в ER та в ненапружених умовах зв'язані із шапероном BiP/GRP7 [136].

Вважається, що харчування з високим вмістом жирів викликає резистентність до лептину і стрес ER в нейронах, оскільки надлишок ліпідів призводить до зміни енергетичного обміну і неминуче викликає пошкодження синтезу протеїнів [76]. Значна кількість досліджень показала, що нейрони гіпоталамусу здатні відчувати циркуляцію жирних кислот (ЖК),

а структури ЦНС є ключовим механізмом регулювання енергетичного балансу організму [21, 88, 108, 153]. Отже, вірогідно, ліпотоксичність впливає на гіпоталамічні нейрони, в яких виникає стрес ER, що згодом призводить до початку розвитку ожиріння [91, 138]. Дослідження гіпоталамічних клітинних ліній нейронів гіпоталамусу показали, що пальмітат, надлишок ліпотоксичного метаболіту, викликає стрес ER і апоптоз [111], ліпотоксичність також пов'язують з стресом ER та системою меланокортину [43, 126].

Загальний принцип роботи системи уявляють наступним чином: BiP/GRP78 за умов стресу ER, секвеструється з мембрани ER в цистерну для зв'язування із невірно складеними білками [55]. Шаперон інактивує неструктуровані протеїни, чим знижує протеотоксичність в клітині. Якщо протеїн BiP/GRP78 відчіпляється від мембрани, трансмембранні датчики UPR також вивільнюються, переміщуються до ядра та активують шляхи транскрипції в ядрі певних ділянок генів. IRE1 через активну сплайсингову форму XBP-1 запускає в ядрі програми транскрипції BiP/GRP78 для збільшення виробництва шаперону [136]. ATF6 переноситься в ядро, щоб регулювати експресію генів, що кодують шаперони [147]. Активованій PERK фосфорилує еукаріотичний фактор ініціації 2 α (eIF2 α), пригнічуючи загальну трансляцію мРНК. Хоча тимчасова пауза в трансляції білка через фосфорилування eIF2 α є корисною за рахунок зниження секреторного навантаження, тривалий блок трансляції за рахунок стійкого сигналу PERK несумісний з виживанням [161]. Більш того, гіперактивація PERK може активувати фактор транскрипції CHOP/GADD153, який пригнічує експресію гена, що кодує антиапоптотичний Bcl-2, для прискорення загибелі клітин; посилює експресію проапоптотичних протеїнів, і білків окисного стресу [59, 161].

Варто зауважити, що UPR-система може забезпечувати парадоксальні результати: з одного боку, це цитопротекторні властивості, які відновлюють гомеостаз, а з іншого - деструктивні функції клітин, зокрема апоптоз. Цей

процес «перемикання» між цитопротекторною дією та проапоптотичною активацією продовжує вивчатися, але є дані про те що напрям системи частково залежить від тривалості активності окремих шляхів UPR [93]. Вважається, що цитопротекторні ефекти будуть переважувати проапоптотичні доки триває період напіврозпаду мРНК і білків таких факторів, як ВіР/GRP78 [59, 130, 176]. Ця фаза надає клітинам «вікно можливостей» для коригування стану ЕР, щоб впоратися зі стресом. Якщо ці кроки не сприяють відновленню гомеостазу, тоді передача сигналів IRE1 і ATF6 послаблюються, створюючи дисбаланс, при якому активується проапоптотичний шлях, що спрямовує клітину до загибелі [66, 86, 169]. Як регулюється перехід від про-виживання до проапоптотичної активації сигналів, залишається неясним, і не з'ясовано як між собою пов'язані сигнальні шляхи IRE1 і PERK [63, 93, 130, 166].

Більш того, стадія незворотнього стресу саме через UPR-шлях активує прозапальні та проапоптотичні сигнали, щоб швидко знищити клітину [55]. Таким чином, результат активації UPR-системи і включення обох механізмів (встановлення гомеостазу або апоптоз) все одно вважається протекторним, адже на тлі хронічного захворювання, відсутність регуляції цих шляхів викликає дегенерацію клітин. Вивчення IRE1 α и PERK [99, 106], ATF6 [53], відкриває можливості дослідження цих молекулярних регуляторів у патогенезі багатьох захворювань. Вірогідно, у майбутньому, дослідження будуть складатися із пошуку шляхів управління регуляторів UPR, а також сценарію та послідовності їх активації. Тому вивчення цих сигнальних подій та їх керування розглядається як перспективні напрямки терапевтичних стратегій [33, 35, 69].

Таким чином, система UPR є головним механізмом підтримки внутрішньоклітинного гомеостазу і зняття стресу ЕР за рахунок зменшення інтенсивності синтезу білка, підсилення деградації невірно складених протеїнів, сприяння синтезу шаперону, розширенню ЕР, активації аутофагії для деградації дефектних мітохондрій (мітофагії) і елементів міс-протеїнів

ER (ER-фагія) [93, 106, 107]. Однак, окрім активації UPR-системи, контроль якості в ER регулюється системою ERAD - ER-асоційованої деградації (англ. ER-associated degradation), за допомогою якого місфолдинг-білки, розпізнаються і доставляються в цитозоль для убіквітинізації. Водночас, процес ERAD є АТФ-залежний, тому рішення про індукцію компонентів деградації клітина приймає «обережно», оскільки на первинний синтез протеїнів також було витрачено АТФ [19, 174].

1.3. Аутофагія нейронів – як важливий адаптаційний механізм запобігання загибелі нейронів шляхом апоптозу

Отже, механізми аутофагії та апоптозу, як і UPR-система, є універсальними механізмами, які притаманні усім еукаріотам і вважаються протективними заходами при функціональному напруженні ER в нейронах [79, 82, 132, 148]. Наведені вище дані свідчать про те, що функціональний стан гіпоталамічних нейронів відповідальних за харчову поведінку, регуляцію ліпідного, вуглеводного обмінів є структурним підґрунтям розвитку резистентності до лептину, порушення метаболізму глюкози, розвитку ожиріння. А порушення обміну речовин, таких як діабет, ожиріння пов'язані із неспроможністю фолдингу білків та неминуче супроводжується стресом ER та змінами в нейронах [118, 119].

Для нейронів гіпоталамусу, які активно продукують регуляторні білки, за умов міс-фолдингу та протеотоксичності важливим процесом є активація утворення аутофагосом. Аутофагія є важливим механізмом, який регулює клітинний гомеостаз шляхом самостійного знищення функціонально неспроможних білків, органел та ліпідів оскільки забезпечує селективну деградацію клітинних компонентів [148, 179]. Аутофагосоми проходять поетапний процес дозрівання, включаючи злиття з ендосомними і/або лізосомними везикулами, що в результаті призводить до поєднання цитоплазматичного вмісту із лізосомними компонентами, де вони

переробляються, потім розкладаються і повторно використовуються [78, 82, 178].

Аутофагія в основному виконує адаптивну роль «запрограмованого виживання клітин» і активується для захисту організму в періоди посиленого клітинного стресу [155]. Однак, як це не парадоксально, в окремих випадках, самоканнібалістичні механізми можуть бути шкідливими і приводити до загибелі клітин [137, 148]. Morton виявили що аутофагічна активність зазвичай висока в медіобазальній області гіпоталамуса, ділянці мозку яка регулює харчування, енергетичний баланс, масу тіла і вуглеводний гомеостаз [35, 56, 137]. Однак, розвиток хронічного ожиріння на тлі висококалорійної дієти супроводжується зниженням аутофагічної активності в нейронах цієї області.

Білок LC3, що є убіквітин-подібним білком (кодується геном Atg8), є надійним маркером аутофагії, оскільки його вміст позитивно корелює з кількістю активних аутофагосом [77, 101]. В процесі аутофагії синтез LC3 посилюється, і відбувається транслокація цитоплазматичного LC3-I в аутофагосому, де протеїн ізолюється в аутофагосомальній мембрані [38, 67].

Іншим маркером аутофагії є протеїн Beclin-1 (кодується геном Atg6), який також відіграє ключову роль в ініціації аутофагії [78]. Beclin-1 необхідний для нормального протікання мітофагії (мітохондріальної аутофагії). Оскільки процеси аутофагії та апоптозу пов'язані між собою, вважається що подальшу долю клітини при адаптації до стресу вирішує «перемикання» головного регулятора аутофагії Beclin-1 та його взаємодія з Bcl-2 і іншими шляхами апоптотичної загибелі клітин. Однак, як регулюється експресія вказаних протеїнів, які регулятори і точні механізми це визначають поки ще не з'ясовано [114, 160].

На активність Beclin-1 впливають багато факторів, особливо різні його партнери по зв'язуванню – сімейство регуляторних протеїнів, що мають 2й або 3й ВН домен (ВН2 -антиапоптотичні Bcl-2, Bcl-xL, ВН3- проапоптотичні Bax, Bim, Bik і Bak) [101]. У присутності Bcl-2 та Bcl-xl проаутофагічна

активність Beclin-1 пригнічується. У багатьох випадках аутофагія, опосередкована Beclin-1 пригнічує апоптоз і сприяє виживанню під час стресу. Однак, на відміну від інших відомих проапоптотичні білків, що містять тільки з домена BH (BH3), Beclin-1 не функціонує як проапоптотична молекула, навіть якщо він надто експресується і Bcl-2, оскільки він взаємодіє з Beclin-1, не втрачає свого антиапоптотичного потенціалу. Навпаки, Beclin-1 грає антиапоптотичну роль за деяких умов, включаючи хіміотерапію, опромінення, імунотерапію, позбавлення поживних речовин, пригнічення ангиогенезу і гіпоксію. Більш того, виснаження Beclin-1 запускає каспазозалежну запрограмовану загибель клітин. Цікаво, що каспази можуть розщеплювати Beclin-1 при апоптозі, тим самим руйнуючи його проаутофагічну активність. Є дані, що каспаза-3 ініціює розщеплення Beclin-1 і при цьому клітини втрачають свою здатність до аутофагії [114, 160]. Водночас, розщеплення каспазою-3 Atg4D індукує аутофагічну активність. Тому, дослідження взаємозв'язку між аутофагією і апоптозом потребує подальшого глибокого вивчення [172].

Фрагменти Beclin-1 експресуються в цитоплазмі, але його переважна локалізація визначена в ядрі. Вважається, що після опосередкованого каспазою-3 розщеплення, Beclin-1 частково переміщується з цитоплазми в ядро нейронів, які зазнали серйозного пошкодження, оскільки протеїн відіграє вирішальну роль в захисті ядра під час надзвичайно небезпечних для життя рівнів стресу, активуючи репарацію ДНК [173].

Як вже казали, сімейство білків Bcl-2 включає як протиапоптотичні Bcl-2 і Bcl-xL, так і проапоптотичні протеїни Bax, Bim, Bik і Bak [16]. Ці білки є регуляторами мітохондріального шляху запуску апоптозу [73], що відіграє ключову роль в загибелі нейронів при церебральній ішемії [168]. Встановлено, що надлишок протиапоптотичних білків сімейства Bcl-2 захищає тканину мозку від ішемії [101]. У стані фізіологічного спокою протиапоптотичні білки, такі як Bcl-2 і Bcl-xL, зв'язуються із проапоптотичними білками BH123 (Bax, Bim, Bik і Bak) і не дозволяють їм полімеризуватись у

зовнішній мембрані мітохондрій. Внаслідок дії певного апоптичного стимулу (пошкодження ДНК, стрес ER, анокіс і дефіцит цитокінів, факторів росту або поживних речовин) в клітині активуються або починають синтезуватись проапоптичні білки, що містять тільки домен ВНЗ. Вони у свою чергу інгібують антиапоптичні білки, і сприяють підвищенню проникності зовнішньої мембрани мітохондрій. В результаті чого утворюється апоптосома, що призводить до подальшої активації ефекторних каспаз-3/7 [73].

Так, BAX є ключовим регулятором апоптозу. За нормальних умов BAX-мономер є неактивною молекулою, яка в основному знаходиться в цитоплазмі здорових клітин. При наявності апоптотичних стимулів, BAX транслокується в зовнішню мембрану мітохондрій, де піддається конфірмаційним змінам, олігомеризується і перетворюється у BAX-димер, що сприяє утворенню пор в зовнішній мембрані мітохондрій. Цей процес призводить до вивільнення цитохрому C в цитозоль та руйнування клітини через мітоптоз [16].

1.4. Роль вивчення нейроглії у патогенезі запалення нервової тканини

При вивченні причин та наслідків дизрегуляції центральних механізмів забезпечення гомеостазу, дослідники повідомляють що мікроглія та астроцити причетні до патофізіології ожиріння та діабету [36, 74], проте механізми перехресних зв'язків астроцитів та мікроглії в гіпоталамусі на тлі ЦД2 все ще залишаються не вивченими.

Астроцити виконують безліч активних функцій в підтримці нормальної фізіології мозку, таких як формування гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), секреція нейроактивних сполук, метаболізм нейротрансмітерів і підтримання іонного балансу позаклітинного середовища [56]. Радіальна глія, попередник астроцитів, залучена до процесів міграції нейронів під час ембріонального

розвитку мозку. А зрілі гліальні клітини беруть участь в передачі нейротрофічних сигналів до нейронів, необхідних для їх виживання, проліферації і диференціювання. Крім своєї фізіологічної ролі, астроцити відіграють важливу роль в патологічних станах. Накопичення гліальних волокон є гістологічним орієнтиром реакції астроцитів на пошкодження нервової тканини, відповідно названого «реактивним гліозом» [135]. Така відповідь характеризується, серед іншого, інтенсивною проліферацією астроцитів і надекспресією GFAP (англ., Glial Fibrillary Acidic Protein). Підвищення експресії протеїну GFAP - одна з основних характеристик астроцитарної реакції, яка зазвичай спостерігається і на тлі функціональної дисфункції структур ЦНС. Таким чином, дослідження експресії GFAP виявилися корисними для розуміння не тільки фізіології мозку, але і неврологічних захворювань [56, 70] .

Питання відносно ролі мікроглії в розвитку ожиріння обговорюється. Неясно, чи є «гіпоталамічний гліоз» (накопичення мікроглії в області гіпоталамусу) причиною або наслідком збільшення ваги, або гліальні клітини замість цього є безпосередньою ланкою, що регулює енергетичний баланс. Мікроглія, це популяція макрофагів в ЦНС, яка самостійно оновлюється, керує як імунологічними, так і фізіологічними відповідями гіпоталамуса на надлишок їжі і «дає вказівки» через гіпоталамічні зв'язки щодо контролю споживання їжі, витрати енергії і маси тіла [162]. Valdearcos et al. наводять переконливі докази того, що мікроглія, завдяки своїй здатності передавати запальні сигнали, є критично важливим регулятором, що реагує на харчове перевантаження і важливою ланкою, що зв'язує надмірне споживання калорійної їжі з дисфункцією гіпоталамічних ядер. [162]. Мікроглія експресує транспортери трьох основних енергетичних субстратів (глюкози, жирних кислот, глутаміну) і регулює діабетичну енцефалопатію за допомогою взаємодій мікроглія-нейрон. Мікроглія може відігравати роль первинного охоронця для швидкого захисту від ушкодження або, навіть, видалення пошкоджених нейронів. Оскільки нейрони виявляють

гіперактивність у відповідь на гіперглікемію, гіперліпідемію, нейротоксичні фактори і вивільняють потенційні мікрогліальні активатори, модуляція активації мікроглії може бути терапевтичною мішенню для корекції діабетичної енцефалопатії [96].

За даними [75] миші, що одержували харчування із високим вмістом жиру HFD, мали швидке збільшення маси тіла і жирової маси і, зокрема, демонстрували підвищену кількість маркера мікрогліальних клітин - Iba1 (англ., Ionized calcium-binding adaptor molecule 1) в аркуатному ядрі гіпоталамуса за даними [75]. Ознакою гліозу при споживанні HFD, є клітини із вмістом протеїну Iba1, які стають широко поширеними в зонах ARC і VMH [116].

Запалення в області ядер гіпоталамуса в експериментальних моделях ожиріння, викликаного харчуванням з високим вмістом жиру [84, 89] в основному викликається надлишком насичених жирних кислот (НЖК) [146], які досягають нервової тканини в основному через ділянки, що позбавлені ГЕБ [61] через фенестрований ендотелій судин. Периваскулярні макрофаги головного мозку також реагують на надлишкові вільні ЖК, що циркулюють в крові і сприяють ще більшій проникності ГЕБ [92]. Гліальні клітини, такі як астроцити і мікроглія, швидко реагують на присутність ЖК в паренхімі гіпоталамуса, і у відповідь вивільняють прозапальні цитокіни, хемокіни і активні форми кисню (АФК) [33]. Якщо стимул зберігається тривалий час, ER нейронів гіпоталамуса може відчувати стрес, що призводить до нейрозапалення, яке в результаті викликає порушення енергетичного балансу [46] і, нарешті, дисфункцію/апоптоз нейронів. При чому, дослідники показали, що запалення гіпоталамуса починається всього через кілька годин/днів після годування з високим вмістом жирів [37].

Інший можливий механізм, за допомогою якого мікроглія і астроцити сприяють ще більшій проникності ГЕБ, це зменшення білків щільного з'єднання, а саме окклюдіна і ZO-1 (англ., Zonula Occludens-1), в активованих гліальних клітинах [81, 127]. Цікаво, що при системному запаленні мікроглія

здатна фагоцитувати ніжки астроцитів, що і призводить до порушення щільності з'єднання клітин і основної функції ГЕБ [64]. Однак, як ми вже вказували не те, що механізми взаємозв'язків астроцитів та мікроглії в гіпоталамусі при запаленні на тлі ЦД2 все ще залишаються не вивченими.

Таким чином, дослідження структурно-функціональних змін в гіпоталамічних нейронах є шляхом до розуміння тонких клітинних механізмів розвитку захворювання та безсумнівно дадуть корисну інформацію про потенційне використання ліків, спрямованих на певні патогенетичні ланки для лікування усіх клінічних проявів МС та ЦД2.

1.5. Пропіонова кислота – як потенційний засіб для нейропротекції

Не має сумнівів, що розвиток та прогресування ожиріння пов'язано з запаленням в області гіпоталамічних ядер, вчені докладають зусиль у пошуку можливих препаратів для позитивного регулювання функції гіпоталамусу на тлі ЦД2.

Метформін – вважається «золотим стандартом» корекції ЦД2, добре відомий гіпоглікемічний препарат [105, 108], часто застосовується як протидіабетична монотерапія, що знижує рівень глюкози в плазмі за кількома механізмами, позитивно впливає на сироваткові ліпідні профілі, процес вуглеводного та ліпідного гомеостазу та має певні протизапальні, антиапоптотичні та антиоксидантні властивості [94, 105]. Однак дуже мало відомо про вплив лікування метформіном на стан нейронів гіпоталамуса. Нещодавнє дослідження *in vivo* повідомляє, що 4 тижні введення метформіну здоровим щурам, або тваринам з високою масою тіла посилює інгібування лептином гіпоталамічного АМРК, але цей вплив позбавлений будь-якого клінічного ефекту [72]. Крім того, інше дослідження *in vitro* демонструє, що метформін пригнічує в нейронах гіпоталамуса активність АМРК та нейропептиду Y, що пояснює зниження апетиту за рахунок АМРК-

індукованих механізмів [95, 96]. Тим не менше, досі залишається недостатньо зрозумілим, наскільки метформін може впливати на функціональні властивості нейронів гіпоталамуса за умов стабільної гіперглікемії. Також, обговорюється недостатність монотерапії метформіном при лікуванні ЦД2 для компенсації порушень нервової системи [47, 54, 110, 129, 163].

Сьогодні з'являється все більше доказів про позитивну дію на структуру мозку коротколанцюгових жирних кислот (SCFA) (ЖК з коротким непарним ланцюгом, C3:0), що всмоктуються у кишечнику є основним класом сигнальних молекул, які виробляються в результаті бактеріального бродіння харчових вуглеводів. SCFA безпосередньо впливають на травний тракт господаря шляхом фенотипових змін клітин епітелію товстої кишки і діють як основні енергетичні субстрати [12, 14, 20, 22, 45, 58, 158]. Вони можуть виступати в якості супресорів пухлини при апоптотичній загибелі клітин, і нещодавно було показано, що вони є модуляторами кишкової нейроендокринної системи. Є вже достатній успішний клінічний досвід призначення препаратів пропіонової кислоти (ПрК), її солі (натрія пропіонат), як додаткового компоненту лікування пацієнтів із нейродегенеративними (аутоімунними) захворюваннями [24, 64, 144]. Механізм впливу пропіонату на нейрони не відомий, але активно вивчається. Вважається, що пропіонат, при надходженні у кишечник, стимулює імунні клітини, зокрема Т-лімфоцити стінки кишечника, викликає синтез нейромедіаторів, цитокінів, гормонів, які акцептуються нейроглією, що пригнічує демієлінізацію і опосередковано впливає на властивості нейронів [12, 14, 20, 22, 45, 58, 60, 144, 158, 164].

На моделях тварин було показано, що жирні кислоти з короткими ланцюгами, такі як пропіонова кислота (ПрК) та інші метаболіти кишківника, мають властивості «діяти проти ожиріння», нормалізують глікемію натще, масу тіла та толерантність до інсуліну [51, 68]. SCFA також беруть участь у регуляції генів протизапальних процесів як *in vitro*, так і *in vivo* [102]. Слід

зазначити, що ПрК та її похідні все частіше використовують у сільському господарстві та харчовій промисловості [13], як натрієва або кальцієва сіль - консервант харчових продуктів у пшениці та молочних продуктах. [144, 165].

SCFA мають ряд прямих впливів на фізіологію шлунково-кишкового тракту, зменшують перистальтику шлунку та збільшують частоту скорочень, гладких м'язів товстої кишки [115], розширюють артерії товстої кишки, активізують тучні клітини та збільшують вивільнення серотоніну з клітин кишківника [20]. Однак вони мають специфічні рецептори, пов'язані з G-білками вільних ЖК, і здійснюють прямий вплив на нервову та імунну системи і тому розглядаються як можливий шлях для нових фармакотерапевтичних засобів [45, 102, 103, 158]. Більшість літературних даних підтверджує сприятливий вплив SCFA на контроль ваги, ліпідний метаболізм та стан товстої кишки, однак дозозалежний та локальний [12, 13, 22].

Цікавим є те, що хоча ПрК виробляється і накопичується в основному в кишківнику, вона може легко перетнути кишково-кров'яний бар'єр та ГЕБ і отримати доступ до ЦНС. Описаний її вплив на мозкові структури, в тому числі гіпоталамічні ділянки, через внутрішньоклітинне підкислення [14, 102, 103], зміну вивільнення нейромедіатора і, в результаті, зміну нейрональної регуляції важливих процесів, включаючи поведінку [12]. Крім того, було продемонстровано, що ПрК модулює експресію генів, пов'язаних з патогенезом розладів аутистичного спектру, включаючи ті, що беруть участь у регуляції нейромедіаторних систем, нейропластичності, нейророзвитку, молекулах адгезії нейрональних клітин, запаленні, окисному стресі, ліпідному обміні та функцій мітохондрій. [52, 102]. Ці ефекти, які є дозозалежними, локальними, та не тривалими, можуть бути фізіологічно адаптивними (регуляція імунної системи, пошук їжі, навчання та пам'ять, внутрішньовидова соціальна взаємодія), але, при збільшенні продуктивності, можуть бути патологічними. Зокрема повідомлялося про нейротоксичний вплив а після короткочасної інфузії ПрК у внутрішньомозковий шлуночок

щурів. У тварин спостерігалася гіперактивна, дистонічна та агресивна поведінка, сплески припадків та ознаки лімбічних порушень [102, 103].

Було показано, що ЖК відіграють важливу роль у регуляції викликаного стресом ER апоптозу в різних типах клітин. Дослідники виявили, що оцтова ЖК та ПрК зменшують стрес ER в культурі епітеліальних клітин молочної залози великої рогатої худоби [120]. Однак прямий вплив ПрК на нейтрони вентромедіального гіпоталамусу при ЦД2, спричиненому стресом ER, залишається не вивченим. Отже, вважаємо перспективним з'ясувати роль ПрК як можливого кандидата на роль додаткового препарату для нейропротекції при порушенні функцій нейронів на тлі ЦД2, враховуючи ефекти дії пропіонату на нейрон через ланцюг «кишківник-глія-нейрон», шляхом вивчення морфо-функціональних змін в нейронах та нейроглії гіпоталамусу тварин з ЦД2 та їх відновлення на тлі фармакологічної корекції.

Таким чином, напрямом нашого дослідження було вивчити стан ендоплазматичного ретикулуму, UPR -системи, активації аутофагії, апоптозу, як механізмів підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу нейронів вентромедіального ядра гіпоталамусу щурів із експериментальною моделлю цукрового діабету 2 типу та фармакологічної корекції цих змін метформіном, натрієвою сіллю пропіонової кислоти - пропіонатом й їх комбінацією.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для експерименту були відібрані самці здорових білих щурів, масою 160-180 грамів ($M+m = 176,8 \pm 8,3$) загальною кількістю 66 особини. Тварин утримували у віварії НМУ імені О.О. Богомольця в 12-годинному циклі світло/темно ($24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $65\% \pm 5\%$ вологості) і годували стандартною збалансованою дієтою для гризунів та водою *ad libitum*. Тварин кліматизували протягом 1 тижня.

Важливим для проведення експерименту згідно біоетичних норм та рекомендацій є розрахунок кількості тварин в групі, як необхідний мінімуму, який дозволяє досягнення статистично достовірної різниці. Для планування мінімальної необхідної кількості тварин в групі «n» ми використовували формулу: $n = \frac{t^2 \sigma^2}{\Delta^2}$, де t – коефіцієнт довіри, σ – дисперсія варіаційної ознаки, Δ – гранична помилка вибірки. Дані розраховували на основі попереднього вимірювання у щурів в різних клінічних станах (інтактних та із стійкою гіперглікемією) вмісту суми насичених та ненасичених жирних кислот, арахідонової ЖК, глюкози та глікозильованого гемоглобіну тощо. За результатами розрахунків виявили, що в кожній підгрупі мінімальна, але достатня кількість щурів дорівнює 6 тварин. Планували через 3,5 місяця сформувати 5 груп, але із врахуванням можливого непередбаченого виключення із експерименту щурів (захворювання або загибелі, а також необхідності проведення ряду розрахункових експериментів для відібрання крові та тканин по мірі відтворювання методик), було вирішено відібрати 36 тварин. Ще група 30 тварин була використана у попередніх експериментах для отримання даних, і обґрунтування шляхів відтворення патогенетичної моделі ЦД2. Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних

положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006), засідання Комісії з Біоетики НМУ, протокол № 123 від 23.12.2019 р.

2.1. Відтворювання моделі ЦД2 та фармакологічна корекція стану

Для експериментального моделювання ЦД2 були відібрані 30 щурів. Для групи контролю, весь час експерименту 6 щурів знаходилася в окремих клітках із аналогічним впливом температурного та світлового режиму. ЦД2 моделювали шляхом надання щурам *харчового навантаження* (англ, High Fat Diet – HFD) протягом 3х місяців. Склад харчової суміші, яку підбирали через проведення попередніх розрахункових експериментів (див. Розділ 3), був наступний: свинячий жир 45%+фруктоза 20%+1% медична жовч+ 34% корм віварію. Харчову суміш розділяли на порції із розрахунку 30 г на 1 тварину на добу і надавали щоденно вранці.

Після завершення годування HFD для додаткового ушкодження інсулінпродукуючих клітин проводили однократне введення стрептозотоцину (STZ) у дозі 25 мг/кг внутрішньочеревино. Через 2 тижні після ін'єкції STZ проводили вимірювання параметрів тіла тварин, біохімічних показників, тестів толерантності до інсуліну для оцінки адекватності моделі (див. Розділ 3).

Надалі, були відібрані щури групи ЦД2 (n=24), та група контролю (n=6) у яких вказані параметри достовірно відрізнялися. Тварин із ЦД2 рандомно поділяли на групи для здійснення фармакологічного впливу і вивчення дії препаратів.

Згідно фармакологічних рекомендацій [10] препарати вводили розчиненим у воді для ін'єкцій через металевий зонд внутрішньошлунково. Введення препаратів супроводжувалося порівнянням із групою плацебо (введення води для ін'єкцій) в аналогічній дозі.

Були створені наступні групи:

1 - контрольна група (**КГ**) - які отримували розчинену у воді для ін'єкцій у дозі 60 мг/кг маси тіла, протягом 14 днів, внутрішньошлунково (плацебо).

2 група – щури з експериментально індукованим ЦД2 (**ЦД2**);

3 група – щури з ЦД2, які отримували антигіперглікемічний засіб метформін, розчинений у воді для ін'єкцій (GLUKOFAGE, Merck Sante, Франція) у дозі 60 мг/кг маси тіла, протягом 14 днів (**ЦД2+Мет**);

4 група – щури з ЦД2, які отримувала натрієву сіль пропіонової кислоти (PROPICUM®, Flexopharm Brain GmbH & Co, Німеччина), розчинену у воді для ін'єкцій у дозі 60 мг/кг маси тіла, протягом 14 днів, внутрішньошлунково (**ЦД2+Проп**); Натрієву сіль пропіонової кислоти (PROPICUM®, Flexopharm Brain GmbH & Co, Німеччина) надала професор, доктор Ніна Бабель (Center for Translational Medicine and Immune Diagnostics Laboratory, Medical Department I, Marien Hospital Herne, University Hospital of the Ruhr University Bochum, Herne, Germany).

5 група, щури з ЦД2 які одночасно отримували метформін (60 мг/кг маси тіла протягом 14 днів внутрішньошлунково) та натрієву сіль пропіонової кислоти (60 мг/кг маси тіла протягом 14 днів внутрішньошлунково) (**ЦД2+Мет+Проп**).

Щурів виводили із експерименту шляхом миттєвої декапітації гільйотиною після введення летальної дози тіопенталу натрію (200 мг/кг) внутрішньоочеревинно. Модель відтворення патогенетичних змін в організмі тварини на кшталт ЦД2 із подальшою фармакологічною корекцією виглядала наступним чином (рис.2.2).

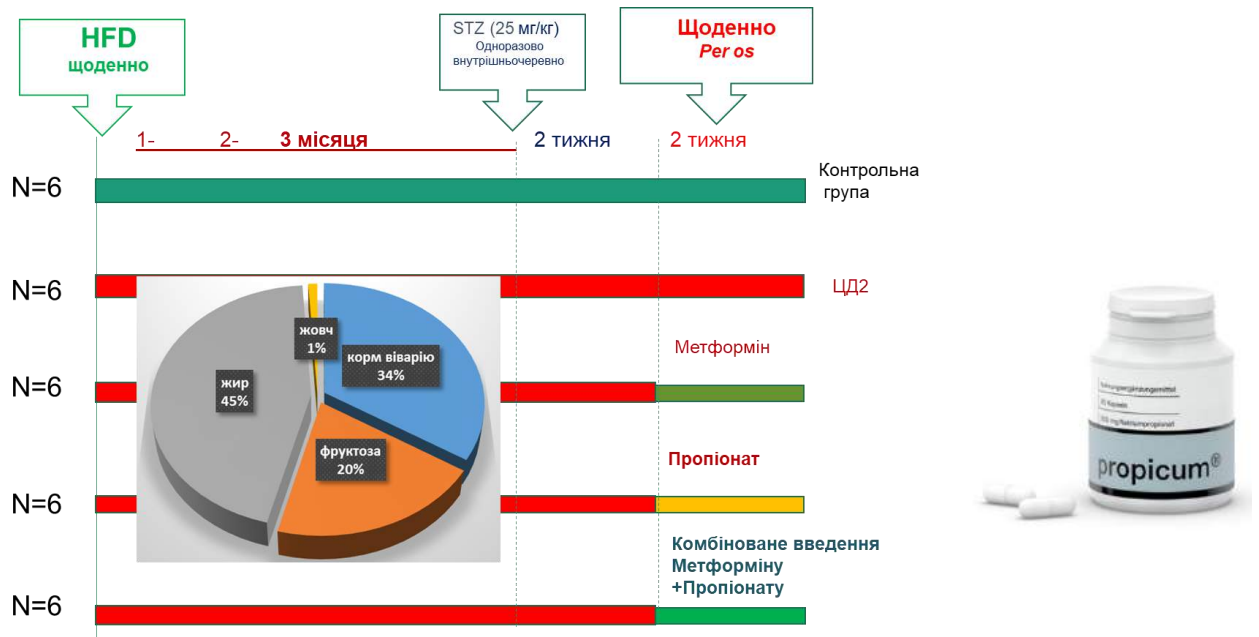


Рис. 2.2. Блок-схема дослідження фармакологічного впливу препаратів на організм щурів за умов експериментального ЦД2, відтвореного шляхом харчового навантаження HFD+фруктоза із індукцією STZ.

2.2. Оцінка біохімічних показників крові та вмісту жирних кислот в тканинах

Біохімічні показники сироватки крові вимірювали в лабораторії клінічної лабораторної діагностики Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини (НДІ ЕКМ) НМУ імені О.О. Богомольця. Концентрацію глюкози в крові (ммоль/л) лабораторних тварин визначали двома способами: прижиттєво - глюкометром в капілярній крові хвоста, після декапітації в сироватці змішаної крові, (яку виділяли центрифугуванням), ферментативним колориметричним методом (GOD/POD/PAP) на напівавтоматичному аналізаторі BS-3000M виробництва «Sinnowa», (Китай), із використанням біохімічних наборів «Diagnosticum Inc», (Угорщина). Концентрацію тригліцеридів, загального холестерину, ЛПВЩ, ЛПНЩ також визначали в сироватці змішаної крові за стандартними

методиками та із використанням біохімічних наборів «Diagnosticum Inc», (Угорщина).

Концентрацію глікозильованого гемоглобіну (HbA1) визначали методом іонно-обмінної температурно незалежної хроматографії-спектрофотометрії за допомогою набору реагентів і мікроколонок виробництва Bio Systems (Іспанія). Спектрофотометричні дослідження проводили на фотометрі КФК-2МП (Росія). Кров для визначення фракції HbA1 набирали в вакуумні пробірки з антикоагулянтом ЕДТА, виробництва Grenier Bio One (Австрія). Для виготовлення гемолізату крові, в пробірці змішували 50 мкл крові і 200 мкл реагенту для гемолізу (детергент рН 5,0 і фталат калію 50 ммоль/л). Гемолізат наносили на фільтр підготовленої колонки і згідно інструкції проводили заповнення колонки буфером. Елюат, який містив фракцію HbA1 збирали в пробірку і визначали оптичну щільність проти дистильованої води при довжині хвилі 415нм. Згідно інструкції визначали оптичну щільність розчину, який містить загальний гемоглобін в гемолізаті. Отримані значення використовували для обчислення частки (%) фракції HbA1С (%).

Дослідження складу ЖК в гомогенатах тканин проводили **методом газОВО-рідинної хроматографії** за стандартною методикою [7]. Ідентифікували ЖК за піками на хроматограммі, порівнюючи час їх утримання з часом утримання піків стандартних чистих речовин з відомим якісним та кількісним складом. Кількісну оцінку спектра ЖК проводили методом нормування площин піків метильованих похідних ЖК та визначали їхній склад у відсотках, де за 100% приймали суму ЖК в об'ємі усїєї суміші. У спектрі ЖК ліпідів мозкової тканини та печінки було ідентифіковано 9 найінформативніших ЖК: із них міристинова С14:0, пентодеканова С15:0, пальмітинова С16:0, маргарінова С17:0, стеаринова С18:0, що складають суму *насичених жирних кислот* (НЖК); олеїнова С18:1, лінолева С18:2, ліноленова С18:3, арахідонова С20:4, групу *ненасичених жирних кислот*

(ННЖК). Ліолева С18:2, ліоленова С18:3, арахідонова С20:4 ЖК входять у суму *поліненасичених* жирних кислот (ПНЖК) і визначаються як незамінні.

2.3. Дослідження за допомогою електронної мікроскопії

Для дослідження забирали фрагменти мозку вентромедіального ядра гіпоталамуса (VMH) розміром 1x1 мм³. Орієнтиром для відбору матеріалу були мозкові структури (рис. 2.3) та стереотаксичний атлас.

Тканину фіксували 4 години у 2,5%-вому забуференому розчині глутаральдегіда (Sigma, # G49633) і фосфатному буфері Міллоніга (2,26%-ний розчин NaH₂PO₄·H₂O; 2,52 NaOH; 25% -ний розчин глутаральдегіда) рН до 7,3-7,4. Далі видаляли фіксатор і промивали в зазначеному буфері з додаванням дистильованої води 3 рази по 10 хвилин в трьох змінах буферного розчину. Додатково фіксували тканину у 1% забуференому розчині чотирьохокисного осмію 1 годину. І промивали тканину в двох змінах дистильованої води.

Зневоднення проводили етиловим спиртом підвищуючи концентрацію 70%, 80%, 90%, 100% і ацетоні по 15 хвилин. Далі тканину поміщали в суміш Епон - аралдіт (Sigma, # 45345 Epon 812; Sigma, # 45346 Epon Hardener, DDSA; Sigma, # 10951 Araldit M; Sigma, # 45348 Epoxy Embedding Medium, Accelerator) по 1 годині в пропорціях з ацетоном при кімнатній температурі. Після чого тканину поміщали в чисту смолу на 1 добу. Остаточну заливку матеріалу проводили на наступний день в свіжу епоксидну заливальну суміш. На дно капсули поміщали один шматочок тканини у вертикальному положенні. Ставили в термостат при 60°C на 72 години.

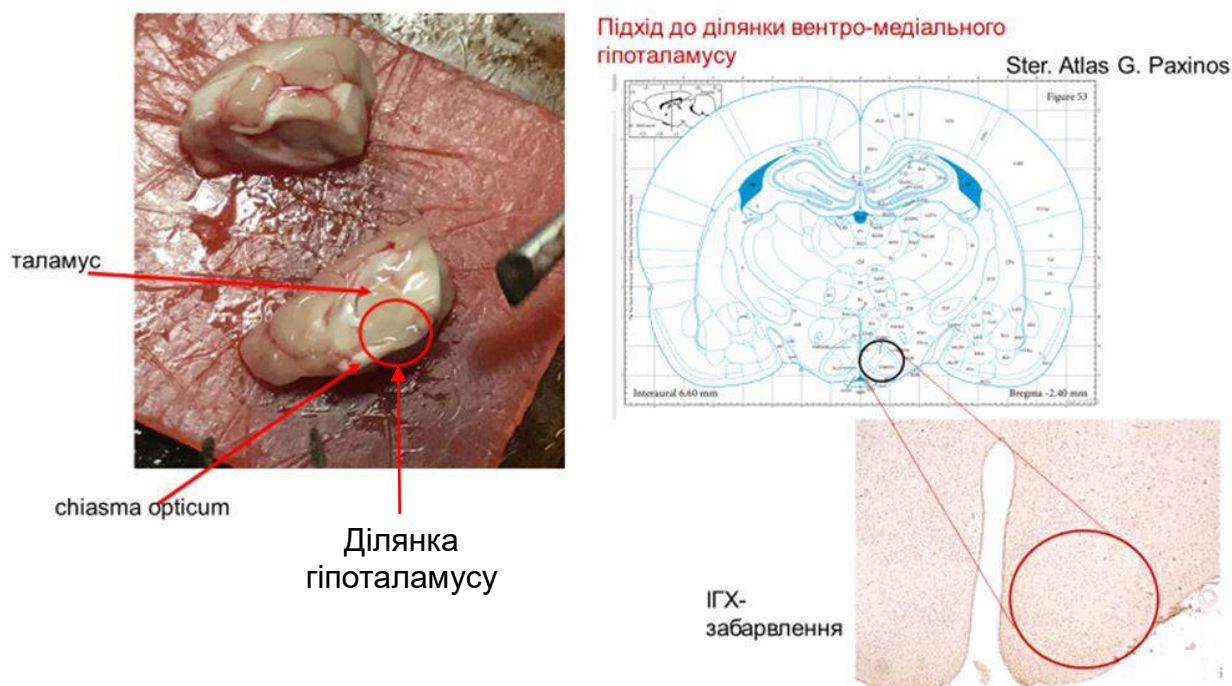


Рис. 2.3. Мозкові морфологічні орієнтири для відбору тканин зони вентромедіального ядра гіпоталамусу (VMH) для дослідження.

Напівтонкі і ультратонкі зрізи з отриманих блоків виготовляли на ультратомі LKB III (Швеція).

Різка тканини з багатьох причин є найбільш трудомістким процесом. Для того щоб бути впевненим в тому, що взята саме та ділянка тканини, яка містить необхідний для дослідження матеріал, нам треба було виконати спочатку напівтонкої зрізи 2-3 мкм, які переносили на краплю дистильованої води, вміщену на чисте предметне скло, і висушували над полум'ям пальника. Напівтонкі зрізи фарбували метиленовим синім і фуксином основним за методом Nayat. Ультратонкі зрізи отримували за допомогою скляного ножа. Зріз товщиною 600-900 Å поміщали на сітку і контрастували 2% розчином ураніацетатом і цитратом свинцю [65].

Препарати досліджували і фотографували під електронним мікроскопом «SELMІ» ПЕМ -125К (Україна), при збільшенні в 6-20 тисяч разів.

За допомогою програмного забезпечення ImageJ було розраховано кількісні морфометричні показники за розробленим алгоритмом стандартизації вимірювання. Для аналізу ER та перинуклеарного простору нейронів за допомогою електронного мікроскопа відтворювали фото, які обов'язково містили фрагмент ядра, приблизно 15-20% від його загального об'єму із збільшенням мікроскопу в діапазоні 9600-6400. Для кожної групи були відібрані 15-17 зображень, які завантажувалися в програму із перерахунком пікселей в μm (мікрметри) за формулою, що враховувала збільшення електроннограми. Далі, виділяли контур ядра та межі нейрону для розрахунку загальної площі клітини, яка підлягала аналізу. В межах цієї площі для кожного нейрону виділяли площу ER, площу цистерн ER, мембрани ER, площу перинуклеарного простору та розраховували їх відносні величини (відносно до загальної площі клітини). Крім того, ми розраховували відношення площі перинуклеарного простору до довжини периметра ядра нейрону. Статистичному аналізу підлягали відносні величини вимірювань для обчислення середнього значення, стандартної помилки середнього в умовних одиницях.

2.4. Імуногістохімічні дослідження

Для імуногістохімічних досліджень мозок фіксували у 10%-вому забуференому охолодженому розчині параформальдегіду (pH 7.4, 4°C, 24 години). Зразки зневоднювали у розчинах етанолу зростаючої концентрації та ущільнювали в парапласт (Leica-Paraplast Regular, 39601006, Leica Biosystems Inc., США) відповідно до стандартної процедури. З отриманих блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM360 (Microm International GmbH, Німеччина) які монтували на адгезивні предметні скельця HistoBond® (Marienfeld GmbH & Co. KG, Німеччина). Усі отримані зрізи мозку знаходились у межах стереотаксичних координат - 2,04 ... 3,0 мм відносно Bregma (рис. 2.3).

Гістологічні зрізи депарафінували в ксилолі, а потім регідратували в розчинах етанолу спадаючої концентрації (100%, 95%, 80% та 70%; по 2 хв на кожен етап) та промивали у 2 порціях дистильованої води (по 2 хв). Викриття антигенів проводили в 10 мМ цитратному буфері натрію (рН 6,0) при температурі 98°C протягом 30 хвилин. Після охолодження до 65°C предметні скельця промивали протягом по 1 хвилині у 3 порціях промивного буфера EnVision™ FLEX (розведення 1:20). Активність ендогенної пероксидази блокували розчином реагенту з набору EnVision FLEX протягом 2 хвилин, після чого проводили через 2 порції промивного буферу. Для виявлення антигенів зрізи інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин з антитілами проти: GRP78 (Invitrogen, USA, #PA5-34941) у розведенні 1:500; Veclin-1 (Invitrogen, USA, #PA5-20171) у розведенні 1:200; Bcl_xl (Invitrogen, USA, #PA5-21676) у розведенні 1:200; BAX (Invitrogen, USA #UA2671705) у розведенні 1:200. Потім, після промивання зрізи інкубували з вторинним антитілом кон'югованим HRP із набору (EnVision FLEX/HRP) протягом 10 хв, після чого двократно промивали у дистильованій воді. Продукти реакції візуалізували, використовуючи DAB (EnVision DAB-Хромоген) з субстратним буфером з набору EnVision FLEX протягом 10 хв при кімнатній температурі. Ядра фарбували гематоксилином Gill III. Для негативного контролю імуногістохімічних реакцій проводили процедури без застосування первинних антитіл.

Зрізи мозку досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX51 та цифрової камери Olympus C4040ZOOM із програмним забезпеченням Olympus DP-Soft 3.2. Було проведено напівкількісну оцінку імуногістохімічної реакції, а інтенсивність фарбування розраховували наступним чином: ступінь 0 - за відсутності реакції або вогнищевої слабкої реакції; ступінь 1 - для інтенсивної фокальної або дифузної слабкої реакції; ступінь 2 - для помірної дифузної реакції; ступінь 3 - для інтенсивної дифузної реакції; і 4 - дуже інтенсивне маркування. Отримані цифрові дані обробляли стандартними статистичними методами. Т-тест Стьюдента

використовували для оцінки значущості відмінностей середніх значень при порівнянні груп. $p < 0,05$ вважали статистично значущим.

2.5. Виділення РНК, синтез кДНК та ПЛР-аналіз у реальному часі

Для методики використовували зразки VMH із середньою вагою 0,03 г. РНК виділяли за допомогою набору РНК GeneJET (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Концентрацію і чистоту мРНК вимірювали за допомогою DeNovix DS-11 FX + (DeNovix Inc., США) при довжині хвилі 230, 260 та 280 нм для визначення співвідношення OD260/280 та OD260/230. РНК обробляли ДНКазою I, що не містить РНКаз (Thermo Fisher Scientific Inc., США), для видалення слідів ДНК. Очищену РНК із зразків тканини переводили в кДНК шляхом зворотної транскрипції, за допомогою набору RevertAid First Strand (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Зразки кДНК використовувались як матриця для аналізу ПЛР у реальному часі, який проводили на ампліфікаторі в реальному часі Applied Biosystems™ (Life Technologies Corporation, США).

Таблиця 2.1.

Дизайн праймерів, які були використані для дослідження

Primer name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
Grp78	TCGACTTGGGGACCCACCTATTCC	GCCCTGATCGTTGGCTATGATCTC
Perk	CAGAGAAGTGGCAAGAGGAGATGGA	GGGCATCCATTGGGCTAGGG
Atp6	AGCTGGACCAGGTGGTGTCAAG	CACAGACAGCTCTGCGCTTTGG
Bcl_xl,	GGTCTCTTCAGGGGAAACTG	TCCAAAACACCTGCTCACTC
Bax	CACGTCTGCGGGGAGTC	CATCCTCTCTGCTCGATCCT
LC3	GTGCATTTGGCTTGGAACCTC	CCTTTTAGAGAAGGCAGCAGG
Beclin-1	GAGGAATGGAGGGGTCTAAGG	TGGCTGTGGTAAGTAATGGAGC
Caspase-3	ACAACAACGAAACCTCCGTG	CACAAGCCCATTTCAAGGTA
β-actin	TGCAGAAGGAGATTAAGTCCCTGG	GCTGATCCACATCTGCTGGAAGG

Цільові гени ампліфікували протягом 40 циклів, використовуючи Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Двоступеневу реакцію ампліфікації RT-PCR проводили за наступним протоколом: 95°C 5 хв, потім 40 циклів при 95°C протягом 15 с і при 60°C

протягом 50 с. Послідовності праймерів були розроблені з використанням програмного забезпечення Primer BLAST; вони представлені в таблиці 2.1. В якості еталонного гена використовували β -актин. Дані розраховували як зміну згину щодо контролю за допомогою методу $\Delta\Delta Ct$. Для зменшення варіабельності у зразках усі проби ставили у 3 повторах.

2.6. Дослідження тканинних протеїнів методом Вестерн-блот аналізу

Для приготування зразків фрагменти мозку подрібнювали у порцеляновому тиглі і розтирали за присутності рідкого азоту до гомогенного стану. Наважки тканин (100 мг) змішували з буфером екстракції протеїнів RIPA (20 mM трис-HCl, pH 7,5; 1% тритону X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% дезоксихолату натрію 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,2% DCH) у співвідношенні 1:10 (вага/об'єм) та сумішшю інгібіторів протеїназ і фосфатаз (PIC), інкубували на льоду протягом 20 хв та піддавали ультразвуковій дезінтеграції за допомогою приладу Sartorius (Labsonic® M, ФРН). Отримані гомогенати центрифугували при 16 тис. g протягом 20 хв. за 4°C. Після центрифугування надосадову рідину збирали та переносили до пластикових пробірок Eppendorf. Концентрацію загального протеїну вимірювали на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS-3000M (Китай) із використанням біохімічного набору «DiagnosisumZrt» (Угорщина). Протеїнові екстракти змішували з буфером Леммлі (150 mM трис-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 0.3% бромфеноловий синій, 20% гліцерил) та проварювали при 95°C протягом 5 хв для подальшого зберігання.

Електрофоретичне розділення протеїнів зразків шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE електрофорез) проводили у вертикальній камері BioRad (США), використовуючи електродний буфер (25 mM трис-HCl (pH 8,3), 0.192 M гліцину, 0.1% SDS). Кількість загального

протеїну, що вносили до лунок гелю, становила 50 мкг. Концентрування зразків проводили при напрузі, що не перевищувала 50В, розділення – 160В. Для ідентифікації молекулярних мас протеїнів використовували суміш забарвлених протеїнових маркерів (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Литва).

Перенесення протеїнів з гелю до нітроцелюлозних мембран (діаметр пор 0.45 мкм, GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) проводили у трансфер-буфері (12.5 мМ трис-НСІ буфер (рН 8.3), 0.198 М гліцин та 20 % метанол) протягом 60хв. при напрузі 30 В і постійному охолодженні. Після завершення трансферу протеїнів мембрани відмивали від залишків буферу у 50 мМ фосфатному фізіологічному буфері, що містив 0.05 % Triton X-100 (PBST) (рН 7.4). Блокування місць неспецифічної сорбції антитіл проводили у 5%-му розчині знежиреного сухого молока (Carnation, США) у PBST протягом 120 хв. при кімнатній температурі. Після блокування мембрани інкубували зі специфічними антитілами проти GRP78 (1:1000, #PA5-34941, Invitrogen, USA); PERK (1:800, #PA5-79193, Invitrogen, USA); ATF6 (1:1000, #PA5-85935, Invitrogen, USA), IRE-1 (1:800, #PA5-79193, Invitrogen, USA); ZO-1 (1:1000, #61-7300 ThermoFisher Scientific, USA), Iba-1 (#MA5-27726, Invitrogen, USA), GFAP (1:1000, sc-9065, Santa Cruz Biotechnology, USA) and tubulin (1:1000, T5168, Sigma-Aldrich, USA), LC3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, #Sc-134226) and Beclin-1 (1:1500, Invitrogen, USA, #PA5-20171), Bcl_xl (1:1000, Invitrogen, USA, #PA5-21676), BAX (1:500, Invitrogen, USA# UA2671705), Caspase-3 (1/2500, Abcam, USA # ab208161) and tubulin (1:1000, T5168, Sigma-Aldrich, USA) in PBST supplemented with 0.1% (vol./vol.), протягом 16 год. при 4 °С. Далі мембрани промивали на горизонтальному шейкері у 6 змінах PBST по 5 хв. кожна, після чого інкубували 90 хв. при кімнатній температурі з відповідними *вторинними антитілами*, кон'югованими з пероксидазою хрому (anti-mouse IgG 1:5000, Abcam, США, кат. № ab197767 або anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate 1:2500, Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Неспецифічно сорбовані вторинні

антитіла відмивали у 6 змінах того ж буферу. Детекцію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0.25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0.09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0.1 М трис (рН 8.5) та 0.0035 % H_2O_2 . Візуалізацію специфічного забарвлення здійснювали на рентгенівських плівках Konica Minolta (Medical & Graphic, Inc, Японія). Отримані плівки сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програми TL-120 (TotalLab Ltd., США). Відносний вміст протеїнів виражали в умовних одиницях оптичної густини (a.u. англ, arbitrary units).

2.7. Статистичний аналіз

Статистичну обробку даних проводили за допомогою ліцензованого (користувач - НМУ імені О.О.Богомольця) статистичного пакету IBM SPSS Statistics, версія 23.0 (SPSS Inc., США). Розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона (R), з р-значенням, 95% довірчий інтервал для коефіцієнта кореляції. Для перевірки розподілу на нормальність використано критерій Шапіро-Уїлка. Для нормально розподілених даних статистичні відмінності між групами аналізували одностороннім тестом ANOVA з урахуванням поправки Бонфероні. Для непараметричних даних використовували критерій χ^2 та Крускала-Уолліса, Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонфероні. Різницю вважали статистично значущою, коли $p < 0,05$. Всі дані були отримані на основі двох або трьох незалежних експериментів і виражені як середнє значення \pm SEM.

РОЗДІЛ 3

ШЛЯХИ ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ЦД2 НА ЩУРАХ ТА ОЦІНКА ЇЇ АДЕКВАТНОСТІ

Для вивчення механізмів фармакологічного впливу препаратів на системи, органи та клітини важливим є відтворення експериментальної моделі на тваринах з оцінкою її адекватності, через співставлення параметрів ушкодження із такими, що виникають у людини. Незважаючи на багато спроб змодельовати на тваринах експериментальну модель діабету, дослідники стикаються із рядом проблем, оскільки ЦД 2 типу це складне гетерогенне захворювання, із ланкою патогенетичних перетворювань, які ґрунтуються на генетичній схильності, дієтичному напруженні та ряду ендогенних механізмів, які досі залишаються не вивченими.

Варто розуміти, що повноцінний комплекс змін у вигляді поліметаболічного симптомокомплексу, що був описаний у людини ще у 1967 році P. Avogaro et al., як поєднання гіперліпідемії з гіперглікемією, гіпертензією та помірним ожирінням, у щурів диких ліній не розвиваються. По-перше гіпертензію можливо спостерігати лише у щурів із генетичними мутаціями, а по-друге, ожиріння для щурів, як хижаків взагалі не властиво. Використання генетично модифікованих тварин є досить коштовним, тому дослідники частіше використовують дикі лінії і намагаються моделювати ЦД2 шляхом використання екзогенних впливів, дієти у комбінації із хімічними речовинами.

В експерименті харчове навантаження у вигляді високо жирової дієти HFD (англ, High Fat Diet) є досить розповсюдженим екзогенним фактором, що викликає підвищення маси тіла експериментальних тварин. Однак, доза жиру, його склад, та головне – тривалість харчування, суттєво розрізняється у дослідників [4, 9]. За умов HFD у тварини активується механізм використання жирних кислот (ЖК) у вигляді енергетичного субстрату

замість глюкози, тому роль ЖК в індукції інсулінорезистентності (ІР) очевидна. Харчування фруктозою сприяє розвитку ІР оскільки виключає стимулювання інсулінового апарату підшлункової залози [3, 4].

Отже, першим нашим кроком було визначення *складу харчової суміші* для забезпечення найбільш природного навантаження, яке буде призводити до відповідних змін в організмі щурів. Для виготовлення гомогенної харчової суміші ми використали ретельно подрібнений стандартний комбікорм віварію, поєднаний із попередньо розтопленим чистим свинячим внутрішнім жиром. Природна емульгація жиру в кишечнику щурів та покращення всмоктування ентероцитом забезпечувалося додаванням в суміш медичної жовчі в об'ємі до 1%. Для визначення кількості долі жиру для забезпечення ефективного впливу був проведений аналіз складу ЖК двох комбінацій харчової суміші HFD-1 в складі якої відсоток жиру складав 50% і були добавлені соя, протеїн та пшеничні хлібці та HFD-2 в якій вміст жиру був зменшений до 45%, але 20% суміші складала суха фруктоза й інший об'єм доповнював комбікорм. Вивчення спектру ЖК сумішей було проведено за допомогою газово-рідинної хроматографії за 9 найінформативнішими ЖК: із них міристинова C14:0, пентодеканова C15:0, пальмітинова C16:0, маргарінова C17:0, стеаринова C18:0, що складають суму *насичених жирних кислот* (НЖК); олеїнова C18:1, лінолева C18:2, ліноленова C18:3, арахідонова C20:4, групу *ненасичених жирних кислот* (ННЖК). Лінолева C18:2, ліноленова C18:3, арахідонова C20:4 ЖК входять у суму *поліненасичених* жирних кислот (ПНЖК) і визначаються як незамінні (рис.3.1, А).

За даними аналізу, вміст HFD-2 виглядає менш «агресивним» у порівнянні із HFD-1. Зменшення долі тваринного жиру з 50% до 45% призвело до перерозподілу ЖК (збільшило долю поліненасичених - ліноленової до 60% проти 46%, та зменшило долю насичених - пальмітинової з 43% до 30%).

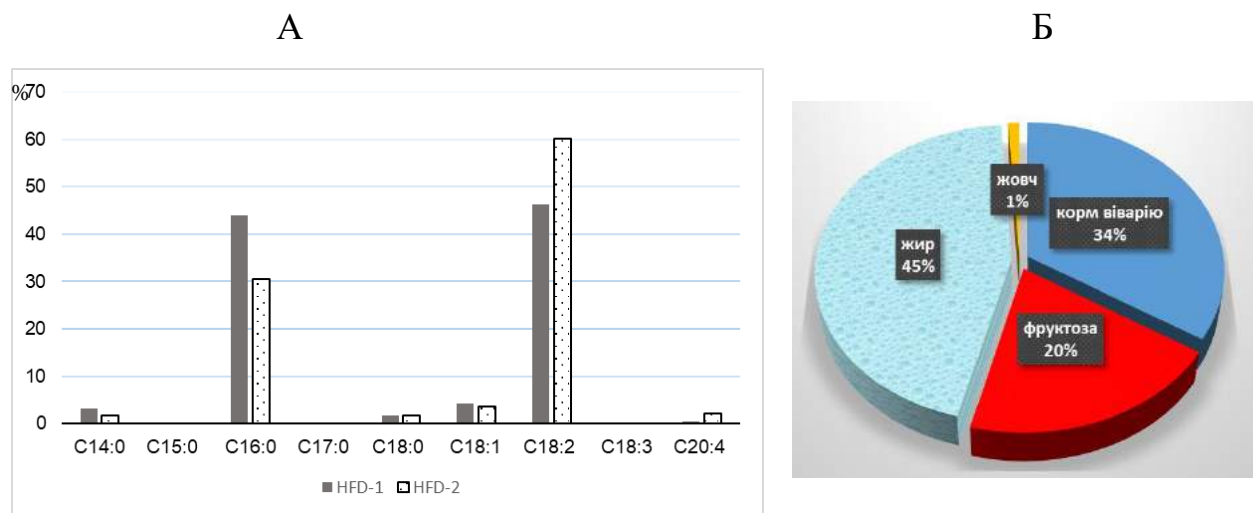


Рис. 3.1. Порівняльний аналіз вмісту жирних кислот (%) в складі харчових сумішей HFD-1 та HFD-2 (А), компоненти складу суміші HFD-2 (Б).

Для експерименту ми обрали суміш HFD-2, оскільки вважаємо, такий вміст ЖК виглядає більш природньо та відповідає традиційному уявленню про харчовий раціон, який за умов тривалого навантаження, призводить до ожиріння. Також важливим було наявність в HFD-2 сухої фруктози (ЧДА, Китай) в об'ємі 20%, що сприяє поглибленню ІР оскільки намагалися відтворити комплексне ліпідне та вуглеводне навантаження, що є основою патогенетичної ланки розвитку ЦД2. Отже, для нашої моделі харчове навантаження у вигляді HFD складало: свинячий жир 45%+фруктоза 20% + медична жовч 1% + корм віварію 34% (рис. 3.1, Б)

Наступним важливим питанням було визначення *терміну годування* тварин – оскільки дослідники вказують, що вже через 3 тижні високожирової дієти можна очікувати ефективну зміну параметрів організму тварини [9]. Наші спостереження за масою тіла тварин та рівнем глюкози показало, що лише через 7-8 тижнів ми отримали результат, за яким вимірювання параметрів тіла тварини та біохімічних показників достовірно відрізняється від групи контролю, що повністю збігається із спостереженням [100]. Тому, ми обрали тривалість режиму HFD - 3 місяця (13 тижнів).

Для збільшення *ЖК-індукованої ІР*, на тлі функціональної редукції β -клітин підшлункової залози, яка вже починає розвиватися через 7-8 тижнів харчування HFD, дослідники рекомендують додатково посилити ефект одноразовим введенням зменшеної дози препарату, який викликає пряме ушкодження клітин інсулярного апарату. У більшості досліджень, для пошкодження інсулінпродукуючих клітин використовують такі хімічні сполуки як алоксан або стрептозотоцин. Для обґрунтування вибору препарату ми, паралельно із основним експериментом, провели вивчення зміни жирнокислотного складу ліпідів печінки щурів на тлі гіперглікемії, створеної за різними моделями: стрептозотоцинову гіперглікемію (STZ модель) відтворили на 12 дорослих білих щурах масою 150-180 г шляхом одноразового інтраперитоніального введення стрептозотоцину (STZ «Sigma») в дозі 50 мг/кг, розчиненому в 0,1 М цитратному буферному розчині (рН 4,5). Алоксанову гіперглікемію (Allox модель) на 12 білих безпорідних щурах масою 150-180 г - шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату в дозі 130 мг/кг «Sigma») [8]. Контрольну групу (n=6) складала інтактні щури, які спостерігались в аналогічних умовах, але в день досліду їм інтраперитоніально було введено 0,2 мл води для ін'єкцій. Після ін'єкцій усі тварини перебували під спостереженням 30 діб з вільним доступом до їжі та води.

Аналіз жирнокислотного спектру *печінки* щурів різних груп є вкрай доцільним, оскільки саме цей орган є найбільш активним учасником процесу окиснення або утилізації ЖК і віддзеркалює самі наявні метаболічні розлади в організмі. При аналізі жирнокислотного складу в гомогенаті печінки щурів з різними моделями гіперглікемії ми виявили суттєві розбіжності, які були статистично достовірні (табл.3.1).

Вміст (%) жирних кислот у печінці інтактних щурів та з різними моделями гіперглікемії ($M \pm m$)

Жирна кислота	Контроль	STZ модель	Аллох модель
C14:0 Міристинова	0,1±0,05	0,2±0,1	1,2±0,1*#
C15:0 Пентадеканова	0,1±0,05	0,2±0,1	1,2±0,1*#
C16:0 Пальмітинова	18,6±1,0	17,6±1,5	9,5±0,5*#
C17:0 Маргарінова	0,1±0,05	0,2±0,1	0,1±0,05
C18:0 Стеаринова	11,1±1,0	9,5±0,6	5,5±0,6*#
C18:1 Олеїнова	14,8±1,5	12,7±0,8	34,2±1,6*#
C18:2 Лінолева	24,8±1,3	23,7±1,0	28,4±1,3#
C18:3 Ліноленова	0,2±0,1	0,2±0,1	0,1±0,05
C20:4 Арахідонова	30,1±1,5	35,7±1,5*	19,6±1,0*#
∑ насичених	30,0±1,6	27,7±1,8	17,5±1,8*#
∑ Ненасичен	70,0±1,6	72,3±1,8	82,5±1,8*#
∑ ПНЖК	55,1±1,5	59,6±1,6*	48,1±1,6*#

*- Статистично достовірна різниця порівняно з контролем ($p < 0,05$), # - Статистично достовірна різниця між моделями ($p < 0,05$), ∑ ПНЖК – сума поліненасичених жирних кислот, STZ модель – стрептозотоцинова модель, Аллох модель – аллоксанова модель

Моделювання гіперглікемії змінювало співвідношення суми НЖК, ННЖК і ПНЖК. При створенні STZ моделі незначно зменшувалась сума НЖК, але достовірно зростала доля ПНЖК. При Аллох моделі ці зміни носили інший характер: зменшувалася в 1,7 разів ($p < 0,05$) відносно контролю сума НЖК і в 1,1 раз ($p < 0,05$) зменшувалася сума ПНЖК, але в 1,2 рази ($p < 0,05$) зростала доля ННЖК. Показники достовірно відрізнялися в групах тварин з різними моделями гіперглікемії.

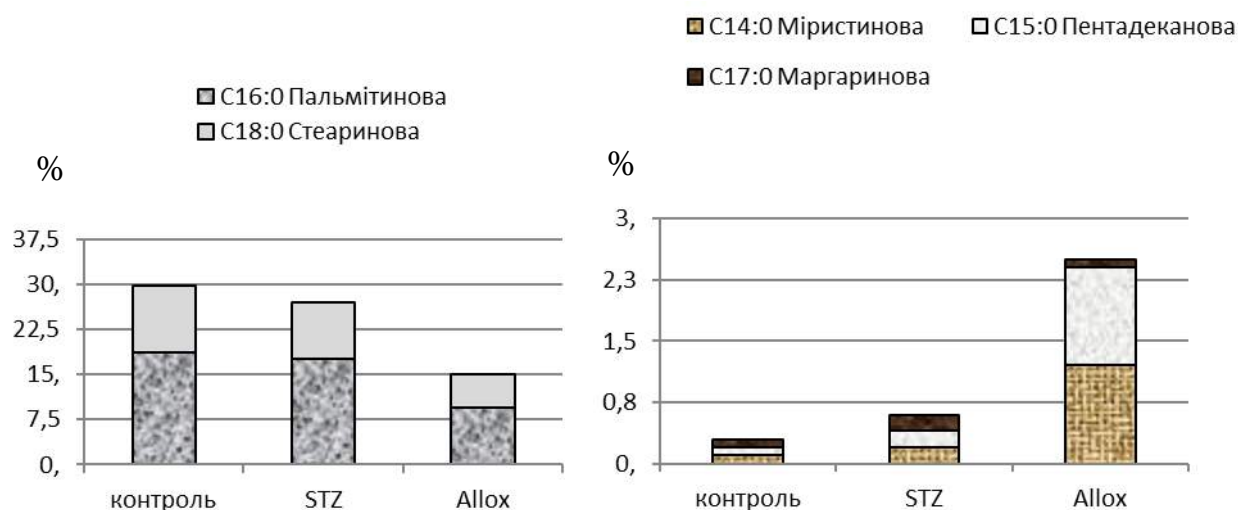


Рис.3.2. Розподіл насичених ЖК (%) у гомогенаті печінки щурів з різними моделями гіперглікемії у порівнянні із інтактними

Детальний аналіз показав (рис. 3.2), що зміни спектру насичених ЖК у печінці щурів носять односпрямований характер – зменшується кількість основних ЖК пальмітинової та стеаринової і зростає доля слідових ЖК. Однак їх вміст в печінці щурів з різними моделями суттєво розрізняється. У STZ моделі в 1,2 рази зменшується вміст стеаринової, а кількість пальмітинової суттєво не змінюється. В той же час при Allox моделі вміст кожної з цих ЖК зменшується у порівнянні з контролем в 2 рази. Співвідношення слідових ЖК змінюється ще більш суттєво. Дія алоксану призводить до перерозподілу ЖК і різкому – в 12 разів збільшенню кількості міристинової та пентадеканової ЖК відносно контролю. Створення STZ моделі підвищує вміст цих ЖК тільки в 2 рази відносно контролю. Тобто різниця вмісту міристинової та пентадеканової ЖК між групами складає 6 разів.

Серед ненасичених ЖК ми також спостерігаємо розбіжність між показниками в експериментальних групах (рис.3.3).

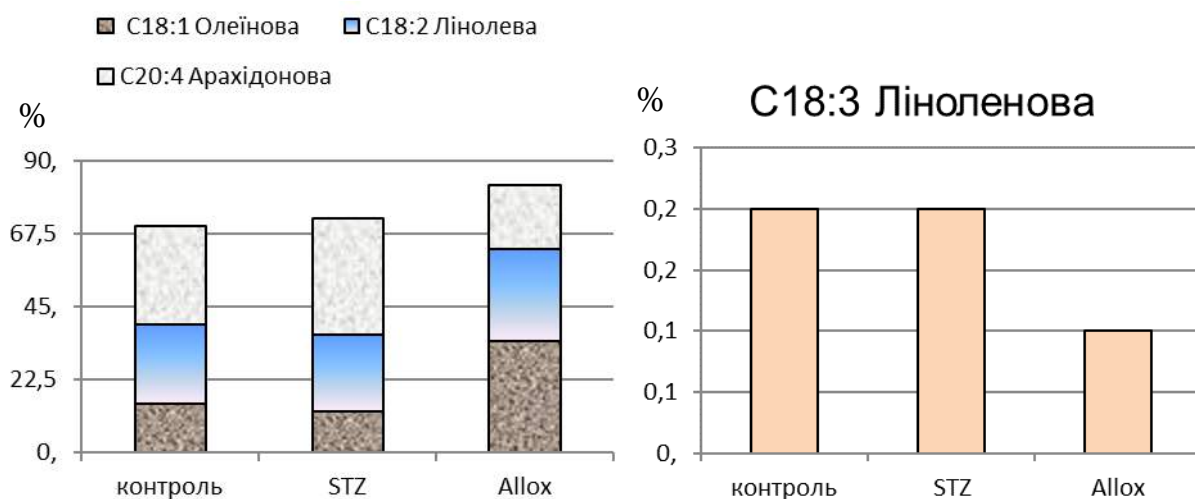


Рис.3.3. Розподіл ненасичених ЖК (%) у гомогенаті печінки щурів з різними моделями гіперглікемії у порівнянні із інтактними

Створення алоксанової моделі гіперглікемії призводить до збільшення вмісту олейнової ЖК в 2 рази відносно контролю і зменшення в 1,5 разів вмісту арахідонової. Створення STZ моделі гіперглікемії навпаки викликає незначне зменшення вмісту олейнової та збільшення арахідонової ЖК. Ці показники достовірно відрізняються між собою в моделях. Також в алоксанової моделі відносно контролю ми виявили збільшення в 1,1 раз вмісту лінолевої ЖК і зменшення в 2 рази ліноленової ЖК. При стрептозотоцинової моделі таких змін ми не спостерігали, показники були на рівні інтактних щурів.

Таким чином, жирнокислотий склад в гомогенаті печінки щурів з різними моделями ЦД суттєво розрізняється. Незначне коливання співвідношення суми НЖК, ННЖК і ПНЖК при STZ моделі викликане підвищенням в 2 рази усіх слідових НЖК, при зменшенні в 1,2 рази стеаринової ЖК. Серед ННЖК спостерігали незначне підвищення арахідонової ЖК. А в Allox моделі ми виявили перерозподіл НЖК – зменшення в 2 рази відносно контролю стеаринової і пальмітинової ЖК і підвищення в 12 разів міристинової і пентадеканової ЖК. Серед ННЖК

підвищення в 2 рази олеїнової ЖК, на тлі зменшення в 2 рази арахідонової і ліноленої ЖК, тобто протилежні зміни в різних моделях.

Таким чином, Allox модель гіперглікемії за даними зміни ЖК спектру, віддзеркалює агресивну дію високоактивних радикалів і стан оксидативного стресу, тому може успішно використовуватися для вивчення механізмів оксидації у тканинах, який виникає на тлі гіперглікемії, або вивчення антиоксидантних фармакологічних впливів. Розвиток STZ моделі гіперглікемії відображає менш трагічні наслідки ушкодження клітин і таке моделювання доцільно використовувати при вивченні порушень тканин та органів, які виникають при тривалій та стійкій гіперглікемії. Тому, для нашої моделі ЦД2 ми обрали в ролі додаткового індуктора IP стрептозотоцин. STZ в дозі 25 мг/кг вводили внутрішньоочеревинно одноразово через 3 місяці харчового навантаження, а після ін'єкції тварин переводили на стандартний корм віварію і спостерігали ще протягом 2х тижнів.

Після завершення вказаного терміну, ми провели моніторинг параметрів тіла (Табл.3.2) у щурів експериментальної моделі ЦД2 і виявили достовірні: підвищення в 1,65 рази ($p < 0,05$) маси тіла, збільшення у 1,45 разів ($p < 0,05$) довжини талії та збільшення у 1,15 ($p < 0,05$) довжини тіла.

Аналіз біохімічних параметрів показав наявність достовірної відмінності рівня глюкози крові тварин, який підвищився у 2 рази ($P < 0,05$) та глікованого гемоглобіну у 1,76 разів ($P < 0,05$) і відсутність достовірних відмінностей показників ліпідограми щурів у яких відтворювали модель ЦД2, окрім показника ЛПНЩ.

Таблиця 3.2.

Порівняння параметрів тіла та біохімічних параметрів щурів за умов моделювання експериментального ЦД2

Параметр	КГ	ЦД2	Значущість відмінностей
Маса тіла, гр	176±8,3	291±17,63*	$p < 0,05$
Довжина тіла, см	20±0,31	23±0,63*	$p < 0,05$

Талія, см	11,8±0,48	16,0±0,31*	p<0,05
Глюкоза, ммоль/л	4,83±0,39	9,55±0,59*	p<0,05
НьА1С (%)	5,17±0,69	9,01±0,85*	p<0,05
Холестерин, ммоль/л	1,96±0,16	2,09±0,23	p>0,05
Тригліцериди, ммоль/л	0,65±0,05	0,69±0,03	p>0,05
ЛПВЩ, ммоль/л	1,58±0,18	1,55±0,24	p>0,05
ЛПНЩ, ммоль/л	0,082±0,016	0,278±0,061*	p<0,05

Примітка: Визначення статистичної значимості відмінностей проводили за допомогою критерію Шеффе

Оцінка ступеню ІР у щурів з ЦД2 проводилася за допомогою еуглікемічного гіперінсулінемічного клемп тесту (hyperinsulinemic-euglycemic clamp) (ЕГК, клемп-тест), який використовується для визначення ІР з 70-х років [18, 121]. Суть методу полягає в гострому підвищенні концентрації інсуліну в крові і одночасному введенні глюкози для підтримки еуглікемії (близько 5,5 ммоль/л). При досягненні стійкого рівня еуглікемії кількість введеної глюкози буде відповідати швидкості захоплення глюкози тканинами, саме під дією інсуліну. Клемп-тест - найнадійний і точний метод діагностики, який дозволяє не тільки дати кількісну оцінку ІР, а й визначити, що лежить в основі зниженої чутливості до інсуліну (порушення здатності інсуліну пригнічувати продукцію глюкози в печінці або стимулювати захоплення глюкози периферичними тканинами). Незважаючи на наявність чітких критеріїв інтерпретації, ЕГК в тому вигляді, як він був запропонований для людей він досить рідко застосовується для дослідницьких цілей, і практично не використовується в клінічній практиці. Оскільки для його виконання потрібно додаткове технічне оснащення (калібровані помпи для дозованої інфузії глюкози і інсуліну, два постійних внутрішньовенних доступи, обладнання для експрес-аналізу рівня глюкози крові) і спеціально навчений персонал [11].

Ми взяли за основу принцип інсулінового навантаження на тлі еуглікемії, але провели власні розрахунки дози та шляхів введення. Водний розчин глюкози (2 г/кг) вводили тварині *per os* (1 мл) та через 5 хвилин однократного підшкірно вводили інсулін (Актрапід), із розрахунку 0,175 ОД/кг маси. Рівень глюкози вимірювали 6 разів глюкометром в капілярній крові хвоста: базовий – до введення глюкози, та через 15, 30, 45, 60 та 90 після ін'єкції інсуліну. Варто підкреслити, нам не вдалося повністю притримуватися СОП Intraperitoneal Insulin Tolerance Test, від ММРС [121], оскільки у вказаному документі рекомендовано використовувати інсулін для мишей виробництва Eli Lilly (*per mouse*) в дозі 0,75Од-1,0 Од, його заміна препаратом іншого виробника потребувала перераховувати дозу введення.

Отримані дані (рис. 3.4) можна інтерпретувати як суттєве гальмування виділення інсуліну у відповідь на глюкозну стимуляцію в групі ЦД2 у порівнянні із групою контролю.

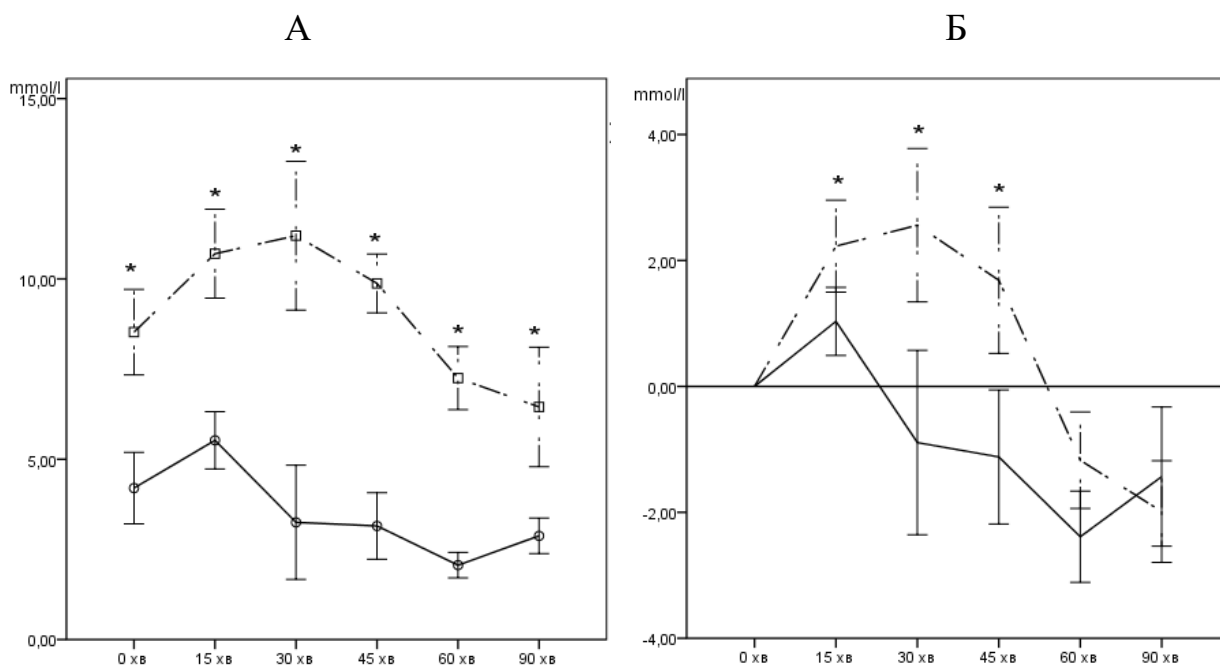


Рис.3.4. Показники оцінки тесту толерантності до інсуліну: дані щурів (n=6) контрольної групи (суцільна лінія) та щурів (n=6) із ЦД2 (пунктир), до введення речовин – 0 хв та в динаміці кожні 15 хвилин: А –рівень глюкози крові, Б – Δ глюкози у порівнянні із рівнем в 0 хв. *- відмінність на рівні $p < 0,05$.

Як ми вже визначили, одним із методологічних підходів оцінки ступеню й розвитку ушкодження тканин життєвоважливих органів, в тому числі на тлі ЦД2, є аналіз їх жирнокислотного складу. Ми вивчили особливості змін жирнокислотного вмісту тканин печінки та головного мозку щурів в експериментальній моделі ЦД2. Тривале навантаження тварин HFD, викликало зміни жирнокислотного складу тканин, але вони розрізнялися в залежності від органу. Порівняння співвідношення суми ЖК: НЖК, ННЖК, ПНЖК у вказаних тканинах наведено на рис.3.5. Дані щодо вмісту окремих ЖК в тканині печінки та головного мозку тварин з ЦД2 у порівнянні із щурами КГ наведені на рис. 3.6 і рис.3.7.

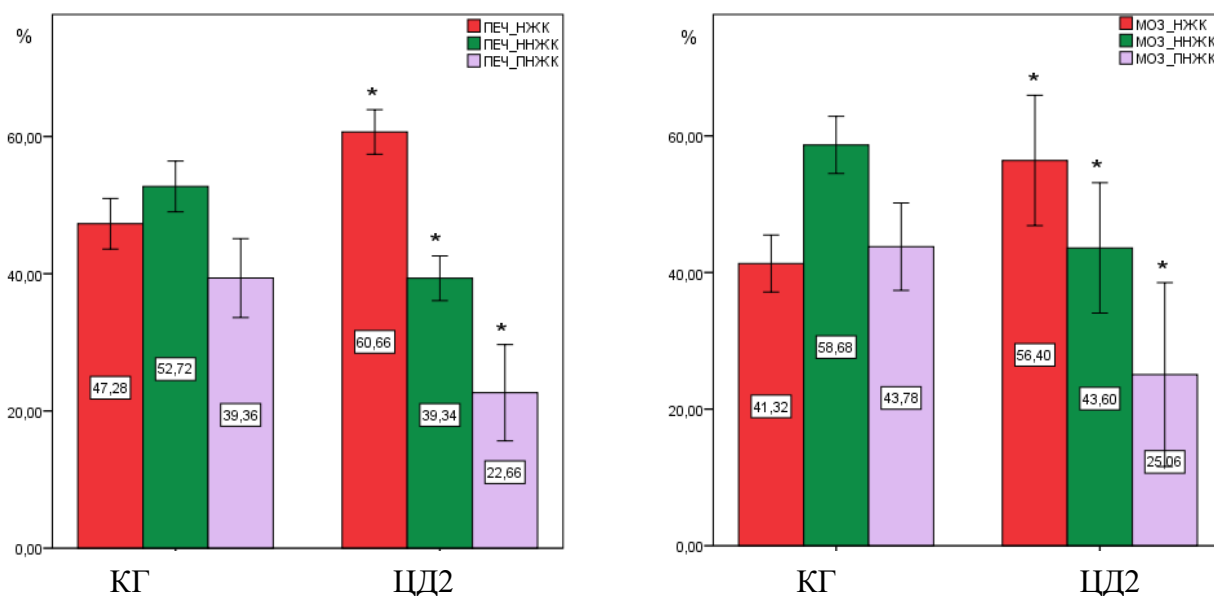


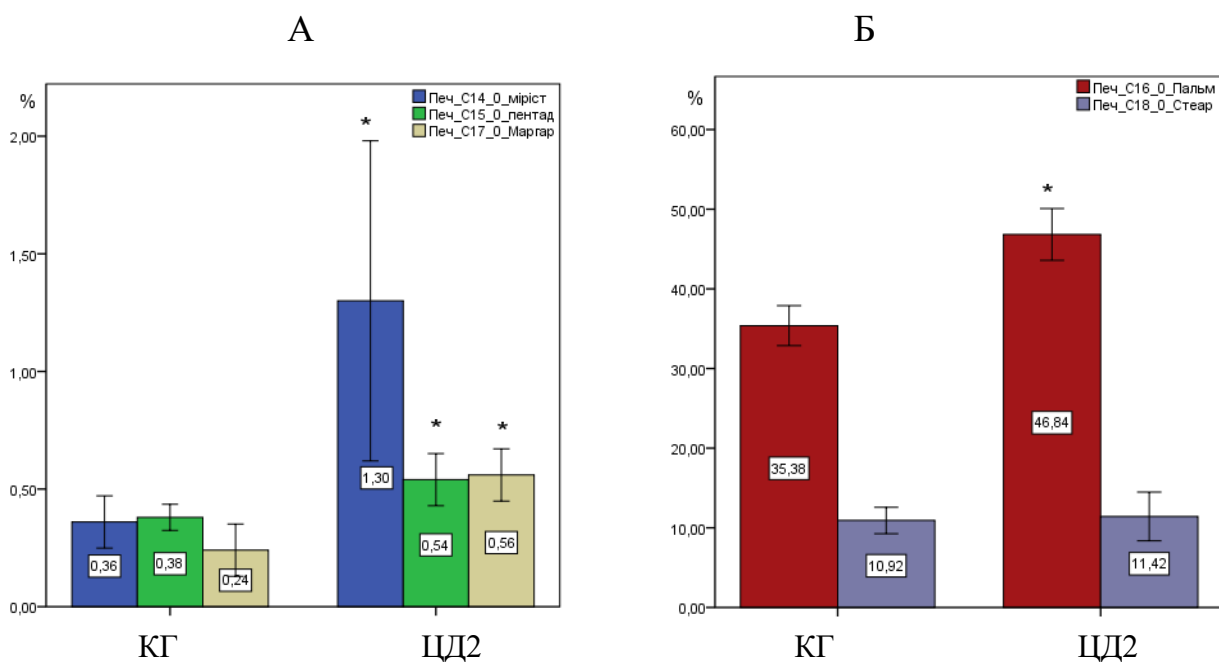
Рис.3.5. Порівняння співвідношення суми ЖК: насичених, ненасичених, поліненасичених в тканині печінки (А) та тканині головного мозку (Б) у щурів КГ та із моделлю ЦД2. * - відмінність із відповідним показником щурів КГ ($p < 0,05$).

Виявлене підвищення вмісту пальмітинової ЖК в печінці та головному мозку тварин з ЦД2 було очікуваним, оскільки в складі харчової суміші доведено значний вміст цієї ЖК. Основну відмінність спектру НЖК складав вміст міристинової ЖК, яка в печінці експериментальних тварин підвищувалася в 4 рази, а в нервовій тканині в 2 рази. В роботі [167] описані

морфологічні зміни печінки у вигляді жирового стеатозу та інших структурних порушень на моделі мишей, яких годували HFD. Автори виявили суттєве підвищення пальмітинової та міристинової ЖК, на тлі зниження арахідонової.

Вказані зміни НЖК відбувалися у тварин із ЦД2 в основному за рахунок підвищення у вмісту C16:0 – пальмітинової ЖК і відсутності коливання вмісту стеаринової ЖК. Суттєві відмінності перерозподілу НЖК в органах виявилися за рахунок слідових НЖК: в печінці щурів з ЦД2 виявилось підвищення в 4 рази міристинової ЖК ($p < 0,05$), підвищення в 1,4 рази пентадеканової ($p < 0,05$) і в 2 рази ($p < 0,05$) маргаринової ЖК. В мозку щурів з ЦД2 достовірно в 2 рази підвищився вміст міристинової та пентадеканової, і визначилася маргаринова ЖК, яка не виявлялася в КГ.

В печінці щурів КГ та ЦД2 **вміст ННЖК** суттєво змінився під впливом дієти за рахунок зменшення в 3,5 рази ($p < 0,05$) арахідонової ЖК і підвищенням в 2 рази ($p < 0,05$) ліноленої ЖК. В мозку щурів з ЦД2 виявили зменшення в 2 рази ($p < 0,05$) лінолевої ЖК, підвищення в 2 рази ($p < 0,05$) арахідонової, та визначили ліноленову ЖК, що не було притаманним для щурів КГ.



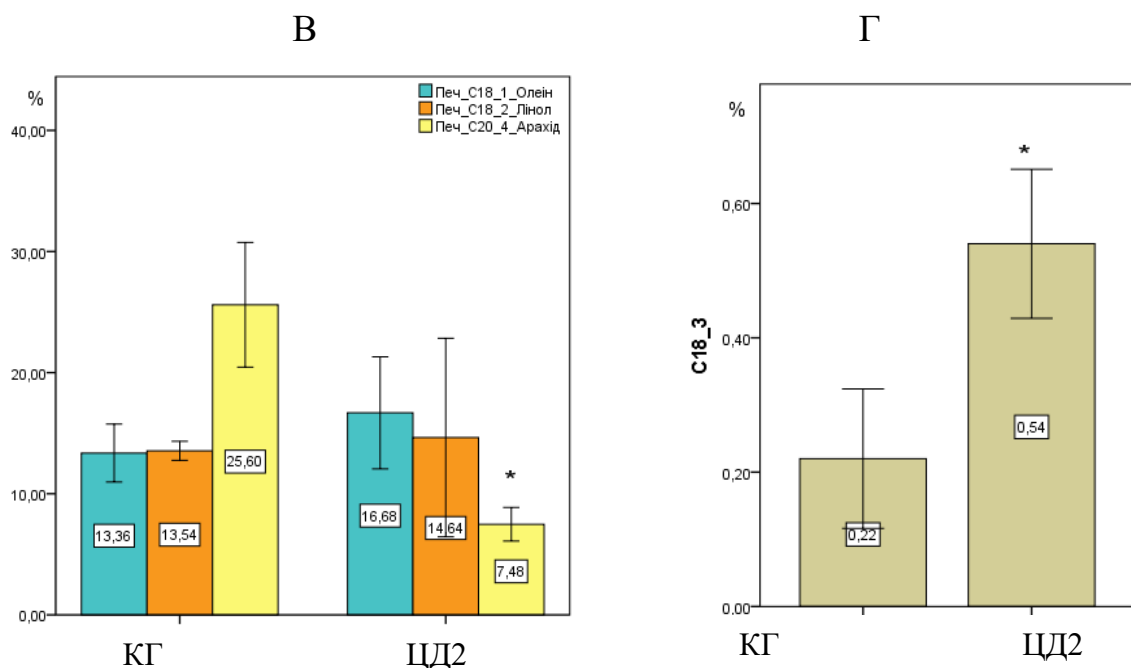
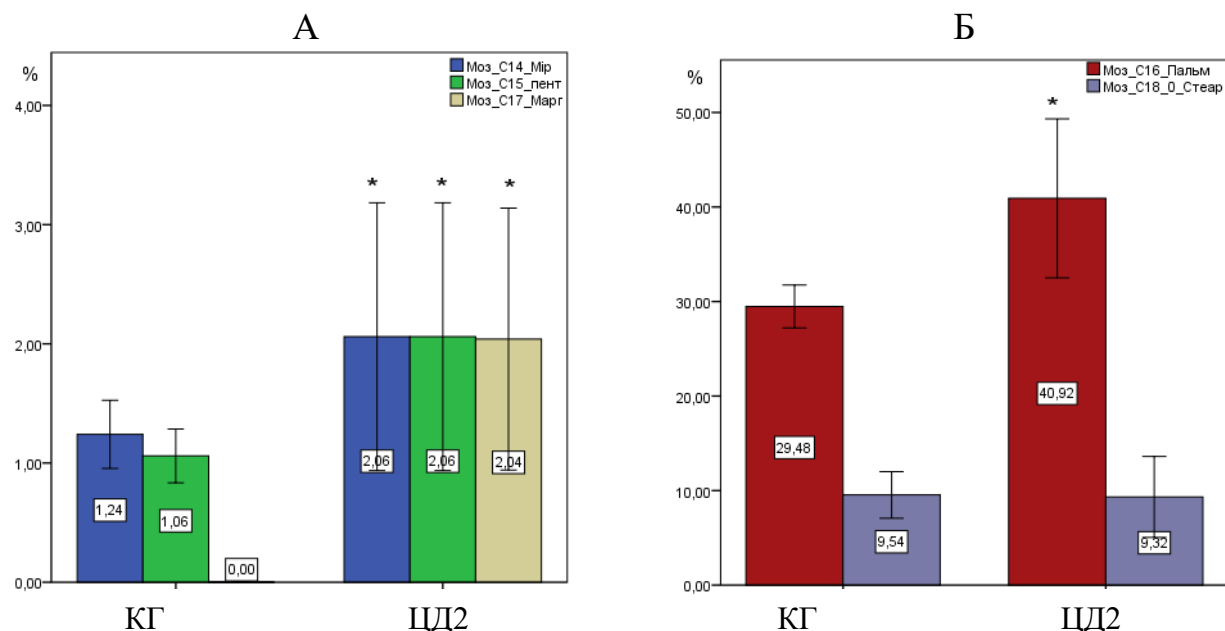


Рис. 3.6. Вміст ЖК в тканині *печінки* і щурів контрольної групи (КГ) та щурів, яким моделювали ЦД2 А – слідові насичені ЖК: С14:0 міристинова, С15:0 пентадеканова, С17:0 маргаринава; Б – основні насичені ЖК: С16:0 пальмітинова, С18:0 стеаринова; В – основні ненасичені ЖК: С18:1 олеїнова, С18:2 лінолева, С20:4 арахідонова; Г – слідова ненасичена ЖК ліноленова С18:3 * - відмінність із відповідним показником щурів КГ ($p < 0,05$).



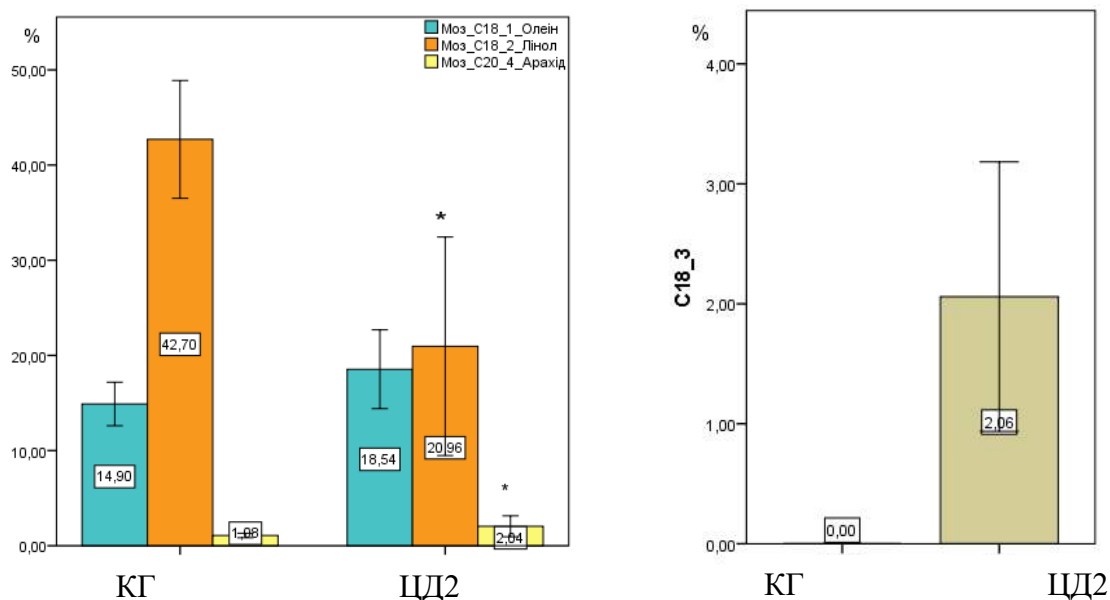


Рис. 3.7. Вміст ЖК в тканині *головного мозку* інтактних щурів (КГ) та щурів, яким моделювали ЦД2. А – слідові насичені ЖК: С14:0 міристинова, С15:0 пентадеканова, С17:0 маргаринова; Б – основні насичені ЖК: С16:0 пальмітинова, С18:0 стеаринова; В – основні ненасичені ЖК: С18:1 олеїнова, С18:2 лінолева, С20:4 арахідонова; Г – слідова ненасичена ЖК ліноленова С18:3 * - відмінність із відповідним показником щурів КГ (P<0,05).

Ми виявили, що моделювання ЦД2 шляхом HFD із додаванням фруктози та індукцією STZ викликає не однаковий перерозподіл жирнокислотного складу органів експериментальних тварин. Такі відмінності необхідно враховувати для призначення терапевтичних схем, мішенями яких є саме ЖК та їх вміст в клітинних мембранах, оскільки очікувані результати від лікування можуть по-різному проявлятися в роботі органів та систем організму. Особливий сенс це набуває при вивченні фармакологічної дії лікарських засобів на головний мозок, механізм яких передбачає вплив на клітинний склад ЖК.

Однак, спільною рисою змін жирнокислотного складу тканин у щурів при моделюванні ЦД2 шляхом HFD із додаванням фруктози та індукцією STZ було перерозподіл ЖК із суттєвим збільшенням насичених ЖК у порівнянні із КГ. В тканині печінки, і в тканині мозку вміст НЖК підвищився в 1,3 рази (p<0,05), за рахунок зниження ННЖК в 1,3 рази (p<0,05), і зменшення в 1,8 разів долі ПНЖК (p<0,05). Для щурів КГ було характерним

незначне переважання ННЖК над НЖК із вмістом ПНЖК біля 40% і в печінці, і в мозку. Такий перерозподіл ЖК є абсолютно характерним для поєданого порушення ліпідного та вуглеводного обміну, який виникає у людини при розвитку МС і складає патогенетичну основу ЦД2. Проведений аналіз надає нам підставу вважати, що наша експериментальна модель відтворює в організмі тварин характерні зміни, що виникають на тлі ЦД2 і це доводить нам адекватність моделі.

Після введення препаратів на тлі ЦД2 протягом 2 тижнів ми визначили рівень глюкози в групах, для оцінки впливу рівня гіперглікемії на структури нервової тканини, навіть на тлі фармакологічної корекції (рис. 3.8). Вимірювання рівня глюкози крові в групах щурів перед виведенням із експерименту показало наступні результати: КГ $4,83 \pm 0,39$ ммоль/л, ЦД2 - $9,55 \pm 0,59$ ммоль/л, ЦД2+Мет $7,2 \pm 1,2$ ммоль/л, ЦД2+ПрК $9,35 \pm 1,1$ ммоль/л, ЦД2+Мет+ПрК $6,9 \pm 1,8$ ммоль/л.

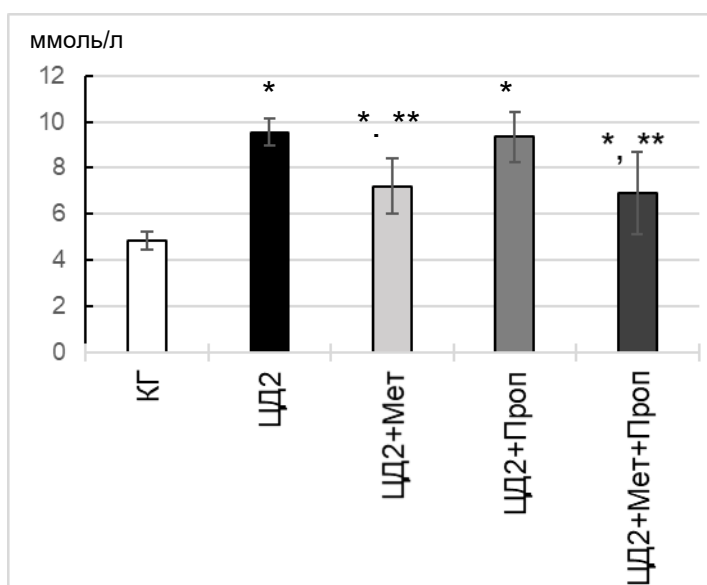


Рис. 3.8. Рівень глюкози в крові тварин контрольної групи та щурів із ЦД2, на тлі корекції препаратами: метформіну, пропіонату та їх комбінованого введення. * - відмінність із відповідним показником щурів КГ ($p < 0,05$), ** - відмінність із відповідним показником щурів ЦД2 ($p < 0,05$),

Введення метформіну щурам із ЦД2 протягом 2 тижнів викликає достовірне зменшення рівня глюкози в 1,3 разі ($p < 0,05$) відносно тварин із

ЦД2, але показник залишається в 1,5 рази ($p < 0,05$) достовірно вище ніж у КГ. Такий же характер має рівень глюкози в групі комбінованого введення препаратів (ЦД2+Мет+Проп), рівень глюкози менше ніж в ЦД в 1,4 рази ($p < 0,05$), але також в 1,4 рази вище ніж в КГ. Введення пропіонату не знижує рівень глюкози в крові щурів із ЦД2 і він практично не відрізняється від показника групи ЦД2.

Висновок. У щурів з експериментальним ЦД2 достовірно збільшуються показники маси тіла, виникає стійка гіперглікемія, інсулінорезистентність, суттєво змінюється розподіл ЖК в тканинах, підвищується вміст насичених ЖК, як відображення структурних змін на тлі порушення вуглеводного і ліпідного обміну. Корекція препаратами не встановлює показники глюкози до рівня контролю, але на тлі введення метформіну спостерігається достовірне зменшення гіперглікемії у порівнянні із групою ЦД2.

РОЗДІЛ 4

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ НЕЙРОНІВ ВЕНТРОМЕДІАЛЬНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ІЗ ЦД2 ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ

4.1. Ультраструктурні зміни ER у VMH щурів на тлі ЦД2 і після введення метформіну та пропіонату

Електронномікроскопічне дослідження (рис. 4.1) показало, що при ЦД2 у більшості нейронів підвищена електронна щільність цитоплазми та ядра. У цитоплазмі таких клітин у порівнянні з контролем елементи комплексу Гольджі частково фрагментовані, каналці гранулярної ендоплазматичної сітки - розширені. На мембранах каналців ендоплазматичної сітки виявляється невелика кількість прикріплених рибосом. Більшість цих органел десквамовані з каналців і розміщуються у цитоплазмі, де вони формують своєрідні скупчення - полісоми, що, вірогідно, зумовлено синтезом білків для власних потреб клітин з метою відновлення структурних компонентів. Такі комплексомікси сприяють підвищенню візуальної електронної щільності нейронів. Більшість мітохондрій мають ушкоджену структурну організацію, що пов'язано, як з набряком матрикса цих органел, так і деструкцією крист. В більшості – деструкція крист є досить виразною і приводить до утворення мітофагосом, за рахунок вибіркового ушкодження мітохондрій.

Стан ЦД2 характеризується значною кількістю нейронів, ядра яких пікнотично змінені з появою глибоких інвагінацій ядерної мембрани, а у деяких клітинах спостерігається фрагментація ядер. Переважають нейрони апоптозно змінені із втратою відростків та вирівнюванням плазматичної мембрани. Світлі нейрони практично не виявлялись. У нейропілі виявляється набряк синаптичних терміналей з втратою пухирців. В оточенні нейронів

виявляються астроцити з набряклою цитоплазмою та невеликою кількістю органел.

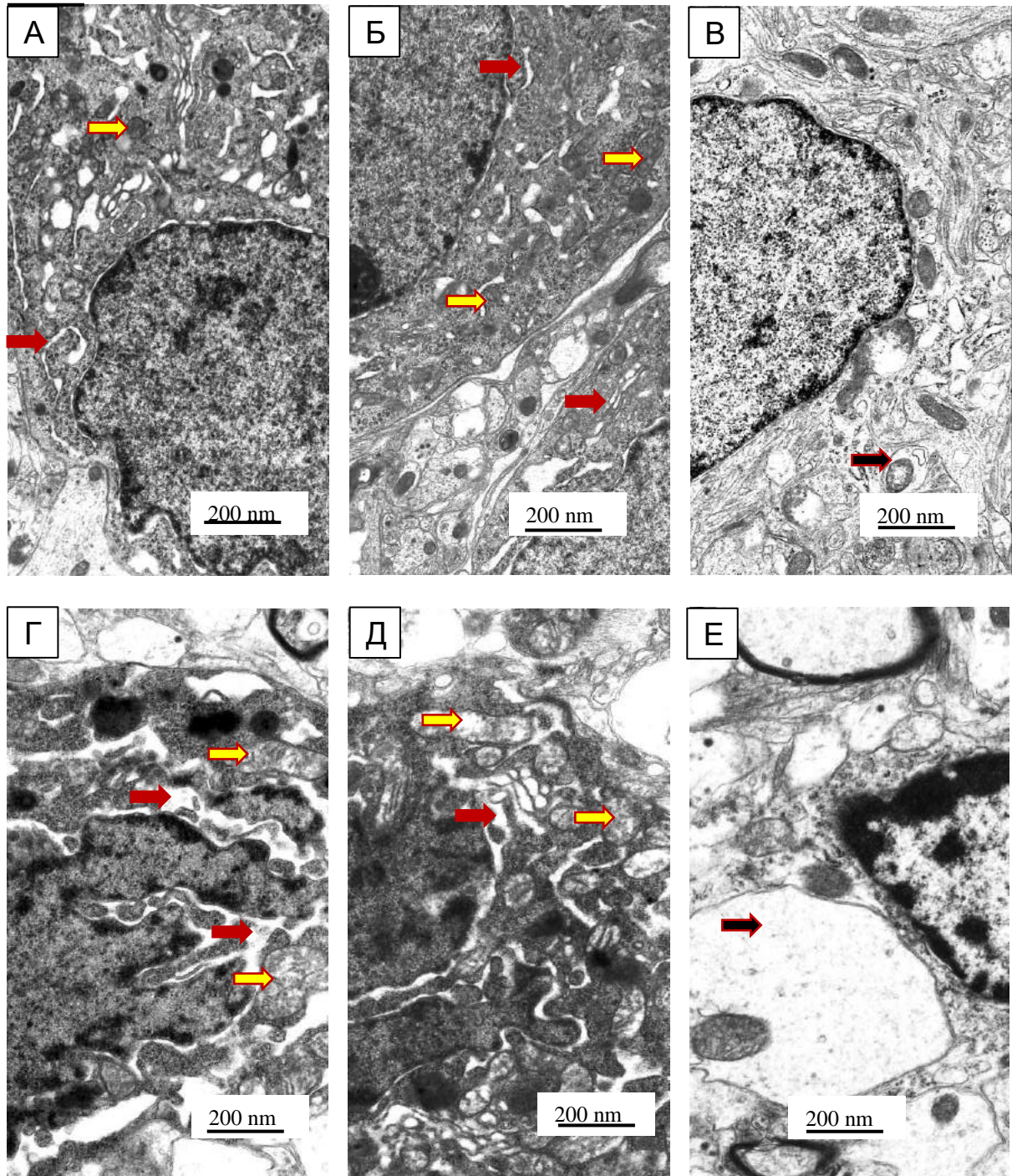


Рис. 4.1. Ультраструктурні зміни нейронів НVM та гліальних клітин вивчені за допомогою електронної мікроскопії ($n = 12$ нейронів для кожної групи): А,Б,В, - контрольні щури; Г,Д,Е - щури групи ЦД2. Зображення нейронів А, Б, Г,Д; гліальні клітини - на В,Е. Червоні стрілки позначають ЕР, жовті стрілки - мітохондрії, чорні стрілки - нейропільний набряк. Шкала: 200 нм.

Введення препаратів змінювало картину і ушкодження зменшувалися (рис. 4.2). У нейронах був добре виражений комплекс Гольджі, цистерни якого у більшості клітин практично не відрізнялися від контролю. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки були добре збережені і, на них чітко виявлялися рибосоми, розміщені на поверхні канальців, а не скупчені у цитоплазмі, як при ЦД2.

Особливістю нейронів НVM при застосуванні **метформіну** було наявність клітин з накопиченням гранул ліпофусцину у цитоплазмі. Також, визначалися зміни, що характеризувалися як реактивний астрогліоз, у вигляді гіпертрофії астроцитів та їх проліферації. У мієлінових волокнах спостерігається набряк аксоплазми, накопичення у ній аутофагосом та ушкодження мієлінової оболонки у вигляді розширених секвестрів.

При застосуванні **пропіанату** у нейронах НVM була значно підвищена кількість аутофагосом (рис. 4.3). При чому, мікропухирці виявлялися досить часто, як первинні з подвійною мембраною, так і вторинні з одинарною мембраною та вмістом клітинного детриту, що є вираженням накопичення аномальних білків. Дослідження нейронів при застосуванні пропіанату вказує на візуальне зменшення кількості преапоптозних темних клітин з пікнотично зміненими ядрами. При цьому переважає кількість світлих клітин з великими світлими ядрами, у яких підвищена, у порівнянні з контролем, кількість глибоких інвагінацій, що може свідчити про розвиток компенсаторно-приспосувальних процесів, направлених на збільшення площі контакту ядра і цитоплазми. Практично тільки у поодиноких клітин спостерігається часткове розширення перинуклеарного простору ядра. Хроматин розміщений рівномірно по ядру, превалює еухроматин, тобто активна форма хроматину. У інтерстиціальному просторі трапляються апоптозні тільця, що є свідченням апоптозних процесів. Астроцитарна глія практично у всіх клітинах без ознак набряку.

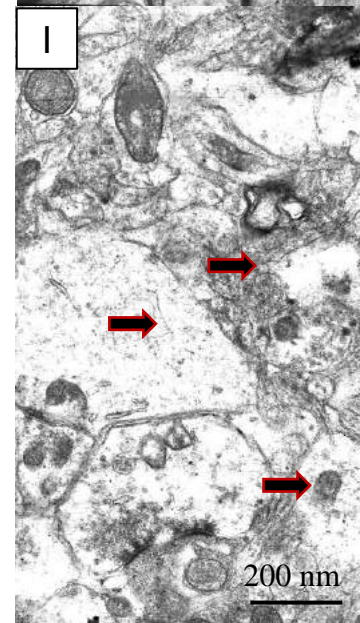
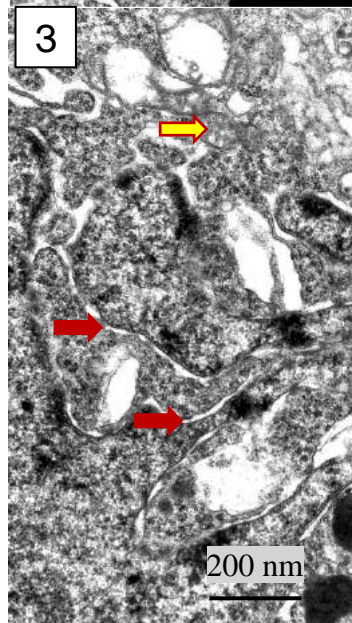
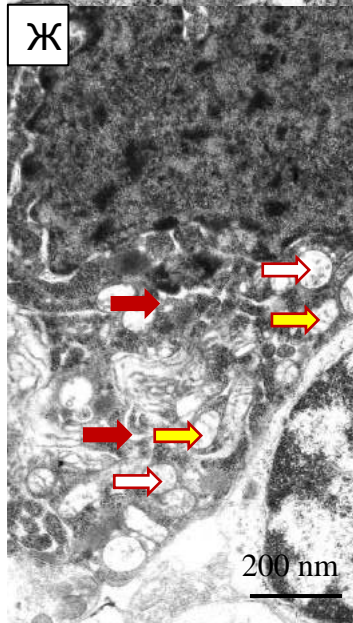
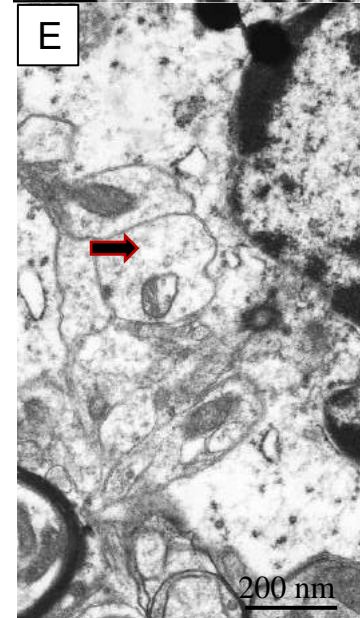
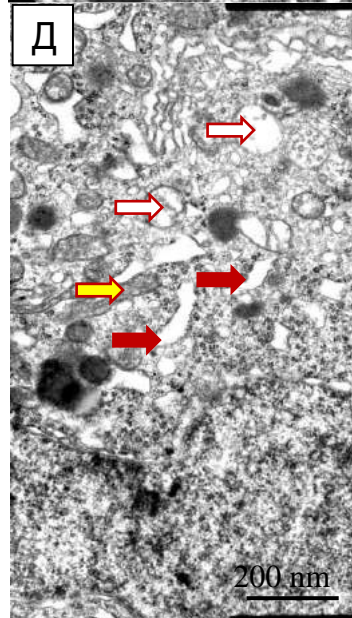
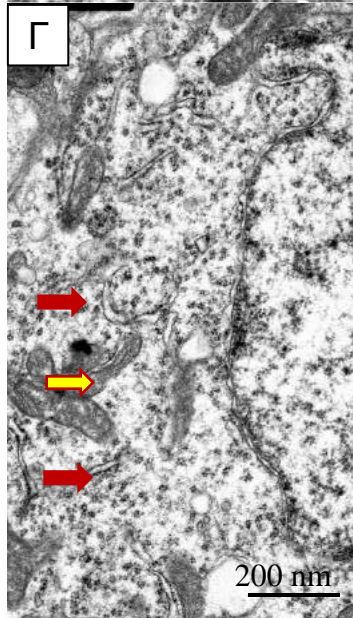
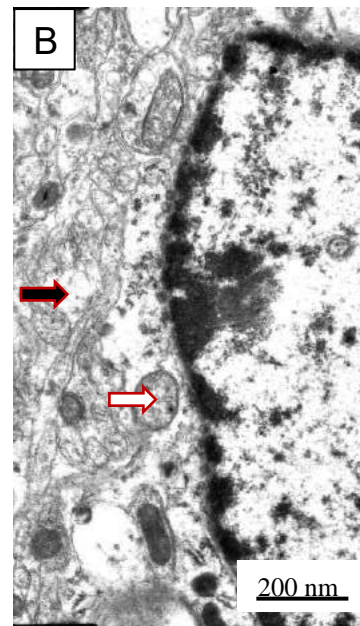
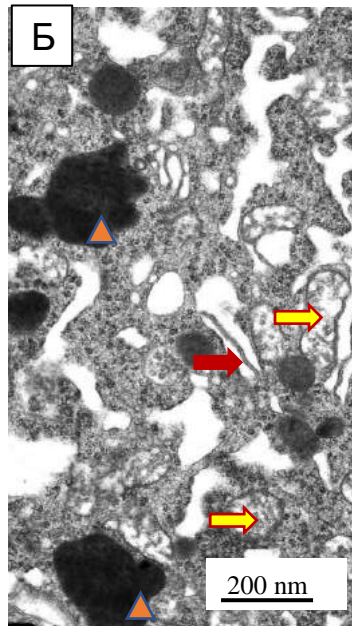
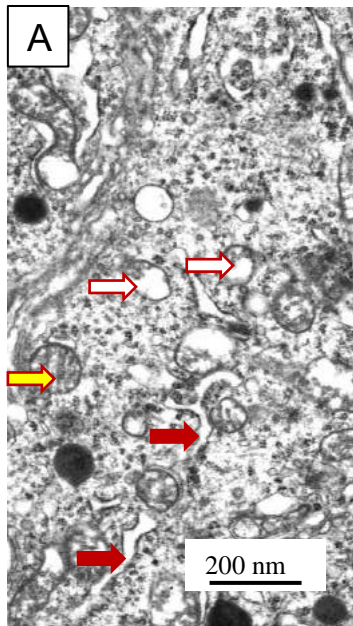


Рис. 4.2. Ультраструктурні зміни нейронів НVM та гліальних клітин що оцінювали за допомогою електронної мікроскопії, (n = 12 нейронів для кожної групи): А, Б, В – нейрони щурів групи ЦД2+Мет; Г,Д,Е – групи ЦД+Пропіонат; Ж,З, І – групи ЦД2+Мет+Пропіонат. Зображення нейронів на А, Б, Г,Д, Е, Ж,З; а гліальні клітини - на В, Е та І. Червоні стрілки позначають ER, жовті стрілки - мітохондрії, білі стрілки - аутофагосоми, чорні стрілки - набряк нейропіля, трикутники- ліпофусцин. Шкала: 200 нм.

Комбіноване введення цих препаратів метформіну та пропіонату призводить до підвищення наявності мікрогліальних клітин та зменшення майже удвічі світлих нейронів, у порівнянні з контрольною групою. Також в групі групи ЦД2+Мет+Пропіонат спостерігається значно більше, ніж у контролі преапоптозних та апоптозних нейронів, що, очевидно, активізує мікроглію. Однак, кількість апоптотичних нейронів в групі ЦД2+Мет+Пропіонат є меншою ніж у групі ЦД2. У світлих клітинах виражені каналці ендоплазматичної сітки на яких присутня незначна кількість рибосом. У темних клітинах більш розширені цистерни та пухирці комплексу Гольджі. Мітохондрії, як правило, повністю, або частково набрякли, на тлі підвищеної кількості лізосом та ліпофусцину, у порівнянні з контрольною групою. Ядра світлих нейронів мають значно більше інвагінацій ядерної оболонки ніж у темних клітинах. Біля більшості темних нейронів виявляються астроцити із значно менш вираженим набряком ніж в групі ЦД2.

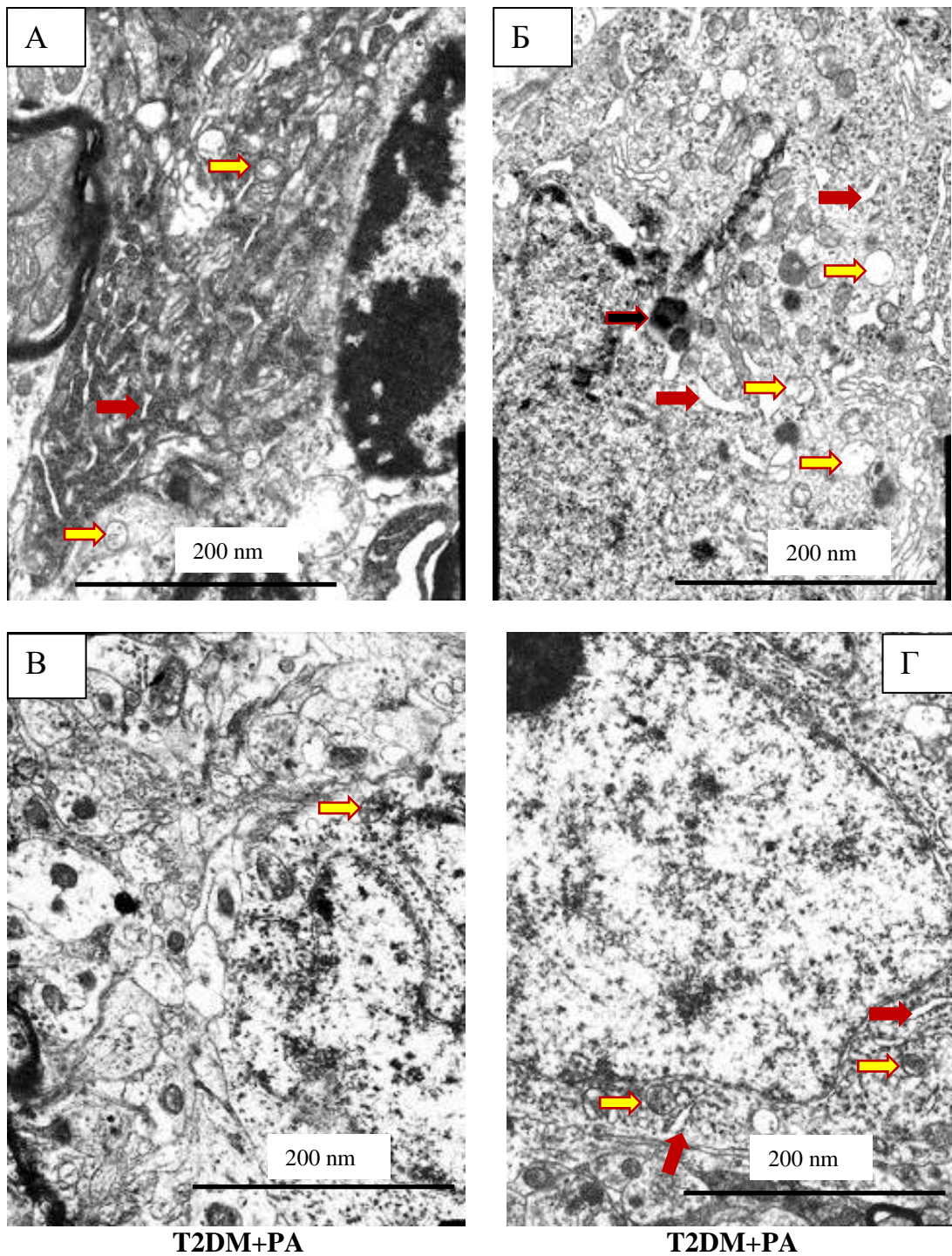


Рис. 4.3. Ультраструктурні ознаки активації аутофагії в нейронах НVM щурів групи ЦД2+Пропіонат, що оцінювали за допомогою електронної мікроскопії, (n = 12 нейронів у групі). Червоні стрілки позначають ЕР, жовті стрілки - аутофагосоми, чорні стрілки - лізосоми. Шкала: 200 нм.

4.2. Кількісні показники ультраструктурних змін ER у НVM щурів з ЦД2 після введення метформіну та пропіонату

Кількісне вимірювання параметрів ER показало збільшення цистерн ER у групі ЦД2 порівняно з контролем та збільшення їх відносної площі в 2,25 рази ($p = 0,024$) (табл. 4.1). Відносна площа мембран ER не змінювалась у групі ЦД2 порівняно з контролем; таким чином, співвідношення цистерн/мембран також зросло у 2 рази ($p=0,046$) проти контролю. Загальна доля ER у нейронах щурів з ЦД2 зросла на 19%, а відношення площі перинуклеарного простору до довжини периметра ядра підвищилося на 44% ($p = 0,038$) проти контролю.

Введення препаратів спричиняло різноспрямовані зміни параметрів ER. Відносна площа мембран ER поступово зменшувалась у групах ЦД2+Мет, ЦД2+Пропіонат та ЦД2+Мет+Пропіонат на 22% ($p=0,048$), 33% ($p=0,039$) та 62% ($p=0,019$) відповідно до групи ЦД2. Крім того, метформін сприяв зменшенню відносної площі цистерн ER у щурів ЦД2 на 36% ($p=0,046$) проти ЦД2, однак цей параметр залишався на 65% вищим, ніж у контролі ($p=0,046$). Метформін не впливав на співвідношення цистерн/мембран порівняно з ЦД2. Загальна доля ER у клітині та відношення площі перинуклеарного простору до довжини периметра ядра не показали значних змін у групі ЦД2+Мет порівняно з контрольними та щурами ЦД2.

Введення пропіонату зменшило співвідношення цистерн/мембран до контрольного значення в основному за рахунок одночасного зменшення площі цистерн ER: на 40,5% ($p = 0,055$) проти контролю, у 3 рази ($p = 0,009$) проти ЦД2, у 2,3 рази ($p = 0,026$) проти значень групи (ЦД2+Мет); та зменшення відносної площі мембран на 38% ($p = 0,01$) проти контролю, на 49% ($p = 0,009$) проти ЦД2, на 16% ($p = 0,045$) проти значень групи (ЦД2+Мет). Загальна частка ER у клітині та відношення площі перинуклеарного простору до довжини периметра ядра також зменшувались після дії пропіонату порівняно з контрольною групою 39%, ($p = 0,045$) та з ЦД2 на 66%, ($p = 0,03$) і порівняно

з усіма трьома групами відповідно: на 38% ($p = 0,03$) проти контролю, на 49% ($p = 0,023$) проти ЦД2 і на 16% ($p = 0,045$) проти значень групи ЦД2+Мет.

Таблиця 4.1.

Кількісні показники ультраструктурних змін ЕР у НVM, ум од.

Групи	КГ	ЦД2	ЦД2+Мет	ЦД2+Пропіонат	ЦД2+Мет+Пропіонат
Відносна площа мембран ЕР	0.453±0.05	0.488±0.02	0.379±0.06**	0.327±0.05**,#	0.302±0.03**
Відносна площа цистерн ЕР	0.052±0.01	0.117±0.02	0.086±0.01**	0.037±0.006**,#	0.034±0.008**,#
Спів-відношення цистерн/мембран	0.114±0.028	0.239±0.053*	0.226±0.019*	0.113±0.006**,#	0.112±0.019**,#
Загальна доля ЕР у клітині	0.505±0.059	0.605±0.038	0.465±0.076	0.364±0.063**	0.336±0.045**
Відношення площі перинуклеарного простору до довжини периметра ядра	0.034±0.005	0.049±0.012	0.038±0.009	0.019±0.005**,#	0.027±0.007*

Примітка: Значення наведені як середнє ± SEM (n=12) в ум. Од.; * $p < 0.05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0.05$ у порівнянні із показниками групи ЦД2, # $p < 0.05$ у порівнянні із показниками групи ЦД2+Мет, @ $p < 0.05$ vs. 05 у порівнянні із показниками групи ЦД2+Пропіонат

Комбіноване введення пропіонату та метформіну призводило до суттєвого зниження відносної площі мембран ЕР на 50% ($p=0,03$) проти контролю, на 62% ($p=0,019$) проти ЦД2; відносної площі цистерн на 53% ($p=0,052$) проти контролю, у 3,4 рази ($p=0,008$) проти ЦД2, у 2,5 рази ($p = 0,024$) проти значень групи ЦД2+Мет; та зменшувало загальну долю ЕР в клітині на 50% ($p=0,038$) проти контролю, на 80% ($p=0,019$) проти ЦД2.

Комбіноване уведення препаратів приводила до повернення співвідношення цистерн/мембран та відношення площі перинуклеарного простору/довжини периметра ядра нейронів щурів з ЦД2 до контрольних значень.

Одже, після індукованого експериментальною моделлю ЦД2 збільшені параметри ER (відносна площа мембран ER, відносна площа цистерн та загальна частка ER в клітині) знижувались, але у різній мірі при введенні метформіну, пропіонату та їх поєднання. Показники співвідношення цистерн/мембран та відношення площі перинуклеарного простору/довжини периметра ядра нейронів практично наближались до значень контролю за умов корекції стану поєднанням препаратів.

Висновок. За допомогою електронної мікроскопії в VMH на тлі ЦД2 виявлена максимальна кількість апоптотичних нейронів, набряк нейропілю та зміни ER: збільшення відносної площі цистерн в 2,25 рази ($p=0,024$), розширення перинуклеарного простору 44% ($p=0,038$). Введення препаратів зменшувало відносну площу цистерн ER: метформін на 36% ($p=0,046$); пропіонат в 3 рази ($p=0,009$), а комбінація ліків в 3,4 рази ($p=0,008$). Загальна доля ER у клітині зменшувалась після дії пропіонату на 66% ($p=0,03$); комбінації ліків на 80% ($p=0,019$). Співвідношення цистерн/мембран близьке до контрольних значень спостерігали лише при введенні пропіонату та комбінації ліків. При введенні пропіонату у структурах VMH виявлена максимальна кількість аутофагосом. На підставі отриманих даних, ми висловлюємо припущення, що утворення мікропухирців відбувається за рахунок відшнуровування частки мембрани ER для ізоляції пошкоджених протеїнів і їх утилізації ERAD-системою.

РОЗДІЛ 5

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ ТА UPR-СИСТЕМИ НЕЙРОНІВ НУМ ЩУРІВ ІЗ ЦД2 ТА ЗА УМОВ ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Порушення внутрішньоклітинного гомеостазу, викликане ЦД2, призводить до стресу ER і тісно пов'язаної компенсаторної відповіді на стрес - активацією програми UPR (відповіді неструктурованих протеїнів, англ., UPR - unfolded protein response). За сучасним уявленням [25, 107], система UPR, складається з білка-шаперону - GRP78, та трьох трансмембранних протеїнів, що в стані спокою зв'язані із GRP78: РНК-подібної ER-кінази протеїнкінази (PERK), активуючого фактора транскрипції 6 (ATF6) та ферменту, що потребує інозиту (IRE-1) (рис. 5.1).

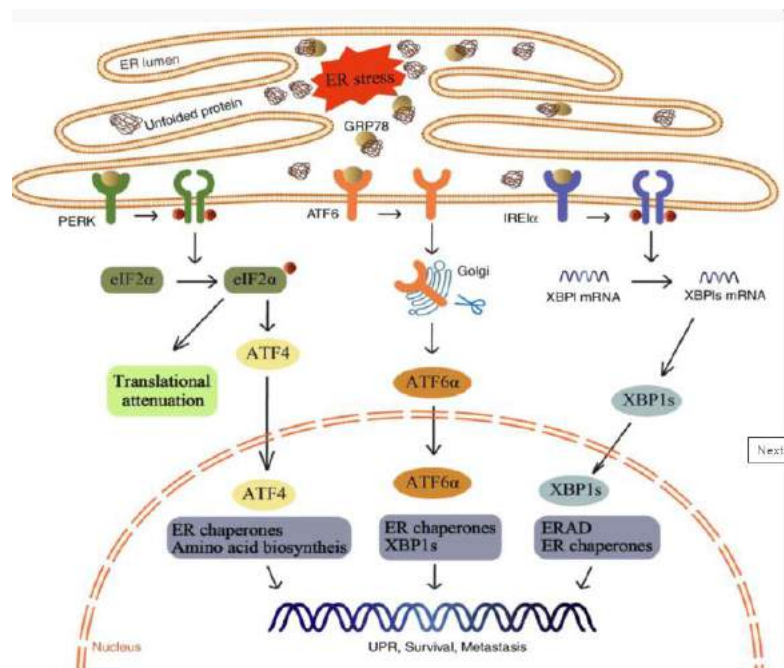


Рис. 5.1. Універсальна схема взаємодії компонентів ER- стресу та UPR-системи в клітині (Мао,2019). GRP78 - шаперон, PERK, ATF6 та IRE-1 - трансмембранні протеїни. В ядрі - активація транскрипції синтезу компонентів, в тому числі ERAD-системи.

Для оцінки стану UPR-системи, ми оцінювали розподіл GRP78 у VMH шляхом імуногістохімічного фарбування, вимірювали рівні всіх компонентів

за допомогою вестерн-блоттингу і оцінювали внутрішньоядерну транскрипцію, шляхом вимірювання мРНК за допомогою ПЦР-реал тайм.

5.1. Імуногістохімічна оцінка експресії GRP78 у VMH

Вивчення імуногістохімічних препаратів показало, що у тварин контрольної групи в VMH спостерігається виразна експресія GRP78. Більшість нейронів демонструвало помірне маркування цитоплазми, яке було нерівномірно гомогеним, а місцями можна було бачити більш інтенсивні забарвлені маленькі ділянки (Рис. 5.2). Висока експресія GRP78 спостерігалася у станках кровоносних судин, а в нейронах спостерігалася рідко. Деякі гліоцити мали окремі слабо марковані грудочки, що розташовувалися безпосередньо поряд з ядром. У нейропілі у невеликій кількості виявлялися гранули зі слабою або, рідше, помірною інтенсивністю маркування.

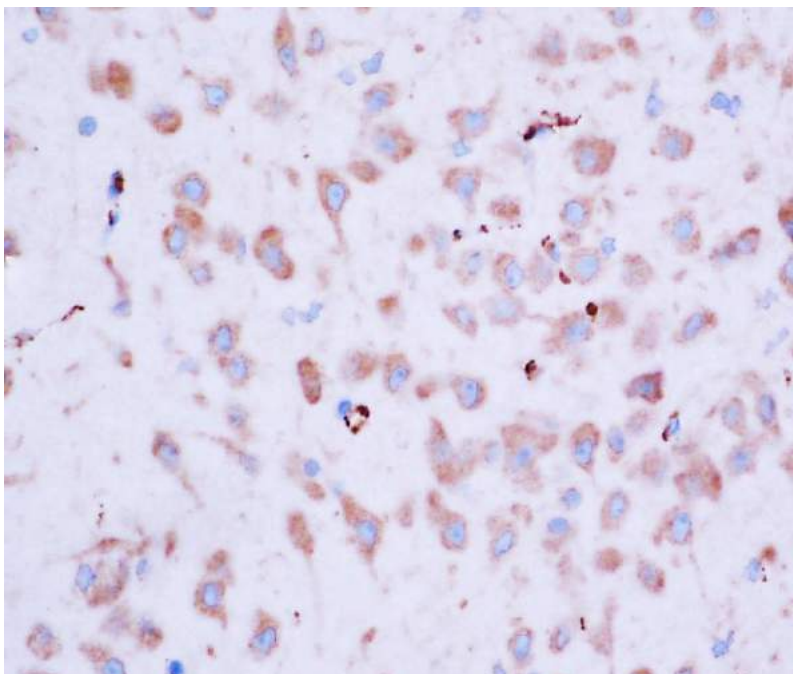


Рис. 5.2. Експресія GRP78 у клітинах VMH щура контрольної групи. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

У тварин із ЦД2 спостерігалось різке зниження експресії GRP78 у клітинах VMH (Рис. 5.3). При цьому більшість нейронів демонструвало низький рівень маркування. Забарвлення було не гомогенним як у контролі, а набувало вигляд дрібної зернистості. У гліоцитах лише зрідка можна було бачити окремі імунореактивні дрібні гранули поряд з ядром. У нейропілі виявилися пиловидні гранули зі слабою експресією GRP78.

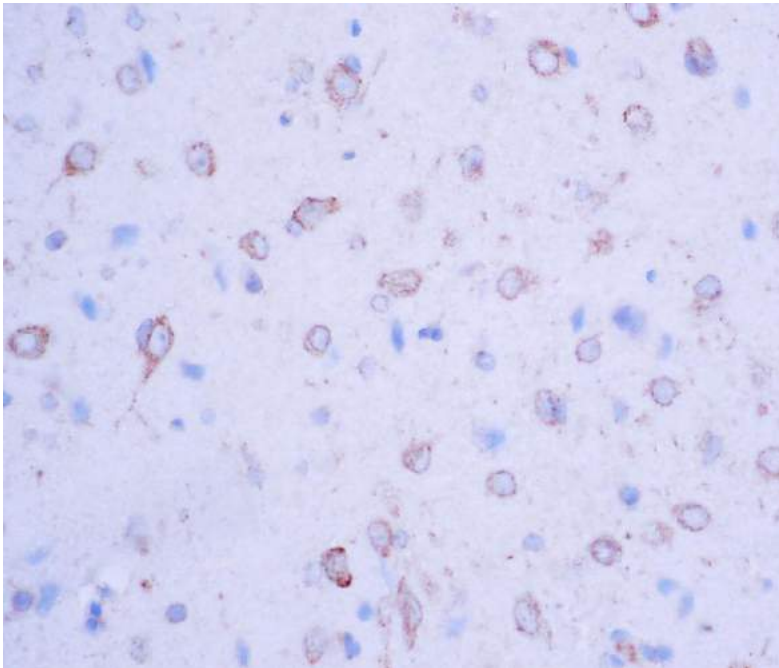


Рис. 5.3. Зниження експресії GRP78 у клітинах VMH щура з ЦД2. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

У щурів з ЦД2, що отримували лікування метформіном у цілому відмічалось зростання експресії GRP78 в клітинах VMH (Рис. 5.4). Але її зростання у нейронах відбувалось нерівномірно. В деяких з них вона була високою і практично дорівнювала ступеню контролю. У більшості клітин вона була середньою, або залишалася низькою. При цьому мічення цитоплазми нейронів ставало більш гомогенним, ніж у тварин з ЦД2, в зв'язку з чим наближалось до того, як виглядало у контролі. У частині гліоцитів також як і у попередніх груп могли виявлятися слабкі мітки в колоядерній ділянці. Але кількість таких клітин була більшою ніж у контролі та при ЦД2. У нейропілі

виявлялися у невеликій кількості слабо мічені гранули або невеличкі структури неправильної форми.

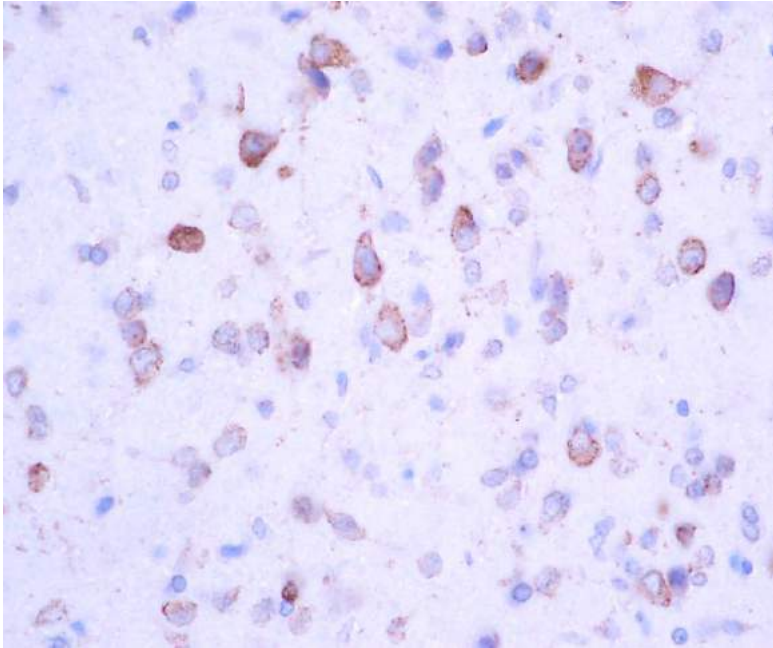


Рис. 5.4. Нерівномірне зростання експресії GRP78 у клітинах VMH щура з ЦД2, що отримували лікування метформіном. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

У щурів з ЦД2, що отримували пропіонат, як і у попередній групі спостерігалось зростання експресії GRP78 у клітинах VMH (Рис. 5.5). При цьому дещо більше нейронів мали високу інтенсивність мітки, ніж при застосуванні метформіну. Разом з тим значна кількість клітин цього типу мітилася слабо. У гліоцитах експресія GRP78 визначалася рідше і була на низькому рівні. Також менше мічених структур виявлялося у нейропілі.

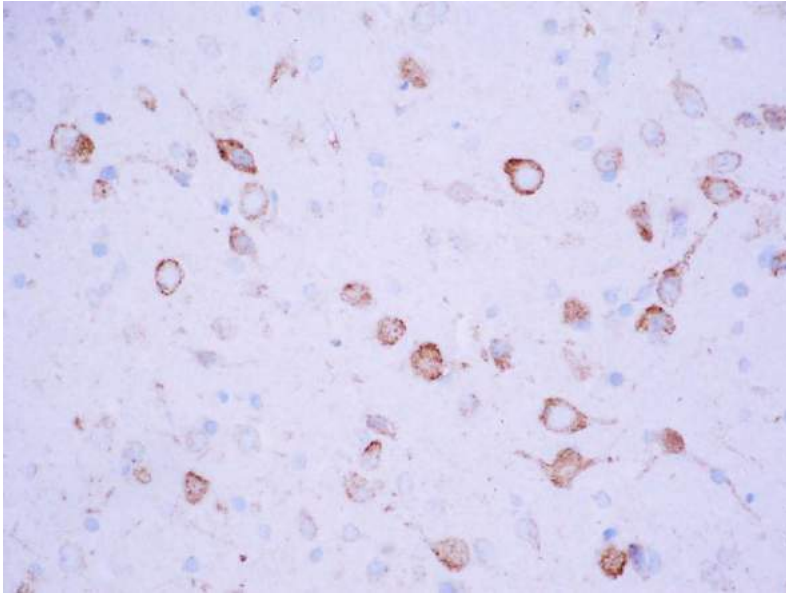


Рис. 5.5. Експресія GRP78 у клітинах VMH щура з ЦД2, при введенні пропіонату. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

У групі тварин з ЦД2, що отримували комбіноване уведення метформіна з пропіонатом спостерігалось виразне відновлення експресії GRP78 у клітинах VMH (Рис. 5.6). За цих умов значна частина нейроцитів виявляла виразну експресію GRP78. Разом з тим маркування їх цитоплазми носило виразний гранулярний характер, а не дифузний, як у контролі. Крім того значна кількість клітин мала нерівномірний розподіл гранул хромогена у цитоплазмі – визначалися ділянки з високою їх щільністю, так і з відсутністю.

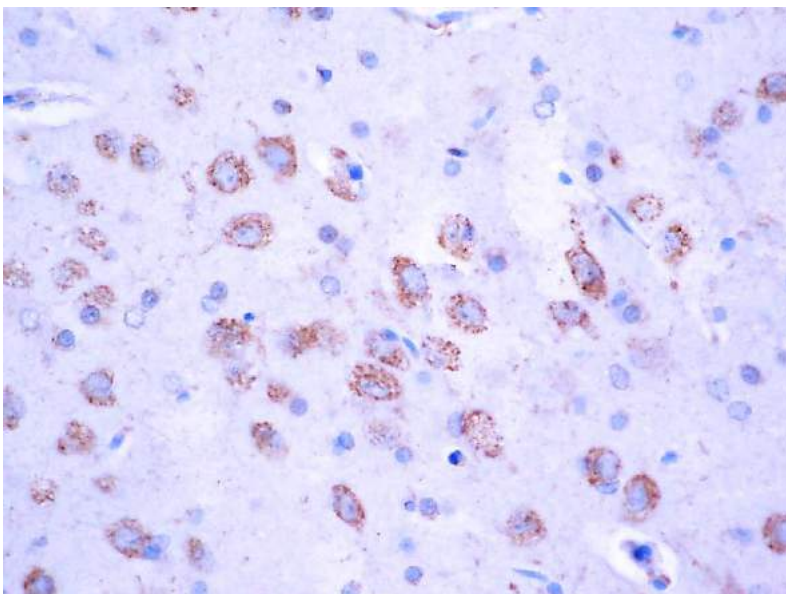


Рис. 5.6. Експресія GRP78 у клітинах VMH щура з ЦД2, що отримували комбіноване уведення метформіну з пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

Окремі нейрони не експресували GRP78. Деякі гліоцити також демонстрували наявність поодиноких гранул хромогену безпосередньо поряд з ядром. У нейропілі виявлялася невеличка кількість пиловидних імунореактивних гранул з низьким рівнем маркування.

За даними ІГХ ми виконали напівкількісну оцінку протеїну в цитоплазмі (рис. 5.7) і виявили наступну залежність.

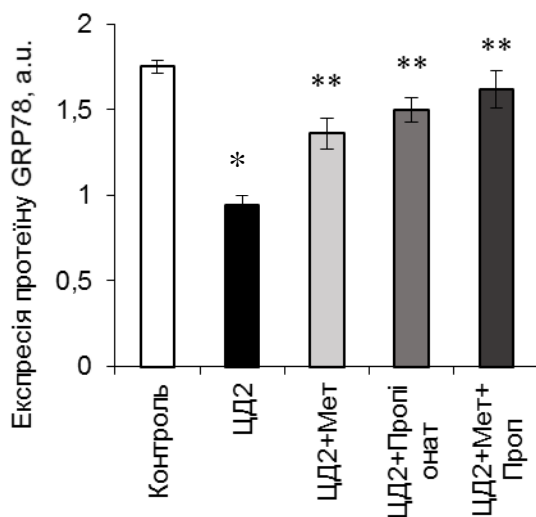


Рис. 5.7. Репрезентативна гістограма напівкількісної оцінки результату імуноцитохімічного аналізу GRP78-позитивних клітин VMH. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із введенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із введенням пропіонату.

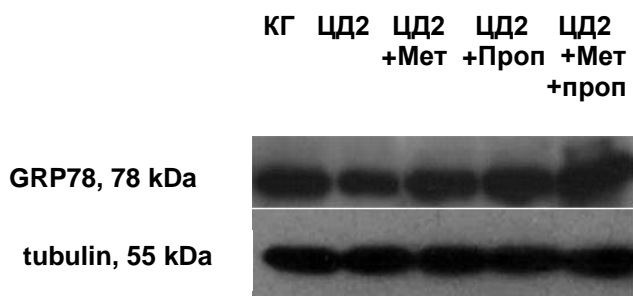
На тлі ЦД2 в нейронах гіпоталамусу спостерігається достовірне зменшення вмісту білка GRP78 в цитоплазмі практично вдвічі. Введення препаратів підвищують вміст протеїну, але комбіноване уведення метформіну з пропіонатом відновлює вміст протеїну практично до кількості, що спостерігалася в КГ.

5.2. Кількісна оцінка маркерів стану UPR-системи

За допомогою вестерн-блот аналізу, ми також виявили (рис. 5.8), що рівень білка GRP78, як головного регулятора UPR-системи, у VMH був у 2,1 рази ($p=0,005$) нижчим у групі ЦД2, ніж у контрольній, що відображає порушення внутрішньоклітинного гомеостазу та можливу протеотоксичність. Вважаємо, що зниження вмісту білка GRP78 в цитоплазмі, це реакція шаперону на наявність в ER пошкоджених протеїнів і результат його секвестрації в ER для зв'язування із місфолдінговою продукцією. Водночас, рівень GRP78 мРНК на тлі ЦД2 не змінювався.

Введення метформіну підвищило рівень білка GRP78 порівняно з ЦД2 в 1,97 рази ($p = 0,048$) і практично відновило до контрольного значення на тлі дещо зниженого рівня мРНК GRP78 (у 1,56 рази ($p = 0,05$) проти контролю, у 1,72 раза ($p = 0,04$) порівняно з ЦД2. Введення пропіонату на тлі ЦД2 збільшувало GRP78 як на рівні транскрипції, так і на рівні трансляції: кількість білку підвищувалася у 2,56 рази ($p < 0,001$), але рівень мРНК GRP78 підвищувався лише на 33% ($p = 0,045$) проти групи ЦД2 відповідно. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом відновило рівень мРНК GRP78 до рівня контрольної групи, що віддзеркалилося підвищенням протеїну у 3,28 рази у порівнянні із ЦД2 ($p < 0,001$), що стало у 1,56 рази ($p = 0,011$), більше порівняно з контролем та на 1,28 рази ($p = 0,015$) більше ніж у групі ЦД2+Мет.

А



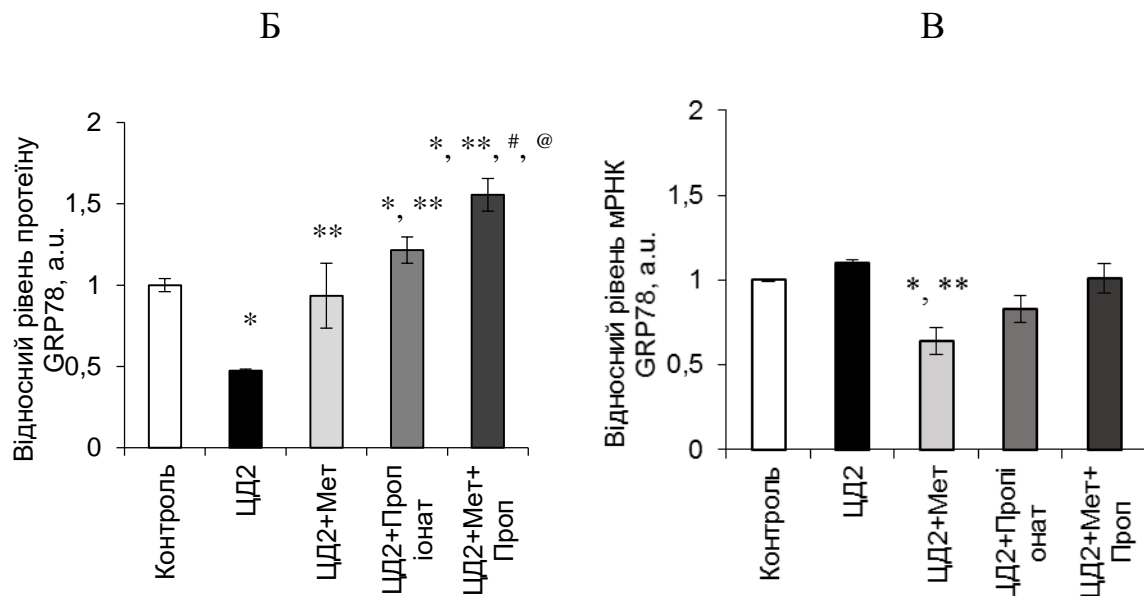


Рис.5.8. Зміна експресії шаперону GRP78/BiP у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

Примітка: А - репрезентативні імуноблотограми та Б - кількісно визначений рівень протеїну в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). На гістограмі (Б) наведений рівень GRP78 як середні значення \pm SEM ($n = 6$ у кожній групі). В - результат кількісної полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) GRP78 у VMH щурів: дані нормалізували до β -актину та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів ($n=6$ щурів у кожній групі). Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із уведенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із уведенням пропіонату.

Наступним кроком була оцінка основних компонентів клітинної системи сигналізації UPR-системи. У групі ЦД2 рівень білка PERK був підвищений у 3,61 рази ($p = 0,039$) проти контролю (рис. 5.8). Уведення препаратів призвело до подальшого збільшення вмісту PERK порівняно з контролем: метформіну - у 4,98 рази ($p = 0,008$), пропіонату - у 5,64 рази ($p = 0,001$). На відміну від цього, комбіноване введення метформіну з пропіонатом на тлі ЦД2 достовірно не змінювало рівень білка PERK, але воно було в 3 рази вище, ніж у контролі ($p = 0,002$). При оцінці рівню мРНК PERK (рис. 5.8), ми спостерігали стабільну експресію мРНК у контрольних групах, ЦД2, ЦД2+Мет та ЦД2+Мет+Проп, без статистично значущих відмінностей між ними. Однак введення пропіонату викликало тенденцію до підвищення рівня мРНК PERK на 38% порівняно з контролем ($p = 0,045$).

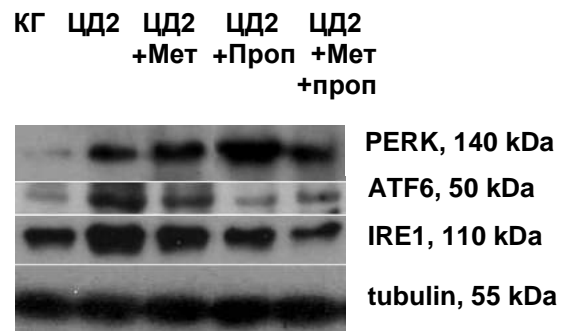
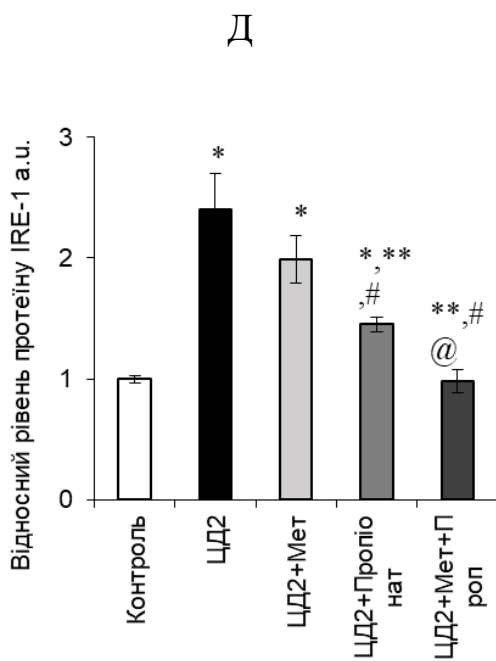
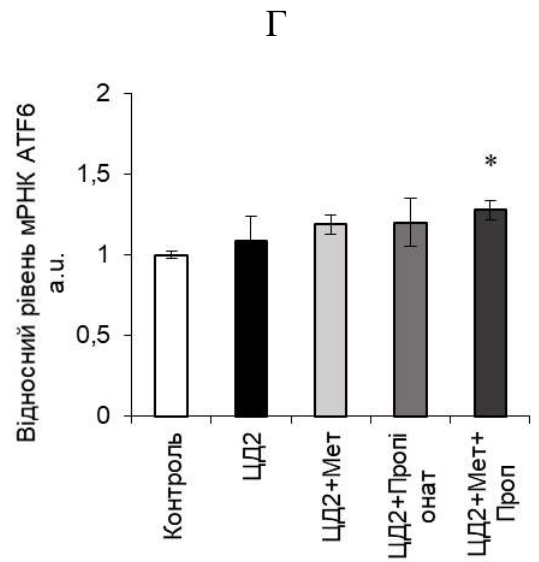
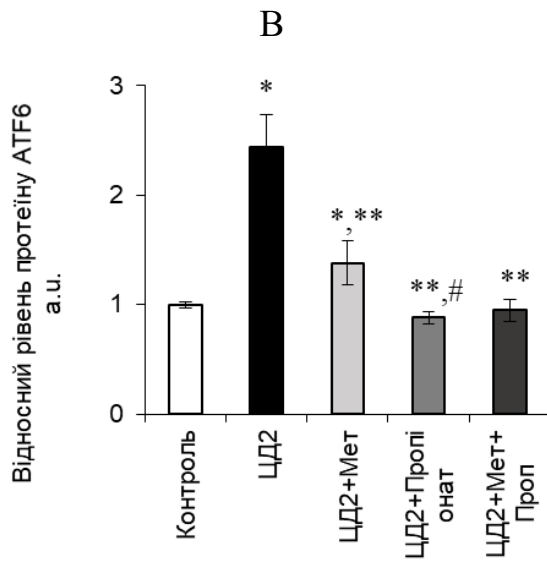
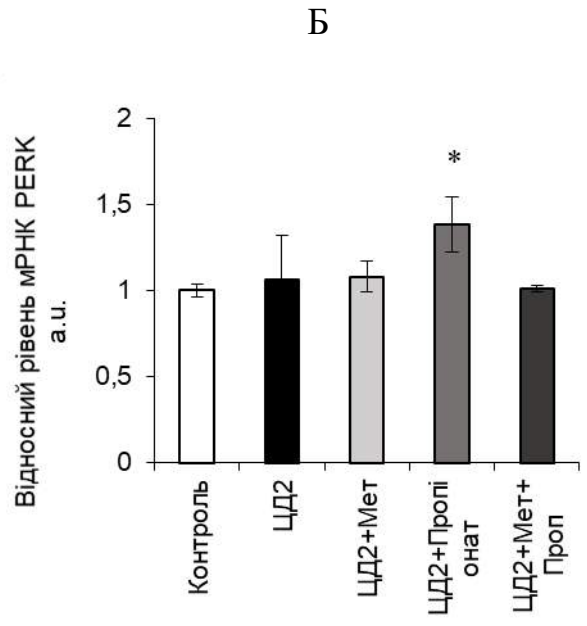
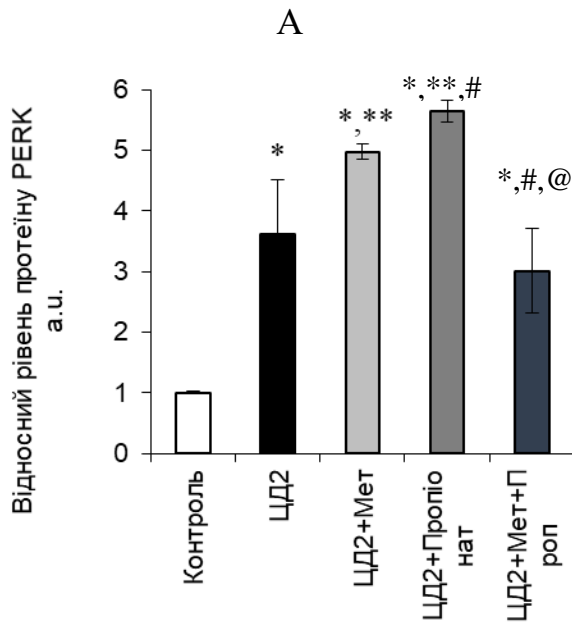


Рис. 5.8. Зміна експресії на основні компоненти UPR-системи - PERK, ATF6 та IRE1 у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

Кількісно визначені рівні протеїнів А - PERK, В - ATF6, Д - IRE1 в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). На гістограмах наведені дані як середні значення \pm SEM (n = 6 у кожній групі).

Результати кількісної ПЛР: Б - PERK, Г - ATF6 у VMH щурів: дані нормалізували до β -актину та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів (n=6 щурів у кожній групі). Е - репрезентативні імуноблоти. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * p < 0,05 у порівнянні із контролем, ** p < 0,05 у порівнянні із ЦД2, # p < 0,05 у порівнянні із введенням метформіну, @ p < 0,05 у порівнянні із введенням Пропіонату.

Наступним компонентом UPR-системи, рівень якого ми визначили, був ATF6, трансмембранний білок локалізований в ER. У групі ЦД2 спостерігалось підвищення рівня ATF6 у 2,44 рази (p = 0,02) у порівнянні із КГ, що відображає його посилену транслокацію при протеотоксичному стресі ER і, за даними літератури (Мао,2019), призводить до накопичення в апараті Гольджі. Введення метформіну призвело до зменшення вмісту ATF6 у 1,76 рази порівняно з ЦД2 (p = 0,008). Цікаво, що уведення пропіонату викликало більш виражений інгібуючий ефект на ATF6 і вміст протеїну зменшувався в 3 рази, (p < 0,001) проти ЦД2, та 1,23 рази, (p = 0,05) проти КГ, тоді як комбіноване уведення препаратів відновлювало ATF6 до контрольного значення. Ми також визначили вміст мРНК ATF6, але зміни на рівні мРНК були не такими значними, як на рівні білка. Не було статистично значущих відмінностей між контролем, ЦД2, групами ЦД2+Мет та ЦД2+Проп, проте комбіноване уведення призводило до тенденції збільшення мРНК ATF6 у 1,28 рази порівняно з контролем (p = 0,048).

Третім компонентом системи UPR, який ми досліджували, був протеїн IRE1, який вважається «найстарішим» компонентом системи. Відтворення ЦД2 призводило до максимального підвищення рівня білка IRE1 - в 2,4 рази (p = 0,001), але на тлі корекції спостерігали його зниження. Після введення метформіну рівень протеїну знижувався відносно ЦД2, але залишався в 2 рази (p = 0,021) вище КГ, після уведення пропіонату – підвищення порівняно

з контролем було в 1,45 рази ($p = 0,045$). Комбіноване уведення метформіну з пропіонатом нормалізувало вміст IRE1 для значень контролю.

Отже сукупність даних, які ми отримали за допомогою імунологічних методик (ІГХ та вестерн-блот аналізу), чітко демонструє, що стан ЦД2, який супроводжується стресом ER викликає в цитоплазмі нейронів зниження вмісту шаперону GRP78 і підвищення трансмембранних протеїнів, які були з ним зчеплені. Корекція препаратами призводить до встановлення рівня GRP78 в цитоплазмі, вірогідно за рахунок його синтезу, який, в свою чергу, активується на рівні ядерної транскрипції відповідних ділянок гену GRP78. Вважається, що ядерні транскрипційні процеси є результатом впливу датчиків UPR-системи. Наші дані дають нам підґрунтя висловити припущення, що активація ядерних процесів для синтезу GRP78 відбувалася через шляхи ATF6 і IRE1, оскільки, їх вміст в цитоплазмі зменшується, і, вірогідно, вони «використовуються» у ядрі.

Водночас, вміст PERK суттєво підвищується в цитоплазмі нейронів як при розвитку ЦД2, так і при корекції стану. Враховуючи, дані про гальмівний вплив протеїну PERK на ступінь загального фолдингу в клітині, можна думати стан ЦД2 вимушує нейрон знизити фолдинг (що є ознакою стресу ER), а корекція метформіном, або пропіонатом – в достатній мірі не сприяє виходу клітини із стресу ER, тому синтетичні процеси в нейроні продовжують гальмуватися. І в цьому сенсі, отримані дані про зниження вмісту протеїну PERK на тлі поєданого уведення препаратів виглядають як позитивна тенденція до встановлення в клітині спроможностей синтетичного апарату і певний вихід із стресу ER.

Варто підкреслити, що ми виявили суттєву різницю при порівнянні вмісту внутрішньоклітинних протеїнів UPR-системи, та інтенсивністю їх транскрипції в ядрі, яку вимірювали за рівнем мРНК. Ми вважаємо, що пояснити цю розбіжність можна тим, що цитоплазматичні процеси (накопичення протеїнів, руйнування, витрачання тощо) це більш реактивні процеси і вони можуть змінюватися під впливом екзогенних факторів, зокрема гіперглікемії, гіперліпідемії, впливу препаратів. Водночас,

транскрипція в ядрі певних ділянок ДНК і підвищення вмісту мРНК, мають більшу консервативність, у ряді випадків це генетично детерміновані. Тому, при компенсації стресу ЕР ми спостерігали більш виражені коливання PERK, ATF6 та IRE1 у нейронах VMH ніж процесів їх ядерної транскрипції.

Висновок: Встановлення внутрішньоклітинного гомеостазу, відновлення синтетичних процесів через UPR-систему у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції відбувається за певним сценарієм і алгоритмом, до якого залучені різні шляхи трансмембранних протеїнів PERK, ATF6, IRE1 і вони включаються у ефекторний шлях по мірі необхідності, нейтралізації протеотоксичності та убіквітинізації білків, пошкоджених в результаті стресу. Функціональною ознакою стресу ЕР на тлі ЦД2 в нейронах VMH було зниження у 2 рази рівню GRP78 та підвищення трансмембранних протеїнів PERK, ATF6, IRE1. Введення метформіну та пропіонату активує ядерну транскрипцію GRP78, через сигнальні шляхи ATF6, IRE1, але PERK шлях гальмує загальний фолдінг в клітині у 3-5 разів. За показниками UPR-системи найбільш протективний вплив на встановлення процесів синтезу у нейронах чинить комбіноване введення метформіну з пропіонатом.

РОЗДІЛ 6

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ МАРКЕРИ СТАНУ ГЛІЇ В ЗОНІ VMH ДЛЯ ОЦІНКИ НЕЙРОЗАПАЛЕННЯ НА ТЛІ ЦД2 ТА ЗА УМОВ ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Вважається, що у патогенетичній ланці розвитку ЦД2 та МС важливе місце займає лептінорезистентність гіпоталамічних нейронів. Етіологія цього стану остаточно не з'ясована і сьогодні існує лише теорії, які пояснюють втрату нейронами VMH регуляторних властивостей підтримки вуглеводного та глюкозного гомеостазу організму. Однією з причин виникнення лептінорезистентності нейронів вважається нейрозапалення. Також відомо, що важливим учасником процесу запалення нервової тканини є нейроглія (Caroline2017). Механізми активності глії VMH на тлі ЦД2 залишаються невиявленими. Оскільки пропіонова кислота, через вплив на імунну систему стінки кишечника, сприяє стимуляції Т-клітин, виділенню імунними клітинами речовин із властивостями нейротрансмітерів, гормонів, цитокінів тощо, які акцептуються нейроглією, нашим наступним кроком було оцінити вплив введення пропіонату на маркери мікроглії та астроцитів у VMH щурів із ЦД2.

Іонізована молекула 1 (Iba1), вважається маркером мікроглії та специфічним для макрофагів білком, що зв'язує кальцій. Вміст GFAP оцінюють як головний білок-маркер зрілих астроцитів, які представляють інший підтип гліальних клітин у центральній нервовій системі, рівень ZO-1 - конститутивного білка характеризує щільність з'єднання клітин. Щоб дослідити загальний внесок активації мікроглії в індуковану ЦД2 дизрегуляцію нейронів VMH, ми оцінювали розподіл Iba1 у VMH шляхом імуногістохімічного маркування. А також вивчали Iba1, GFAP, ZO-1 за допомогою вестерн-блот аналізу і оцінки внутрішньоядерної транскрипції мРНК генів цих протеїнів.

6.1. Імуногістохімічна оцінка вмісту Iba1 у VMH

Проведені спостереження показали, що у тварин контрольної групи в VMH виявляється помірна кількість Iba-1-позитивних клітин (Рис.6.1). Їх тіла мають маленькі розміри. Вони містять щільне ядро оточене неширокою смужкою цитоплазми яка виявляє імунореактивність до білку Iba-1. Від тіл клітин відходять декілька відростків які помірно галузяться. Рівень експресії Iba-1 як у тілах так і у відростках у більшості елементів визначається як помірний.

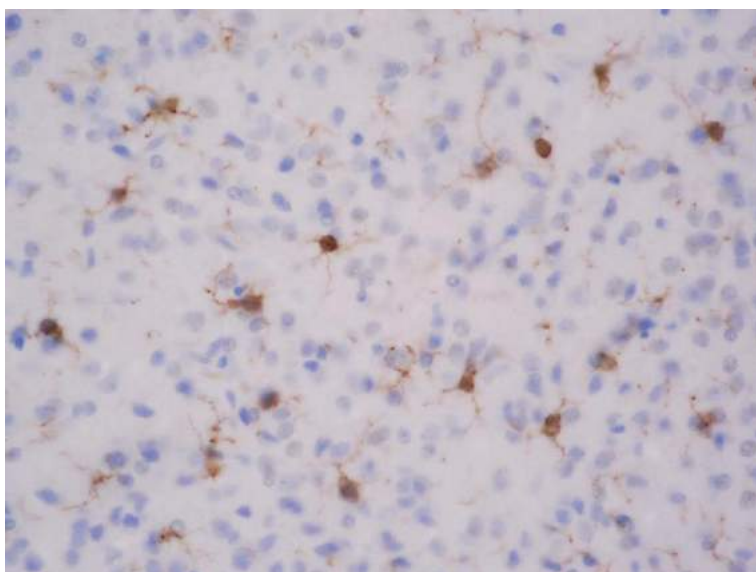


Рис. 6.1. Iba-1-позитивні клітини VMH щура контрольної групи. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

На тлі ЦД2 вимічається помітне підвищення експресії Iba-1 у клітинах мікроглії VMH (Рис. 6.2). При цьому помітно зростають розміри тіл клітин мікроглії, тому, і загальний рівень експресії Iba-1 є вищим, при чому забарвлення виявляється у більшій мірі в тілах клітин і в меншій – в їх відростках. Візуально відмічалось деяке збільшення кількості відростків Iba-1-позитивних клітин.

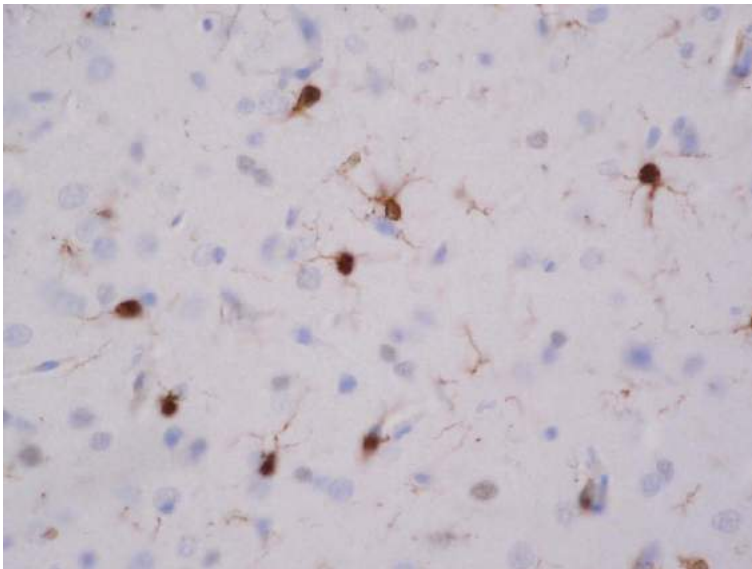


Рис.6.2. Iba-1-позитивні клітини VMH щура з ЦД2. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

Корекція метформіном привела до збільшення кількості відростків мікрогії, що виявлялися за експресією білку Iba-1у порівнянні ЦД2. Рівень експресії Iba-1 як у тілах клітин, та і у їх відростках практично не відрізнявся від групи ЦД2 (Рис. 6.3)

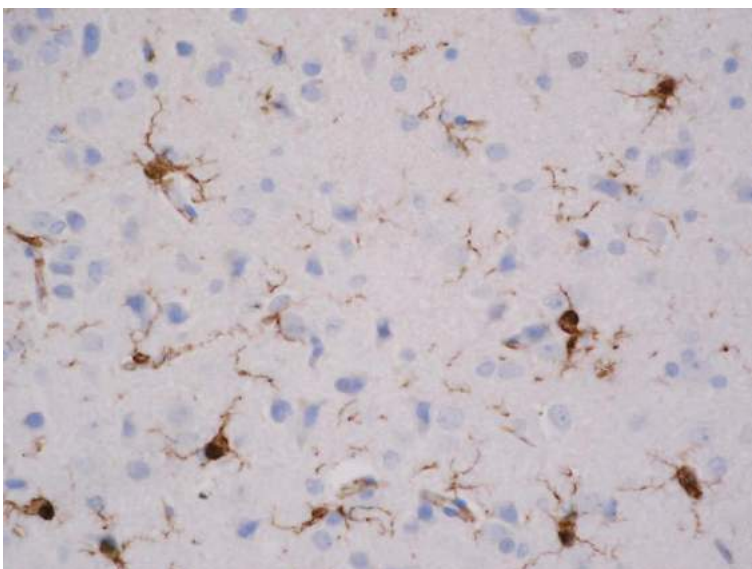


Рис. 6.3. Iba-1-позитивні клітини VMH щура групи ЦД2+ Мет, що отримували лікування метформіном. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

У щурів з ЦД2, яким вводили пропіонат, в VMH спостерігали деяке зростання рівня експресії *Iba-1* у гіпертрофованих клітинах мікроглії (рис.6.4) за рахунок збільшення тіла елементів як у порівнянні із ЦД2 так і з групою контролю. Більш контрастно при цьому маркувалися їх відростки.

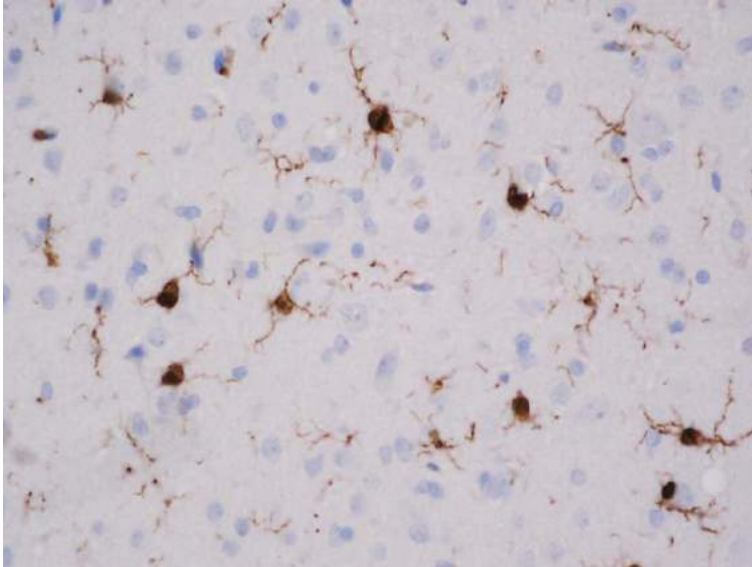


Рис. 6.4. Iba-1-позитивні клітини VMH щура групи ЦД2+ Проп, що отримували лікування пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

У тварин із ЦД2 при комбінованому веденні препаратів метформіну з пропіонатом виявилось деяке зменшення експресії *Iba-1*. (Рис. 6.5).

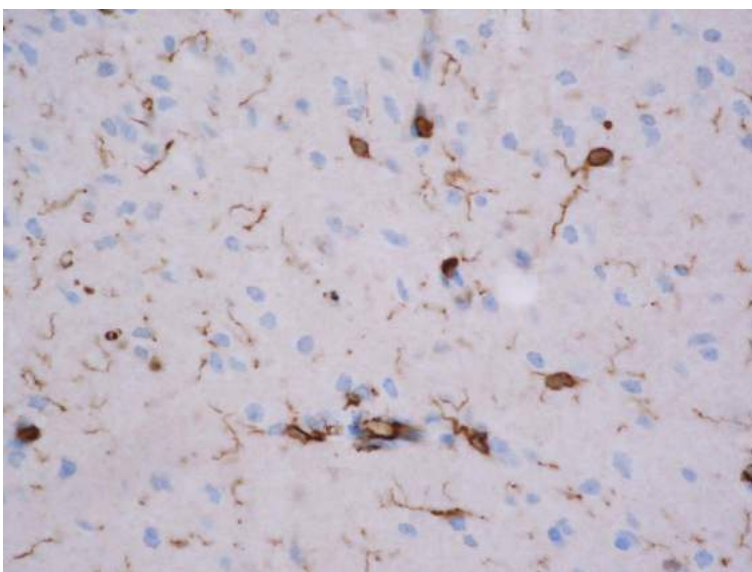


Рис. 6.5. Iba-1-позитивні клітини VMH щура групи ЦД2+ Мет+Проп, що отримували комбіноване уведення метформіном та пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

Менш інтенсивне фарбування було притаманне тілам клітин мікроглії. Візуально кількість маркованих відростків цих клітин визначалася такою ж, як і у групах ЦД2+Мет та ЦД2+Проп.

За даними ІГХ ми виконали напівкількісну оцінку протеїну в цитоплазмі (рис. 6.6) і виявили наступну залежність.

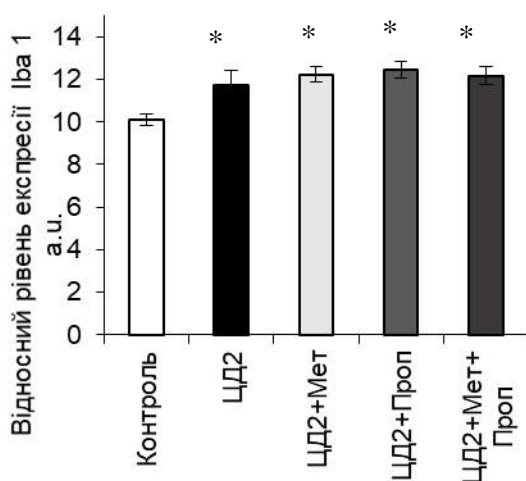


Рис. 6.6. Репрезентативна гістограма напівкількісної оцінки результату імуноцитохімічного аналізу Iba1-позитивних клітин VMH. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем.

В групі щурів із ЦД2, спостерігали достовірне підвищення вмісту Iba1. За умов корекції ЦД2 препаратами метформіном або пропіонатом, вміст Iba1 дещо підвищувався. Незначне і недостовірне зниження вмісту Iba1 спостерігали на тлі комбінованого введення метформіну з протпіонатом.

6.2. Кількісна оцінка маркерів гліальної активності в зоні НVM на тлі ЦД2 та за умов його корекції

Дослідження рівню Iba1 за допомогою вестерн-блоттингу і оцінка внутрішньоядерної транскрипції гену протеїну, шляхом вимірювання мРНК за допомогою ПЦР-реал тайм наведена на рис. 6.7.

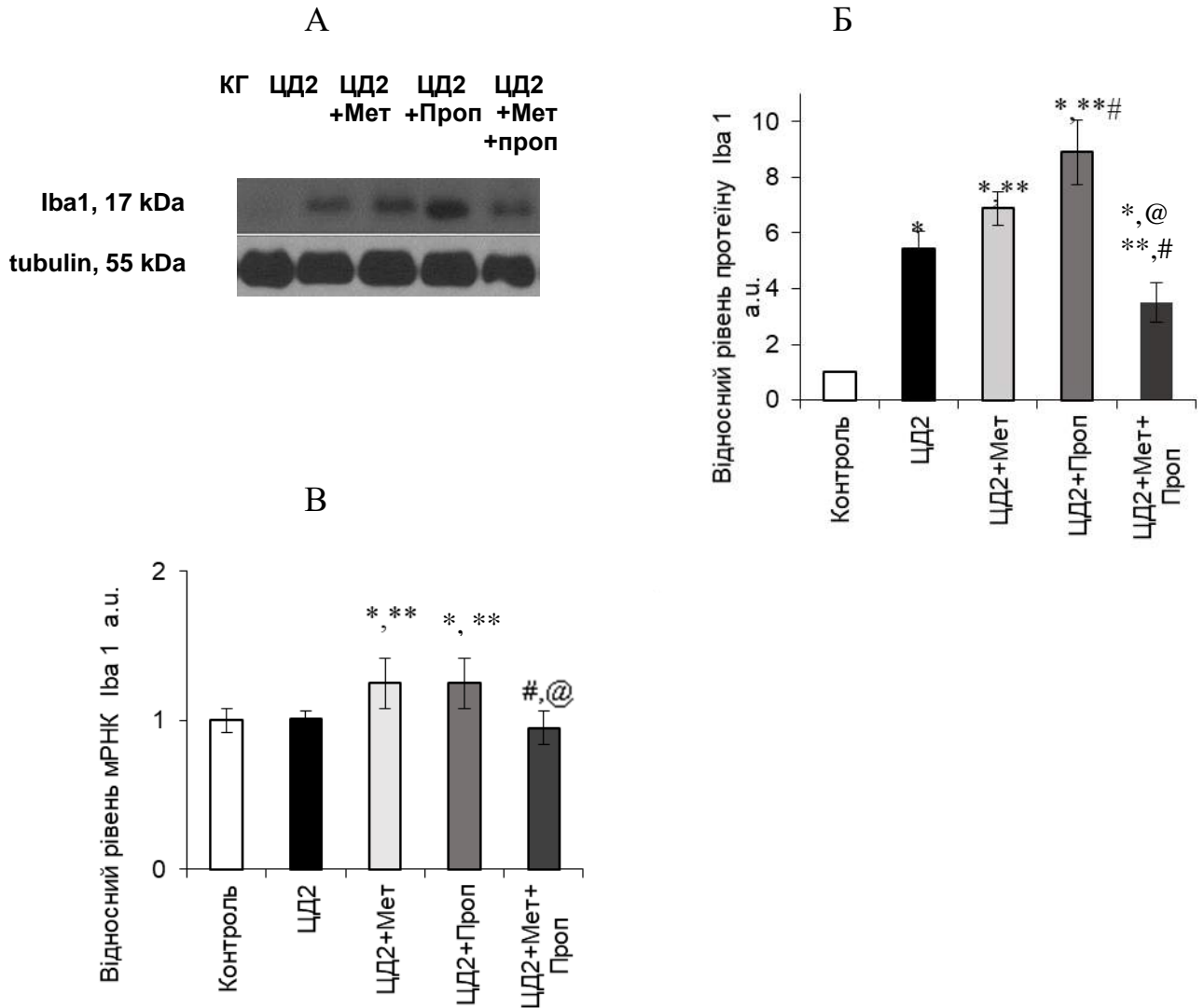


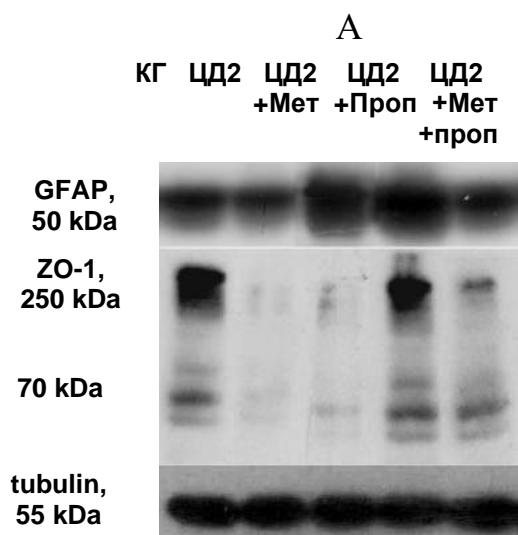
Рис. 6.7. Зміна експресії Iba1 у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

Примітка: А - репрезентативні імуноблотограми та Б - кількісно визначений рівень протеїну в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). На гістограмі (Б) наведений рівень Iba1 як середні значення \pm SEM ($n = 6$ у кожній групі). В - результат кількісної полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) Iba1 у VMH щурів: дані нормалізували до β -актину

та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів (n=6 щурів у кожній групі). Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * p <0,05 у порівнянні із контролем, ** p <0,05 у порівнянні із ЦД2, # p <0,05 у порівнянні із введенням метформіну, @ p <0,05 у порівнянні із введенням пропіонату.

Як ми бачимо (рис. 6.7), рівень білка Iba1 у групі ЦД2 значно підвищений (у 5,44 рази) (p = 0,01) порівняно з контролем. Введення метформіну на тлі ЦД2 ще підвищувало рівень білка Iba1 у 6,88 рази (p = 0,003) проти контролю. Уведення пропіонату призвело до подальшого підвищення вмісту Iba1 в 8,9 рази, (p <0,001) проти контролю. Навпаки, комбіноване уведення метформіну з пропіонатом знизило вміст білка Iba1 у 1,97 рази порівняно з показником групи ЦД2+Мет (p = 0,02) та у 2,54 рази порівняно з лікуванням ЦД2+Проп (p = 0,004), проте рівень Iba1 все ще був у 3,5 рази вищим, ніж у контролі. Визначення рівню мРНК Iba1 методом RT-PCR, не продемонструвало таких виражених ефектів, як це було на рівні білка. Окреме введення метформіну та пропіонату мало незначний посилюючий ефект на рівні мРНК Iba1: в 1,2 рази (p = 0,04) в обох групах, порівняно з контролем, тоді як у групах ЦД2+Мет + ПрК рівень мРНК Iba1 був таким, як у контрольній групі.

Надалі ми розглядали рівень GFAP в зоні VMH щурів, головного білка-маркера зрілих астроцитів, які представляють інший підтип гліальних клітин у центральній нервовій системі (рис.6.8, А,В).



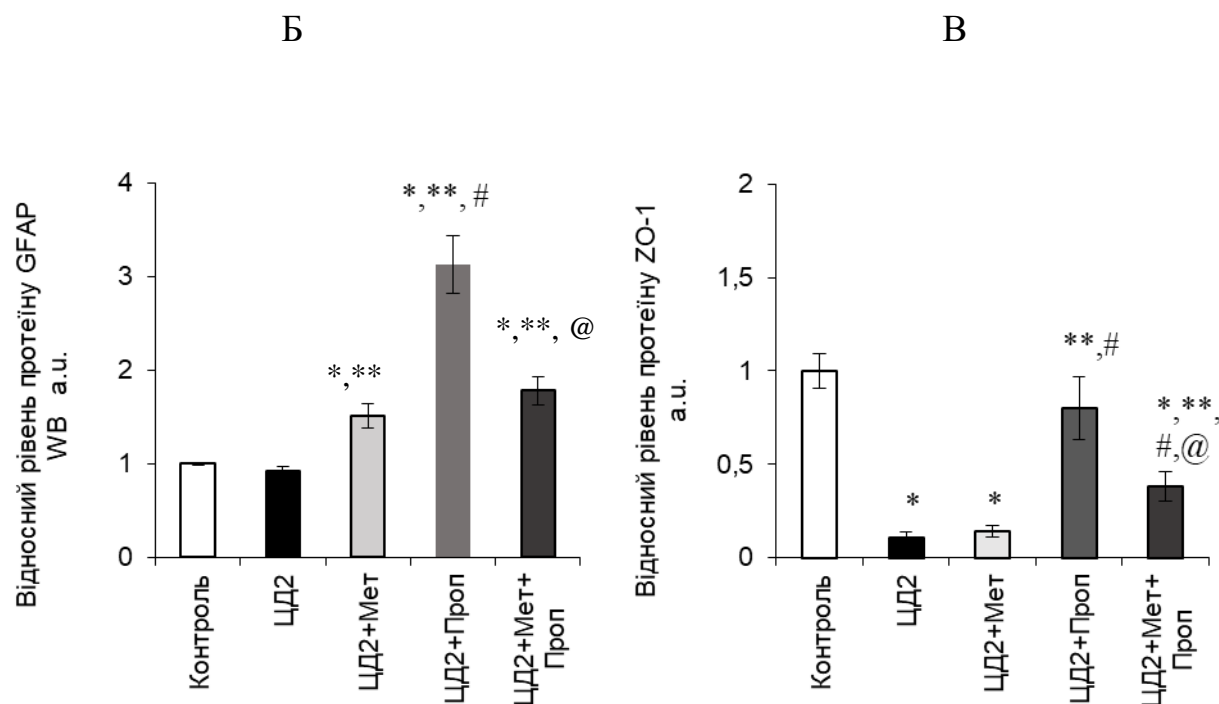


Рис. 6.8. Зміна експресії GFAP та ZO-1 у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

Примітка: А - репрезентативні імуноблотограми. (Б) - Кількісно визначений рівень протеїну GFAP та (В) ZO-1 в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із введенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із введенням пропіонату.

Було виявлено, що рівень білка GFAP не змінювався в групі ЦД2 (рис. 6.8). Введення препаратів призвело до підвищення рівня GFAP у VMH: при введенні метформіну - у 1,51 рази порівняно з контролем ($p = 0,03$), при введенні пропіонату - у 3,13 рази ($p < 0,001$) проти контролю, ЦД2 та групи ЦД2+Мет. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом викликало 1,75-кратне зменшення GFAP порівняно з групою ЦД2+Проп ($p = 0,0004$), однак рівень маркера залишався в 1,78 рази вище, ніж у тварин КГ ($p = 0,048$).

Таким чином, ми виявили суттєвий вплив препаратів на стан астроцитів, особливо підсилювало стан гліозу за показником GFAP уведення пропіонату. Для нас було несподіваним виявити зниження показника на тлі комбінованого

уведення препаратів, але такий вплив можна розцінити лише як негативний, оскільки ні ЦД2, ні введення метформіну на тлі ЦД2 не викликає гліоз за рахунок підвищення активності GFAP в зоні VMH.

Підвищення активності астроцитів (та/або мікроглії) може сприяти підвищенню проникності ГЕБ в нервовій тканині, що призводить до загрози стану мозку. Один із таких механізмів пов'язаний із зменшенням білків щільного з'єднання, а саме окклюдіна і ZO-1 (англ., Zonula Occludens-1), в активованих гліальних клітинах [81, 127]. Описаний механізм, за допомогою якого на тлі системного запалення мікроглія здатна фагоцитувати ніжки астроцитів, що і призводить до порушення щільності з'єднання клітин і основної функції ГЕБ [64]. Тому, ми вивчали вміст ZO-1 - конститутивного білка, що характеризує щільність з'єднанням клітин. Ми виявили, що стан ЦД2 характеризується різко зниженим рівнем ZO-1 на 89%, ($p=0,002$) проти контролю, що однозначно свідчить про пошкодження ГЕБ на тлі ЦД2 і відіграє важливу роль у підтримці цілісності нейронів. Введення метформіну не впливало на рівень ZO-1 у порівнянні з групою ЦД2, тоді як введення пропіонату збільшувало вміст протеїну майже до контрольних значень. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом щурам із ЦД2 сприяло підвищенню рівень білка ZO-1: у 3,5 рази ($p=0,05$), проти групи ЦД2, проте вміст ZO-1 все ще був на 62% нижчим, ніж у контролі ($p = 0,03$).

Висновок: наші дослідження продемонстрували наявність ЦД2-індукованої активації мікроглії та порушення цілісності гліальних клітин ГЕБ VMH. Введення пропіонату суттєво підвищує рівень гліозу через активацію астроцитів та мікроглії, але позитивно впливає на щільність ГЕБ. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом найбільш ефективно знижувало рівень Iba1 і частково відновлювала вміст ZO-1, що можна вважати демонструє перспективні імуномодулюючі ефекти препаратів на вказані ланки патогенезу.

РОЗДІЛ 7

ФУНКЦІОНАЛЬНІ МАРКЕРИ АКТИВАЦІЇ АУТОФАГІЇ ТА АПОПТОЗУ НЕЙРОНІВ НУМ ЩУРІВ ІЗ ЦД2 ТА ЗА УМОВ ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Ефекторні молекули, які беруть участь у сигнальних каскадах апоптозу та аутофагії при ушкодженні нервової тканини викликають зацікавленість не тільки в якості мішеней для розробки нових методів лікування ряду захворювань, але і як нові біологічні маркери в діагностиці енцефалопатії та оцінці ступеню ушкодження мозку. Одним із ускладнень ЦД2 є діабетична енцефалопатія, яка супроводжується підсиленням апоптозу клітин. Враховуючи відсутність регенерації в нервовій тканині – шлях аутофагії – як компенсаторної реакції на внутрішньоклітинний стрес набуває особливого сенсу і спонукає розробляти терапевтичні схеми, які пригнічують апоптоз на тлі підвищення аутофагії, і таким чином забезпечують адаптацію нейронів до стресових факторів. Білок Beclin-1, який грає ключову роль в ініціації утворення аутофагосом та її координації на усіх етапах через шлях активації ліпідкінази фосфатидилинозитол-3-кінази III (PI3K-III). Іншим маркером аутофагосом є білок LC3, що є убіквітин-подібним білком є надійним маркером, так як його вміст позитивно корелює з кількістю активних аутофагосом.

Протиапоптотичний маркер Bcl-xL вважається спорідненим із проапоптотичним протеїни Bax, через походження із одного сімейства білків Bcl-2 [16]. Ці білки традиційно розглядаються разом, оскільки вважаються регуляторами мітохондріального шляху запуску апоптозу [73]. Високий рівень Bcl-xL в цитоплазмі заперечує Bax протеїну димеризуватися із мономеру в димер, і таким чином утворювати пору в зовнішній мембрані мітохондрій – апоптосому, що призводить до вивільнення цитохрому C в цитозоль, активації ефекторних каспаз-3/7 [73].

7.1. Вивчення маркерів аутофагії в нейронах НVM на тлі ЦД2 та за умов його корекції

У тварин контрольної групи в НVM спостерігається виразна експресія Veslin-1 у значній частині нейронів (Рис. 7.1). Переважно у ядрах і лише в поодиноких випадках виявляли слабу експресію в їх цитоплазмі. Нейропіль виявляв дуже слабке фонове забарвлення.

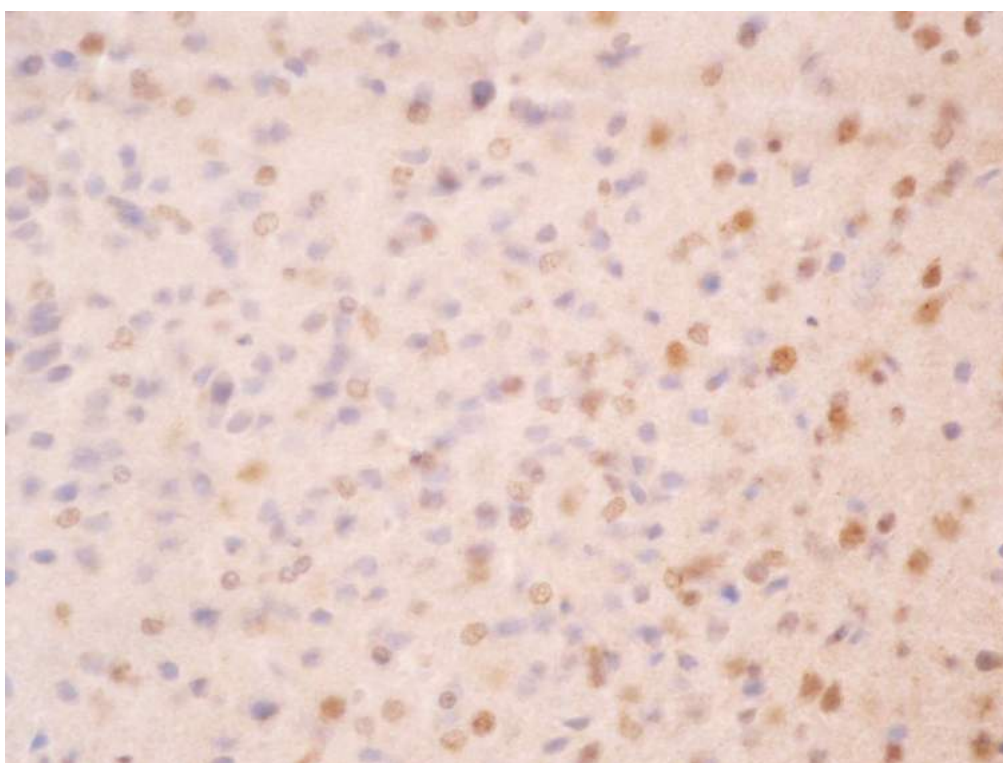


Рис. 7.1. Експресія Veslin 1 у клітинах VMN щура контрольної групи. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

У тварин із ЦД2 спостерігалось незначне зниження експресії Veslin-1 в ядрах нейронів (Рис. 7.2). Разом з тим у нейронах виявили слабку імунореактивність до Veslin-1 у цитоплазмі. У ядрах гліоцитів також виявлялася слабка експресія Veslin-1.

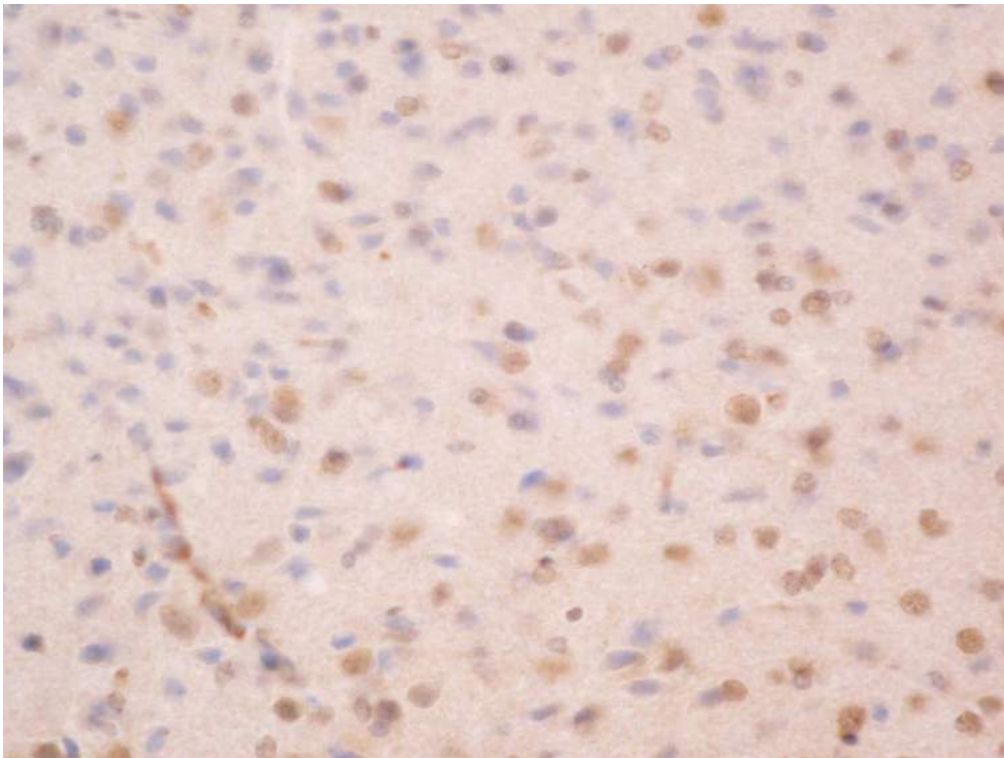


Рис. 7.2. Деяке зниження експресії Veslin 1 у ядрах нейронів та зростання кількості цих клітин зі слабо міченою цитоплазмою в VMH щура з ЦД2. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

Введення метформіну щурам з ЦД2 приводило до зростання експресії Veslin-1 в нейронах VMH (Рис. 7.3). Особливо це виявлено в цитоплазмі нейронів. Забарвлення виявлялося на низькому рівні, хоча, у поодиноких клітинах на помірному рівні.

Введення пропіонату щурів з ЦД2 викликало максимальну експресію Veslin-1 у нейронах VMH, також за рахунок підвищення імунореактивності цитоплазми нейронів (Рис. 7.4).

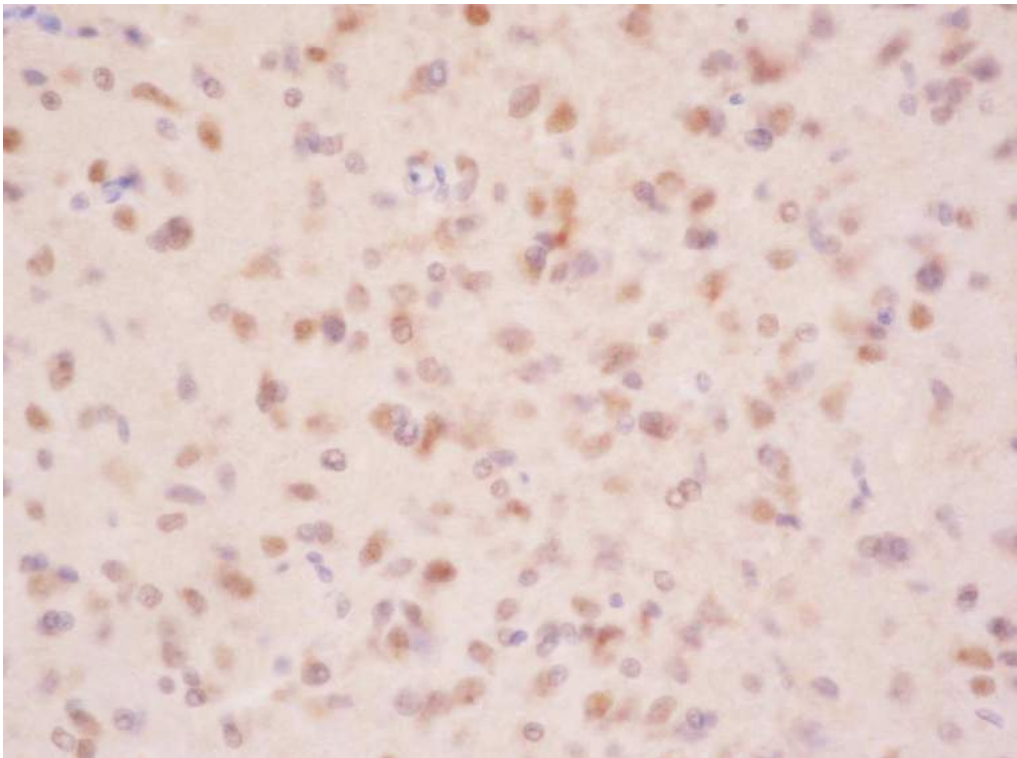


Рис. 7.3. Експресія Veslin 1 у клітинах VMN щура з ЦД2, що отримували лікування метформіном. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

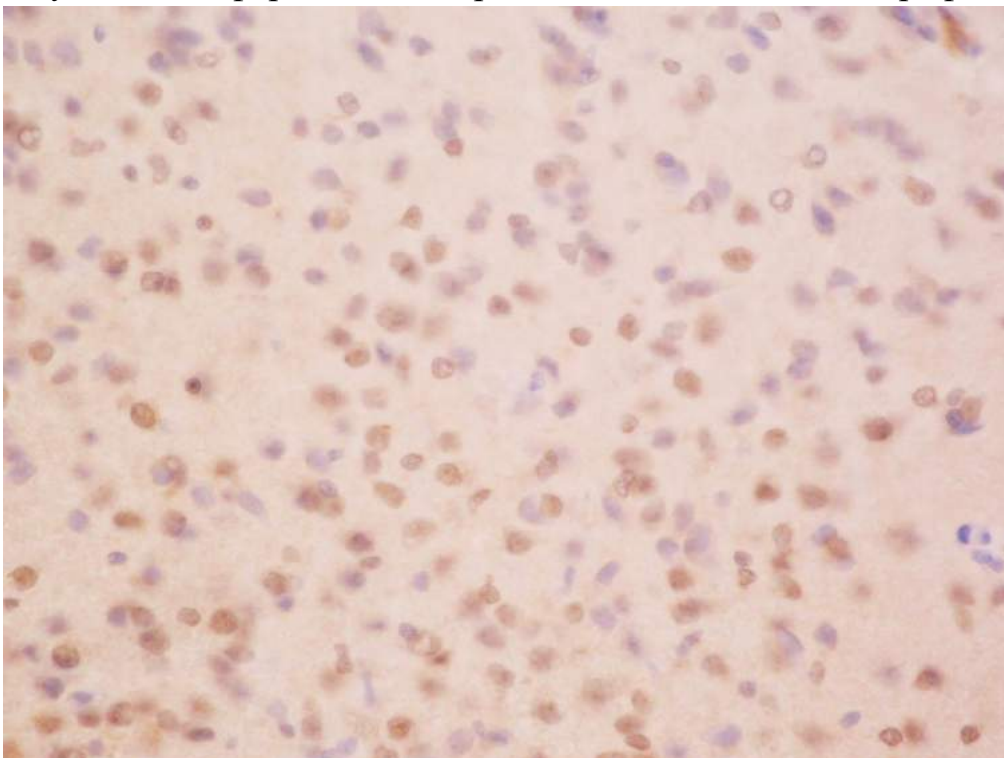


Рис. 7.4. Експресія Veslin 1 у клітинах VMN щура з ЦД2, при введенні пропіонату. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

Комбіноване введення метформіну з пропіонатом у тварин із ЦД2 демонструвало високу експресію Veslin-1 (рис. 7.5). Однак характер

забарвлення був схожим на картину в групі ЦД+Мет.

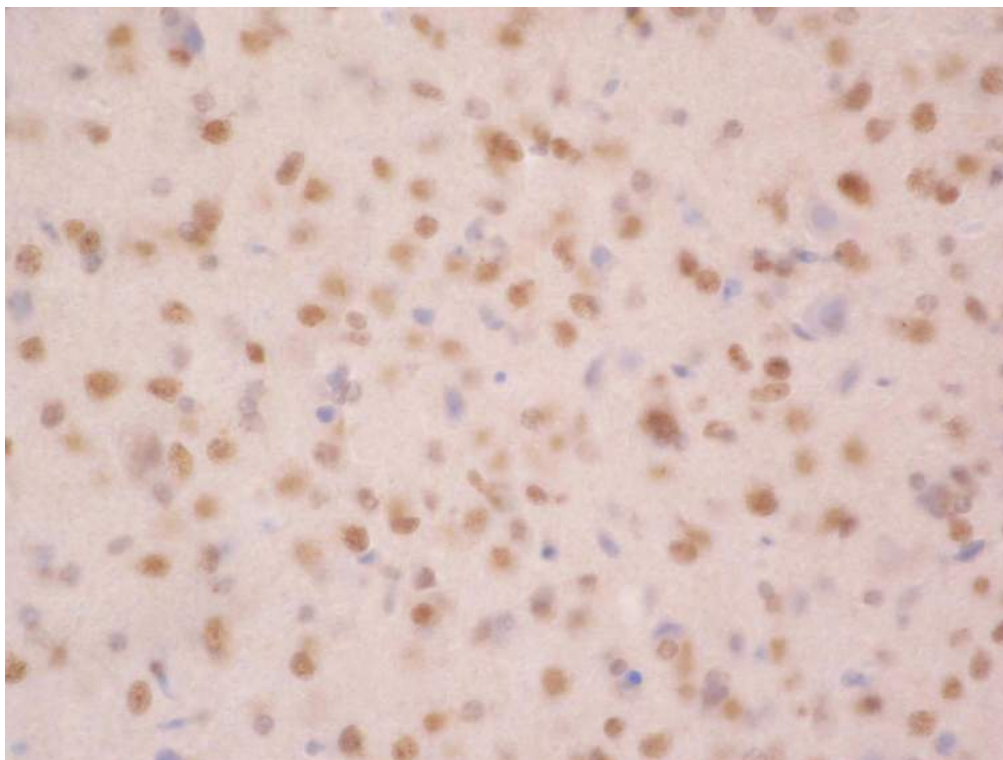


Рис. 7.5. Експресія Veslin 1 у клітинах VMH щура з ЦД2, на тлі комплексного введення метформіну з пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

За даними ІГХ ми виконали напівкількісну оцінку протеїну Veslin 1 в цитоплазмі (рис. 7.6.) та ядрі і виявили наступну залежність.

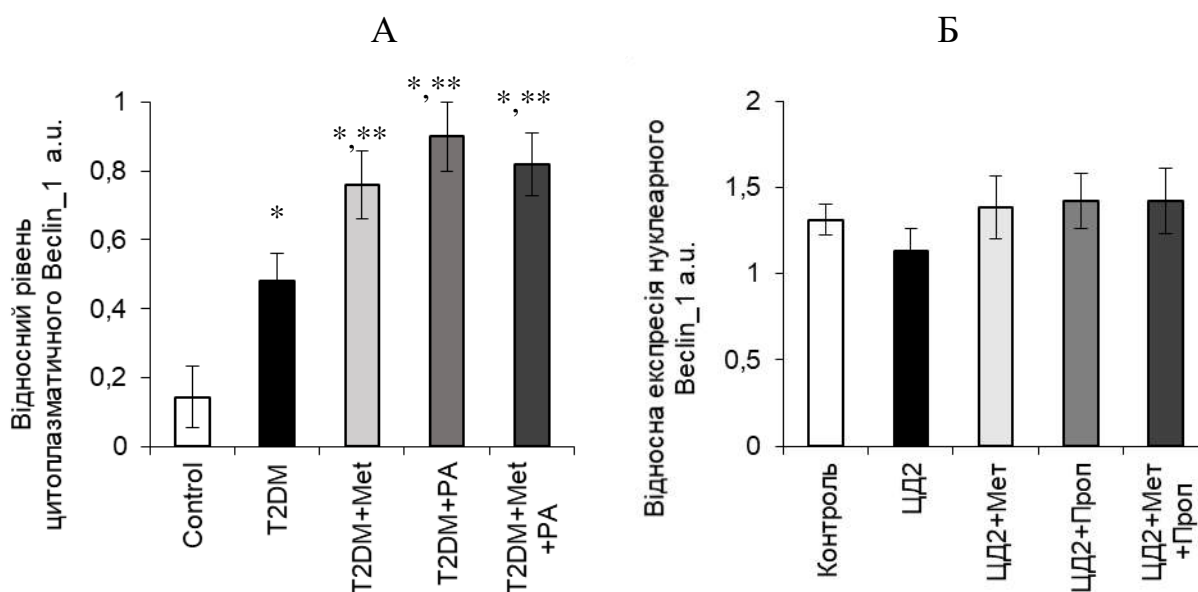


Рис. 7.6. Репрезентативні гістограми напівкількісної оцінки результату імуноцитохімічного аналізу Veslin-1: А – в цитоплазмі нейронів VMH. Б- в ядрах нейронів VMH. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; *

$p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із введенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із введенням пропіонату.

Виявили, що відтворення ЦД2 підвищує у цитоплазмі нейронів вміст Beclin-1 у 3 рази ($p < 0,05$), введення препаратів додатково підвищує вміст та накопичення протеїну в цитоплазмі: метформіну в 1,5 рази ($p < 0,05$) відносно ЦД2, а пропіонату в 1,8 разів ($p < 0,05$) відносно ЦД2. При цьому комбіноване введення метформіну з пропіонатом підвищувало вміст протеїну в 1,6 рази ($p < 0,05$).

Вміст Beclin-1 в ядрі незначно зменшувався (на 14%) на тлі ЦД2 відносно КГ, але введення препаратів викликало відновлення рівня протеїну в ядрі до рівня КГ і не залежало від виду корекції.

Таким чином, у щурів із ЦД2 в порівнянні із контролем виявлене підвищення експресії Beclin-1 у цитоплазмі нейронів VMH із одночасним зниженням протеїну в ядрі. Введення препаратів викликало підвищення Beclin-1 у цитоплазмі нейронів VMH, що сприяє активності процесів аутофагії, як важливого протекторного механізму компенсації метаболічних зсувів. Введення пропіонату додатково викликало підвищення Beclin-1 у ядрах нейронів VMH, і визначало стан максимальної експресії протеїну, що максимально активувало механізм аутофагії в нейронах.

Дослідження рівню Beclin-1 за допомогою вестерн-блот аналізу і оцінка внутрішньоядерної транскрипції гену протеїну, шляхом вимірювання мРНК за допомогою ПЦР-реал тайм наведена на рис. 7.7

Не було виявлено відмінностей у вмісті Beclin-1 між контролем та ЦД2; однак ми спостерігали підвищення рівня Beclin-1 після введення препаратів: на тлі введення метформіну протеїн підвищувався у 2,3 рази ($p < 0,05$), на тлі введення пропіонату – максимально у 3 рази ($p < 0,05$), та у 2 рази ($p < 0,05$) при комбінованому введенні.

рахунок подій, що відбуваються у цитоплазмі та певний консерватизм внутрішньоядерних змін.

Дослідження рівню LC3 за допомогою вестерн-блот аналізу і оцінка внутрішньоядерної транскрипції гену протеїну, шляхом вимірювання мРНК за допомогою ПЦР-реал тайм наведена на рис. 7.8.

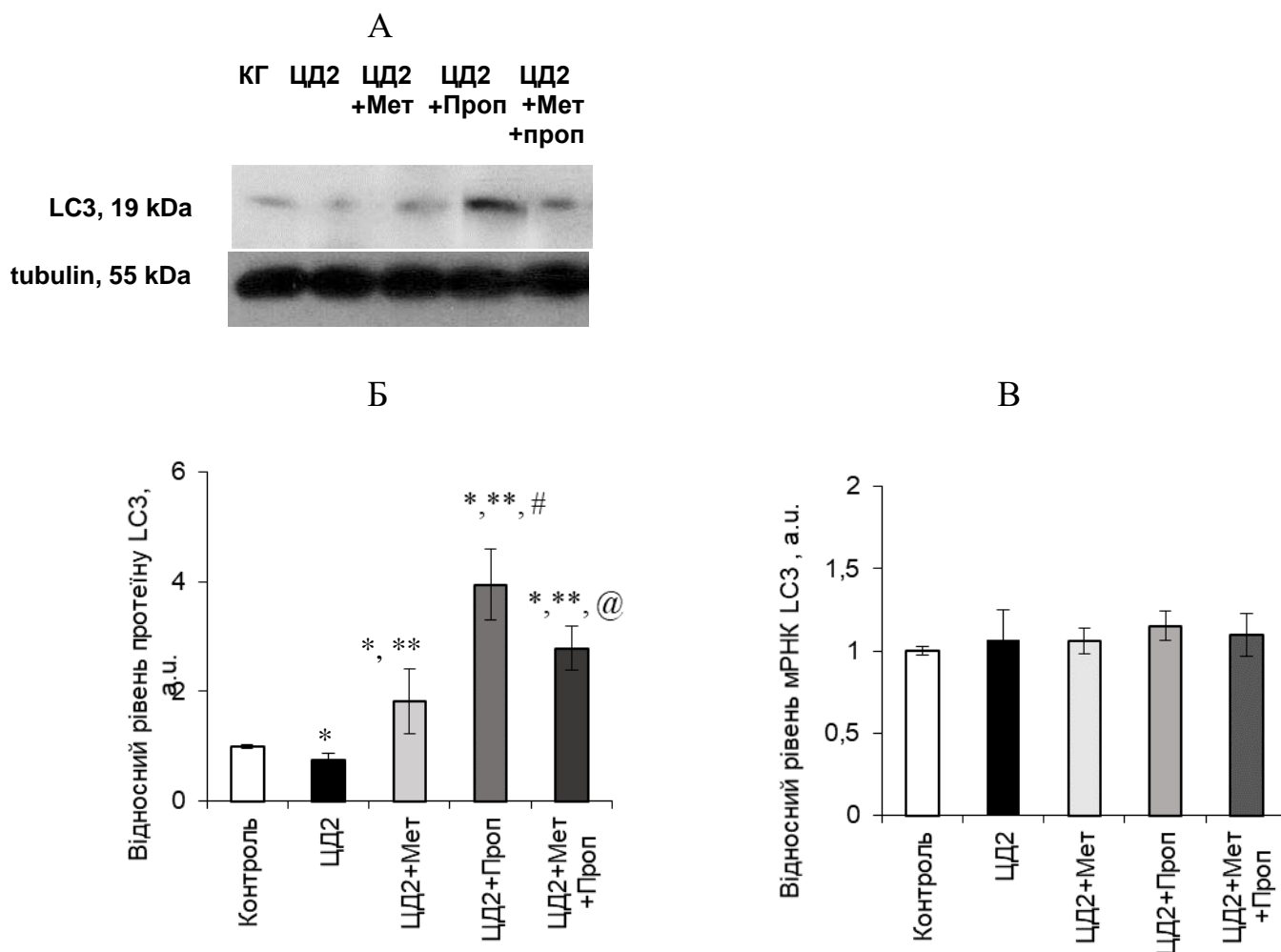


Рис. 7.8. Зміна експресії LC3 у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

Примітка: А - репрезентативні імуноблотограми та Б - кількісно визначений рівень протеїну в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). На гістограмі (Б) наведений рівень LC3 як середні значення \pm SEM (n = 6 у кожній групі). В - результат кількісної ПЛР LC3 у VMH щурів: дані нормалізували до β -актину та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів (n=6 щурів у кожній групі). Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * p < 0,05 у порівнянні із контролем, ** p < 0,05 у порівнянні із ЦД2, # p < 0,05 у порівнянні із введенням метформіну, @ p < 0,05 у порівнянні із введенням пропіонату.

Рівень білка LC3 у групі ЦД2 був нижчим, ніж у контролі на 25%, ($p = 0,08$). Введення метформіну збільшило LC3 у 2 рази ($p < 0,05$) порівняно з ЦД2. Введення пропіонату спричинило підвищення рівня LC3, що було в 4 рази вище ($p < 0,05$) порівняно з контролем та 5,2 рази вище ($p < 0,05$) порівняно з ЦД2. Комбіноване введення пропіонату з метформіном збільшило рівень LC3 у 3,75 рази ($p < 0,05$) порівняно з ЦД2. Рівень транскрипції відповідного гену, визначений шляхом ПЛР за кількістю мРНК практично не змінювався відносно рівню контролю ані на тлі ЦД2, ані при введенні препаратів.

Таким чином, введення пропіонату на тлі ЦД2 підвищує вміст в нейронах сигнальних протеїнів, які забезпечують формування мікровезикул і активує аутофагію.

7.2. Вивчення маркерів апоптозу в нейронах НVM на тлі ЦД2 та за умов його корекції

ІГХ дослідження показало, що у тварин контрольної групи в VMH спостерігається експресія VAX у кровоносних судинах (на низькому та помірному рівні), у невеликій кількості в цитоплазмі та ядрах нейронів та глії (Рис. 7.9). У поодиноких гліоцитах виявляється експресія VAX в цитоплазмі та у вигляді макули поряд з ядром- вірогідно у комплексі Гольджі.

У тварин із ЦД2 спостерігалось різке зростання експресії VAX у клітинах VMH (Рис. 7.10). У кровоносних мікросудинах експресія сягала високого рівня. А в нейронах зростала цитоплазматична експресія VAX, а не ядерна. В гліоцитах виявлені зафарбовані малі дифузно мічені ділянки цитоплазми, що розташовувалися поряд з ядром з одного боку.

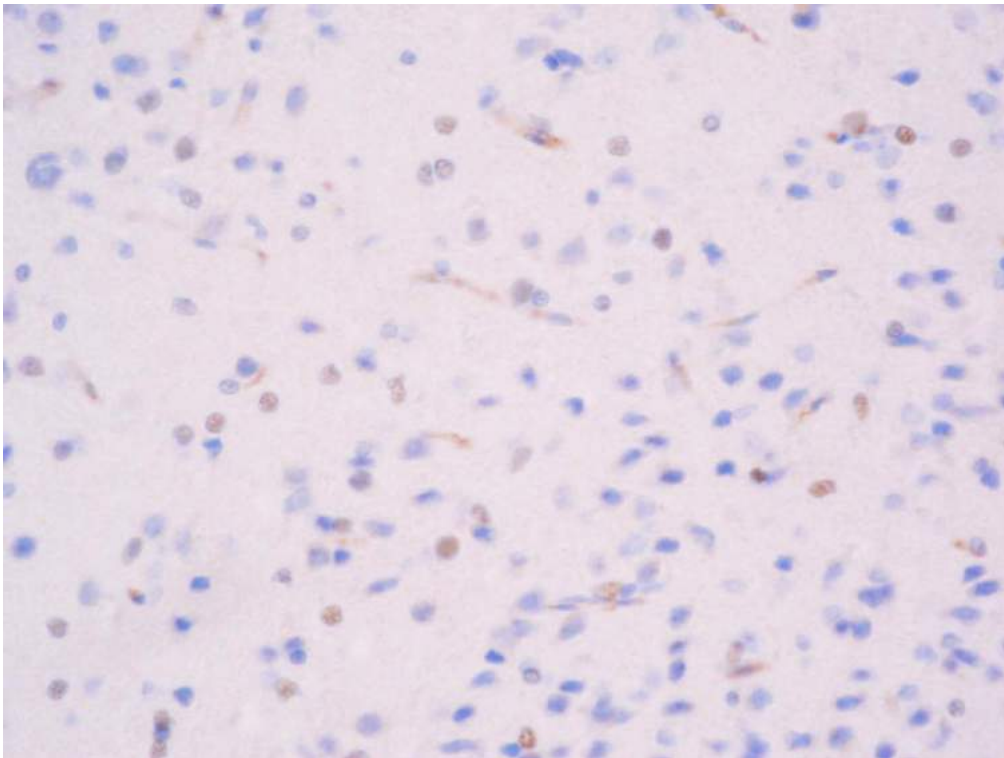


Рис. 7.9. Експресія ВАХ у клітинах VMH щура контрольної групи. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

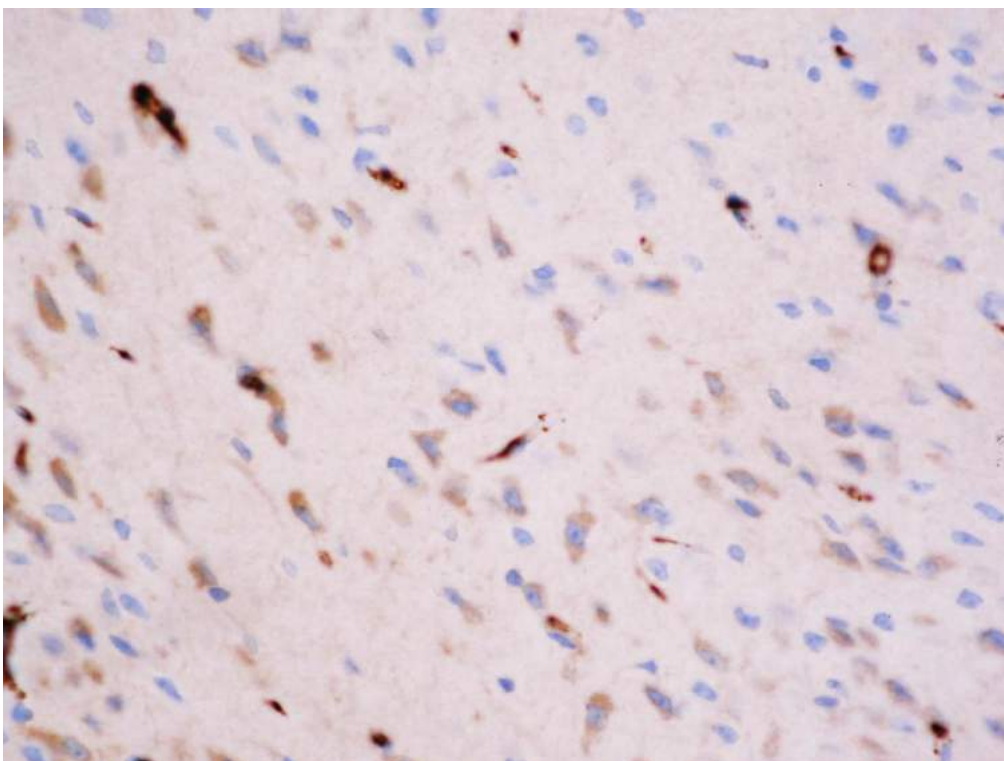


Рис. 7.10. Експресія ВАХ у клітинах VMH щура з ЦД2. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

У щурів з ЦД, що отримували лікування метформіном виявлено певне зменшення експресії VAX, у порівнянні з групою ЦД2 (Рис. 7.11). Знижувалася кількість ендотеліальних клітин з інтенсивним забарвленням. Нейрони виявляли низьку дифузну експресію VAX у цитоплазмі. Однак, у порівнянні із ЦД2, невелика частка нейронів демонструвала ядерну експресію цього протеїну, причому на помірному, а іноді і на високому рівні. Значно частіше зустрічалися гліоцити з імунореактивністю до VAX, які також демонстрували помірну ядерну експресію VAX, і лише зрідка – у цитоплазмі.

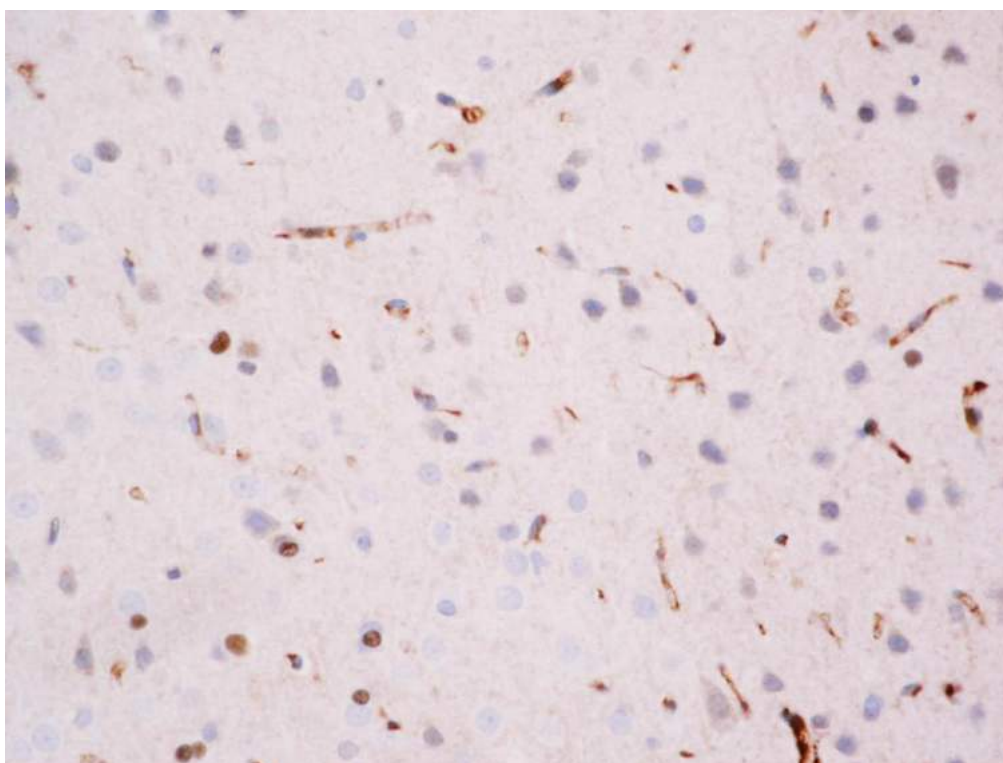


Рис. 7.11. Експресія VAX у клітинах VMH щура із ЦД2 , що отримували лікування метформіном. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

За умов дії пропіонату на тлі ЦД2 при картина експресії VAX у VMH практично не відрізняється від групи ЦД2 (Рис. 7.12). У кровоносних мікросудинах спостерігається помірна або висока експресія VAX. Значна частина нейронів демонструє помірну або низьку цитоплазматичну експресію VAX. Іноді у гліоцитах виявляється експресія цього протеїну у вигляді гранул поряд з ядром.

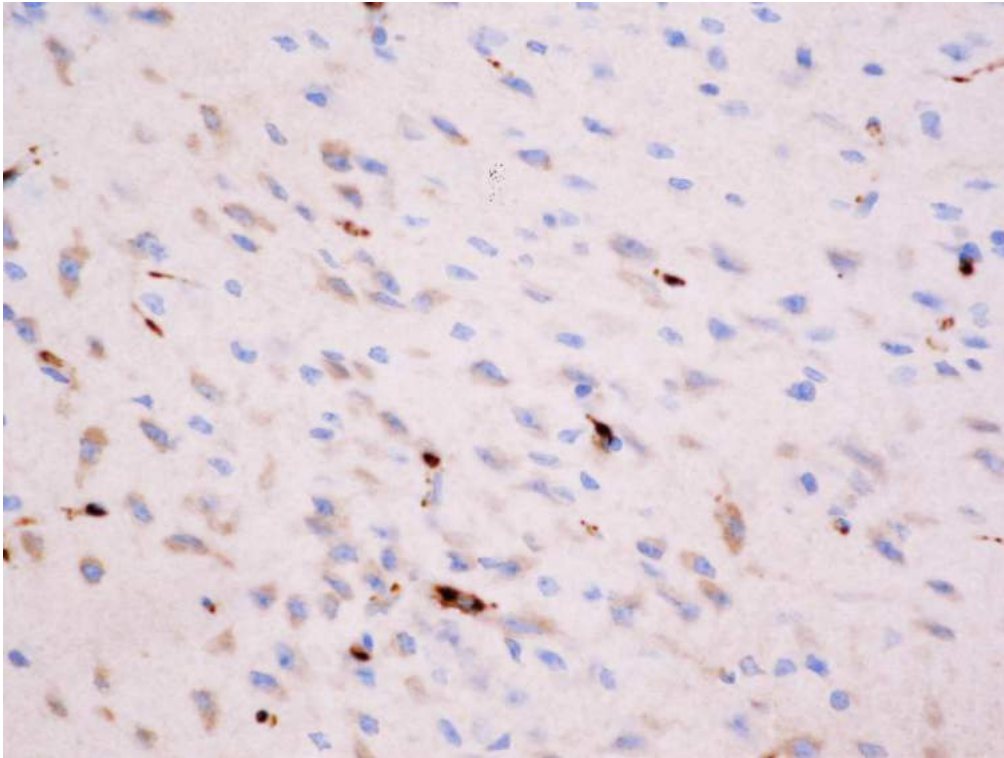


Рис. 7.12. Експресія ВАХ у клітинах VMH щура із ЦД2, що отримували лікування пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

Сумісне введення метформіну з пропіонатом у тварин із ЦД2, у цілому призводило також до суттєвого зниження експресії ВАХ у клітинах гіпоталамуса, але було значно вищим ніж у контролі. Однак, у ендотелії кровоносних судин експресії ВАХ незначно знижувалася у порівнянні з ЦД2. Кількість мічених нейронів була значно більшою ніж у контролі, але інтенсивність мічення була меншою у порівнянні з групою ЦД2+Мет та ЦД2+Проп. У гліюцитах експресія ВАХ спостерігалася скоріше за все це – зона комплексу Гольджі. (Рис. 7.13.).

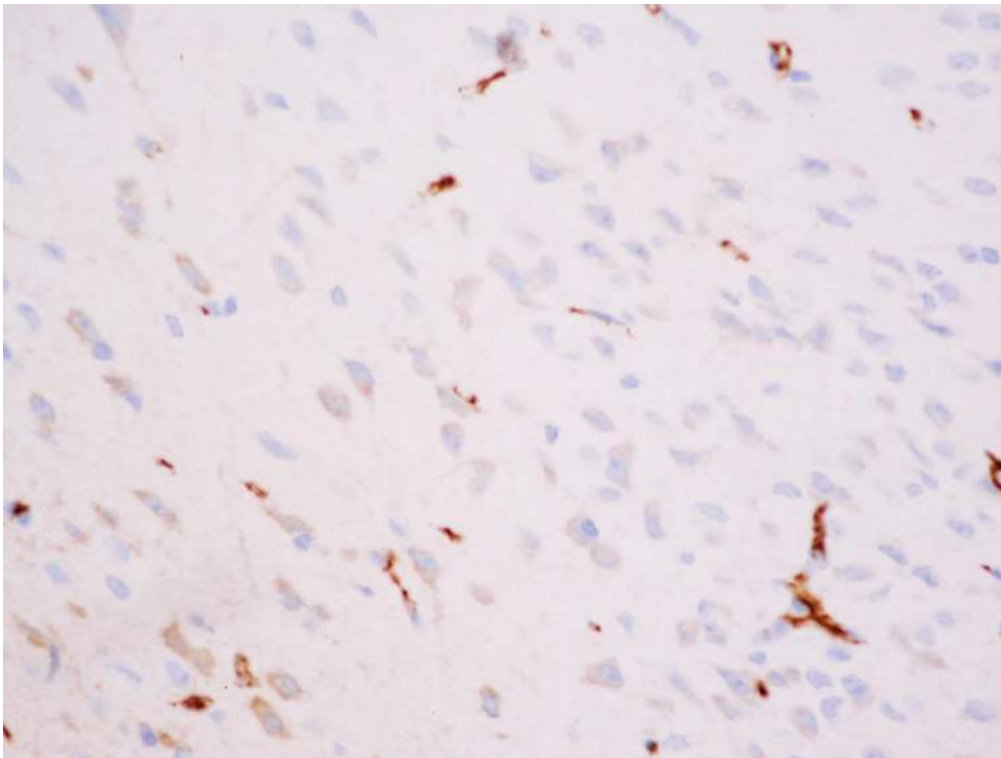


Рис. 7.13. Експресія ВАХ у клітинах VMH щура із ЦД2, що отримували комплексне лікування метформіном та пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

За даними ІГХ ми виконали напівкількісну оцінку протеїну ВАХ в цитоплазмі (рис. 7.14) і виявили наступну залежність.

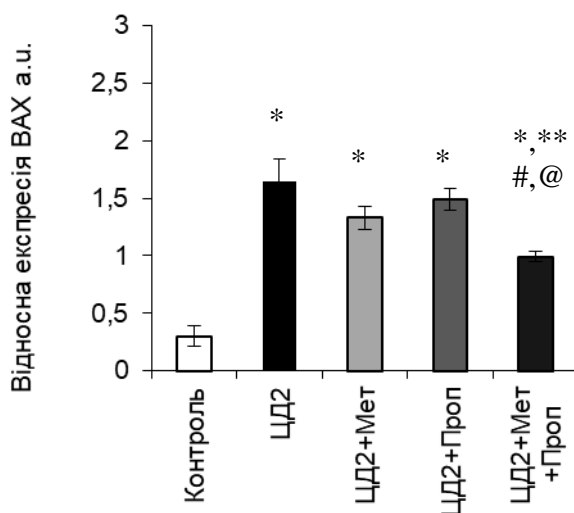


Рис. 7.14. Репрезентативна гістограма напівкількісної оцінки результату імуноцитохімічного аналізу ВАХ в нейронах VMH. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із введенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із введенням пропіонату.

За даними напівкількісного аналізу ІГХ забарвлення. Цікаво, що внутрішньоядерна транскрипція гену ВАХ при моделюванні ЦД2 залишалася не змінною у порівнянні із контролем, а за умов введення метформіну достовірно збільшувалася на 46% ($p=0,048$) відносно ЦД2, введення пропіонату, навпаки, зменшувало транскрипцію відповідного гену на 44% ($p=0,025$) відносно ЦД2, а комбінація препаратів не змінювала транскрипційні процеси у ядрі відносно контролю та ЦД2. Отже, моделювання ЦД2 викликало максимальний апоптотичний вплив через активацію мітоптозу, а комбінація препаратів метформіну та пропіонату найбільш ефективно знижувало апоптоз нейронів.

Результати дослідження вмісту ВАХ шляхом вестерн-блот аналізу наведені на рис. 7.15. Вміст ВАХ-мономера в групах тварин, яким відтворений ЦД2 був в 3,5-5,5 разів вище ніж в контролі, однак на тлі лікування достовірно відрізнявся лише в групі ЦД2+Мет+Проп, де був в 1,5 рази ($p=0,042$) менше ніж в групі ЦД2+Проп та ЦД2, але в 3,4 рази ($p=0,028$) більше ніж в контролі. Відомо, що ознакою активації апоптозу є олігомеризація молекули ВАХ із мономера в димер, який і структурує пори в мембрані мітохондрій, наявність яких визначає мітоптоз. Тому, окремо ми визначили вміст ВАХ-димера. За нашими даними, максимальний вміст проапоптотичної форми ВАХ спостерігався при ЦД2 і був в 5,7 рази ($p=0,003$) більше у порівнянні із контролем. Введення метформіну зменшувало відносно ЦД2 вміст ВАХ-димера в 2,2 рази ($p=0,006$), введення пропіонату в 2 рази ($p=0,005$), а комбінація препаратів зменшувала протеїн в 2,7 рази ($p=0,003$) у порівнянні із ЦД2, що достовірно не відрізнялося від значень контролю.

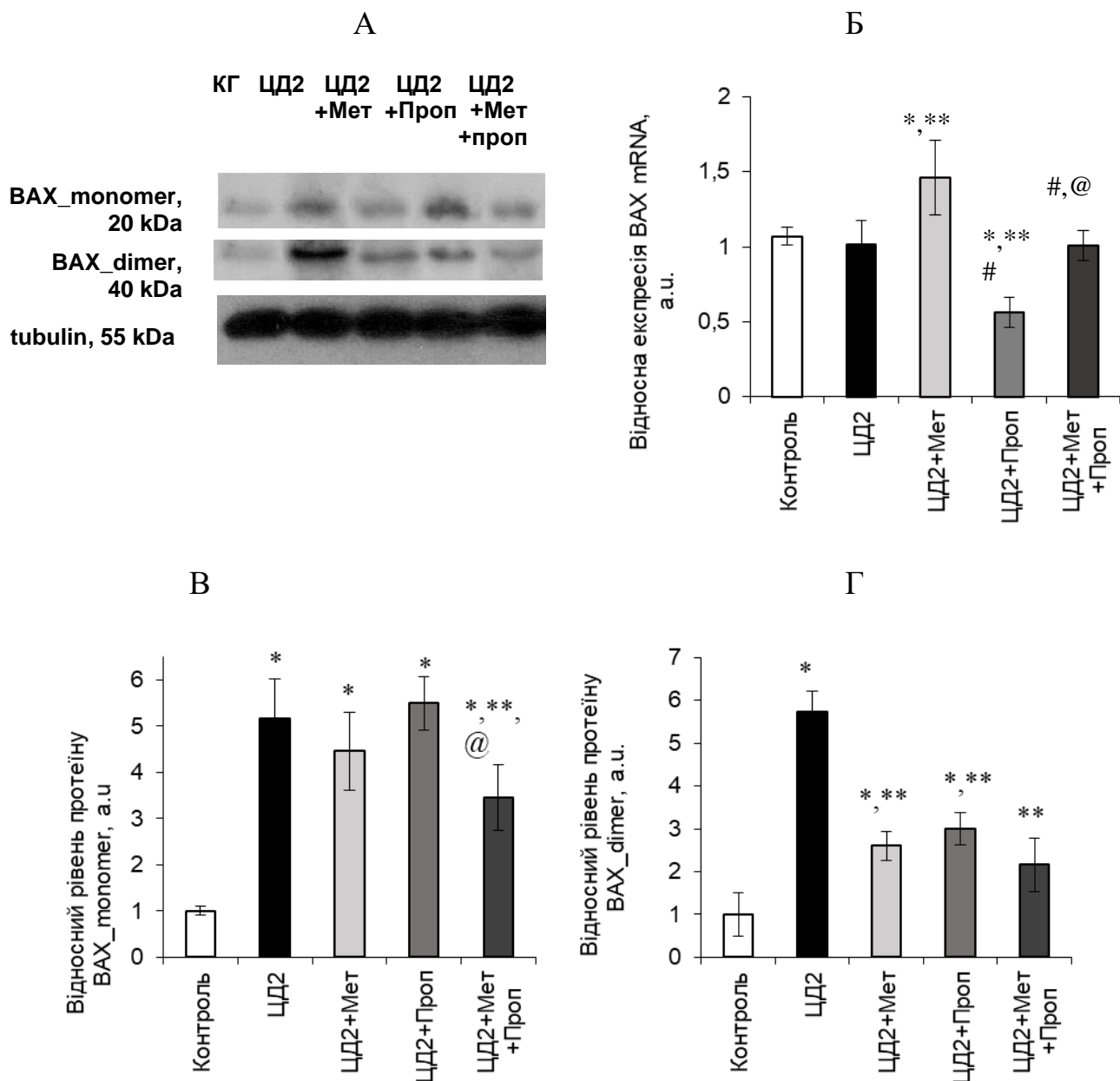


Рис. 7.15. Зміна експресії BAX у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції. Примітка: А - репрезентативні імуноблоти. Кількісно визначений рівень протеїну в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю), Б - результат кількісної ПЛР BAX у VMH щурів: дані нормалізували до β -актину та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів (n=6 щурів у кожній групі). В – BAX-мономер, Г – BAX-димер. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * p < 0,05 у порівнянні із контролем, ** p < 0,05 у порівнянні із ЦД2, # p < 0,05 у порівнянні із введенням метформіну, @ p < 0,05 у порівнянні із введенням пропіонату.

Отже, при ЦД2 підвищується експресія цитоплазматичного BAX, і протеїн значно експресується у кровоносних судинах, що свідчить про стан

активації олігомеризації BAX та його проапоптотичну дію і стан ендотеліальної дисфункції. Лікування метформіном демонструє позитивний вплив на ендотелій та підсилення експресії BAX в ядрах нейронів для компенсації нейрональної дисфункції на тлі ЦД2. Пропіонат практично не впливає на активність експресії BAX. Комбіноване уведення препаратів щурам із ЦД2 демонструвало протективну проапоптотичну дію, однак в більшості спрямовану на клітини нервової тканини, у відмінності від ендотелію.

ІГХ дослідження показало, що у тварин контрольної групи в VMH спостерігається виразна експресія Vcl-x1 у переважаючій частині нейронів та гліоцитах (Рис. 7.16). У нейронах протеїн візуалізується у вигляді помірно або інтенсивно мічених макул (вірогідно зона з комплексами Гольджі) поряд з ядром на невеличкій обмеженій ділянці цитоплазми зі слабою імунореактивністю.

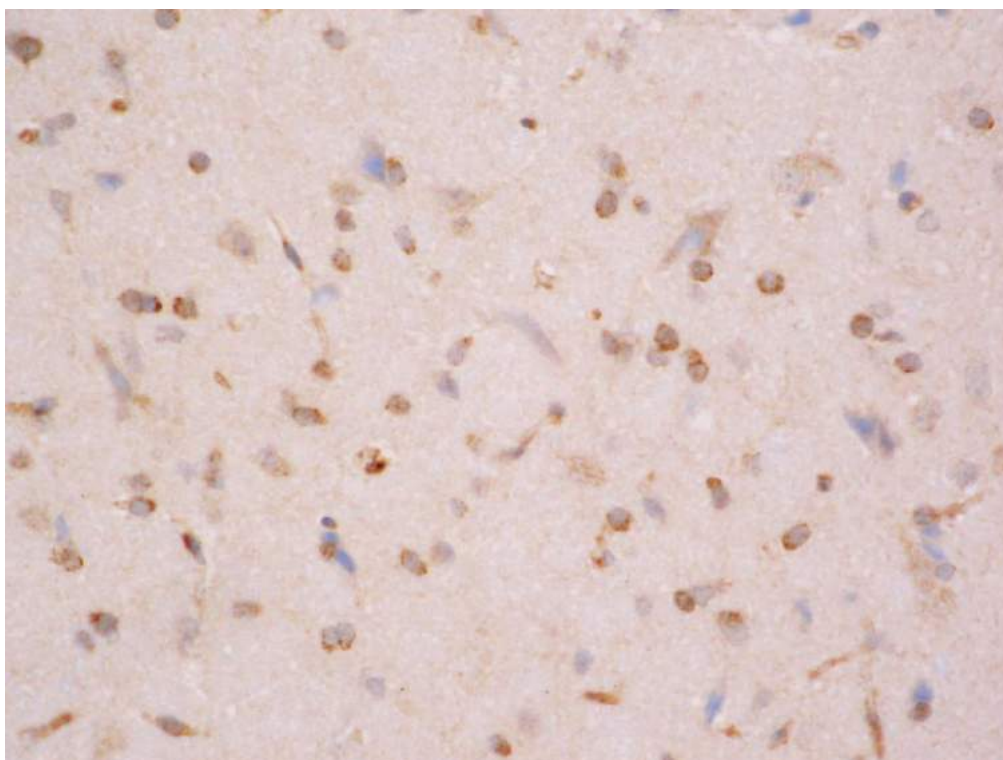


Рис. 7.16. Експресія Vcl-x1 у клітинах VMH щура контрольної групи. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

В КГ зустрічаються нейрони із дифузною низькою експресією Vcl-x1 у цитоплазмі. Виявлені поодинокі нейрони в яких відсутня експресія Vcl-x1. У гліоцитах також виявляється експресія Vcl-x1 у вигляді макул різного розміру, прилеглих до ядра. Помірна експресія Vcl-x1 виявляється в ендотелії кровоносних капілярів.

У тварин, із ЦД2 спостерігалось різке зниження експресії Vcl-x1 в нейронах, гліоцитах та ендотелії VMH (Рис. 7.17). Більшість нейронів не виявляють експресії Vcl-x1 у цитоплазмі або, наявне слабе дифузне маркування. Лише поодинокі нейрони у тварин цієї групи мають макули з помірною експресією Vcl-x1.

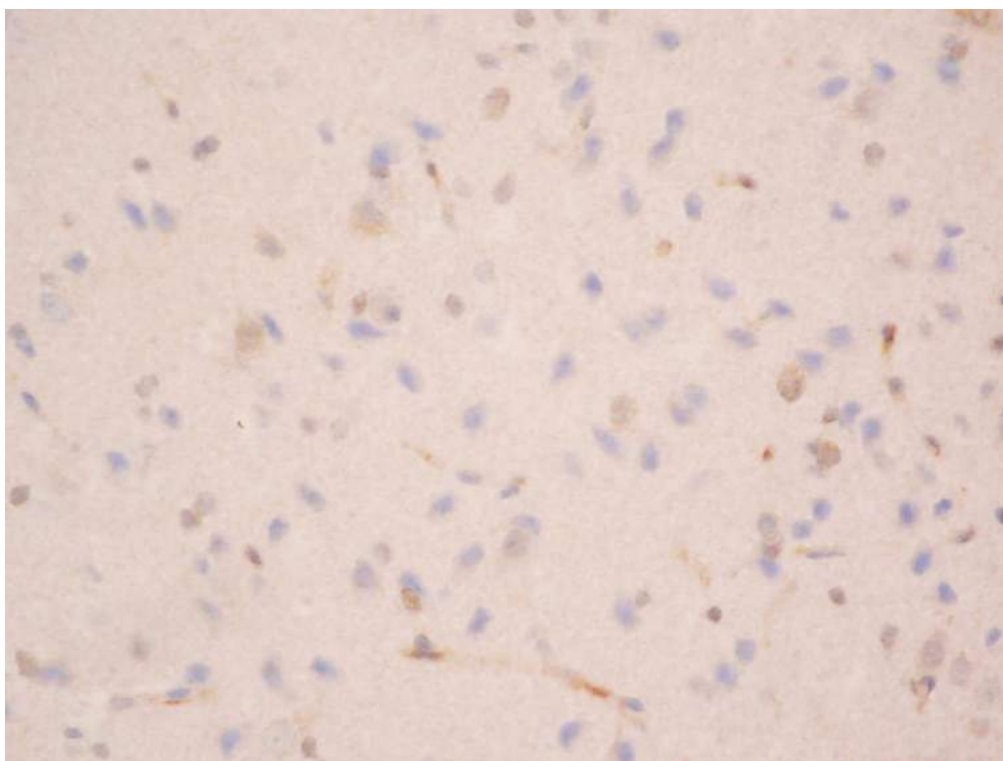


Рис. 7.17. Експресія Vcl-x1 у клітинах VMH щура із ЦД2. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

При лікуванні метформіном на тлі ЦД2 відмічалось незначне зростання експресії Vcl-x1 в нейронах, меншою мірою, гліоцитах та ендотелії (Рис. 7.18).

Експресія протеїну в нейронах мала вид маркованих макул поряд з ядром. У поодиноких нейронах спостерігалось нерівномірне слабе мічення всього обсягу цитоплазми. Зустрічалися гліоцити в яких виявлялися дрібні гранули хромогенну поряд з ядром.

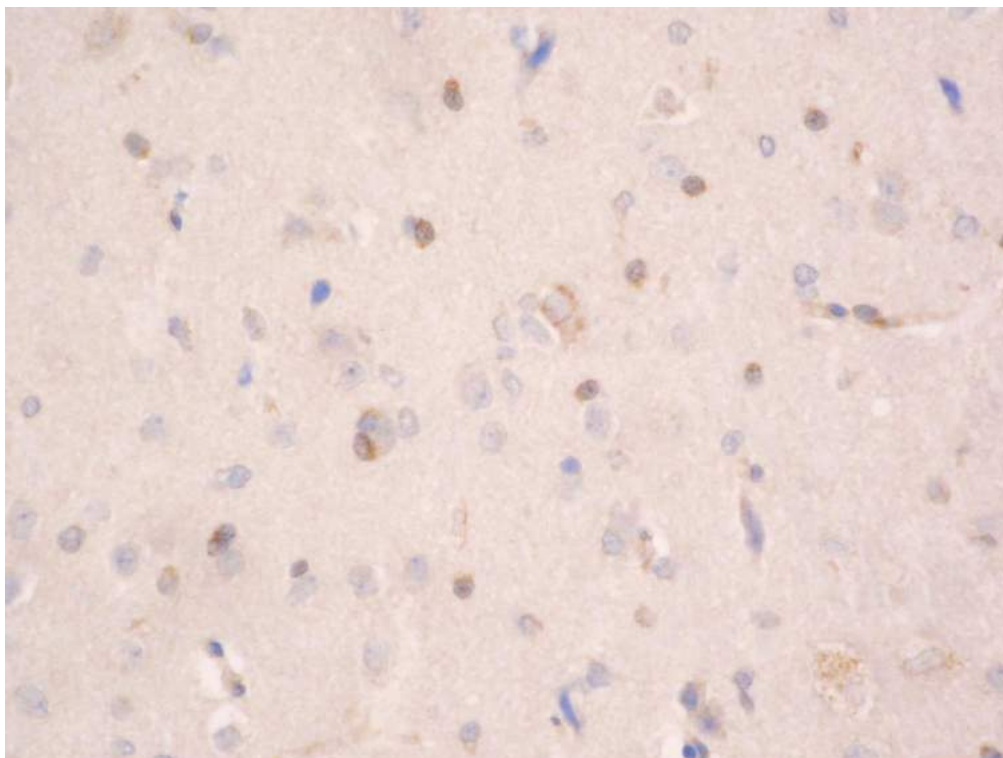


Рис. 7.18. Експресія Vcl-x1 у клітинах VMH щура із ЦД2, що отримували лікування метформіном. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, x400.

При корекції ЦД2 пропіонатом у щурів спостерігалось суттєве зростання експресії Vcl-x1, що практично дорівнювало контролю (Рис. 7.19). Суттєво зростала кількість нейронів з забарвленими макулами, які мали розміри більші ніж у контролі, однак мітилися менш інтенсивно. Частіше ніж у контролі зустрічалися нейрони з нерівномірно, але повністю забарвленою цитоплазмою. Гліоцити також мали збільшені з розміром імунореактивні макули, причому мічені інтенсивніше, ніж у контролі. Експресія Vcl-x1 у ендотелії судин також зростала у порівнянні з клітинами щурів групи ЦД2, але поступалася тій, що виявлялася у контролі.

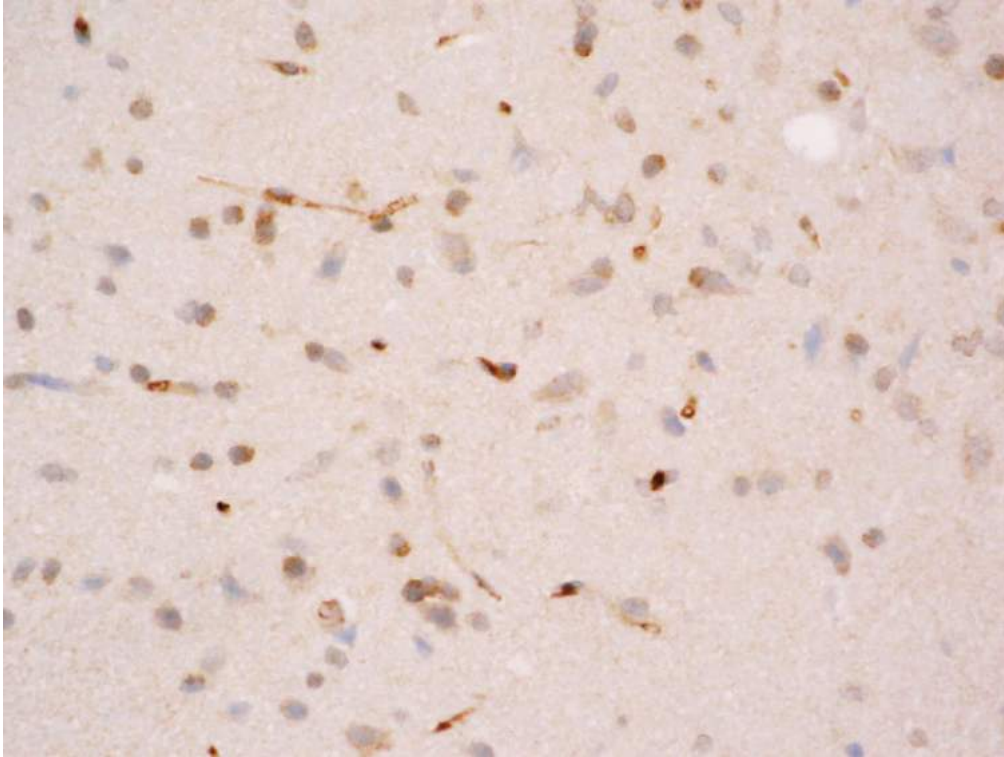


Рис. 7.19. Експресія Vcl-x1 у клітинах VMH щура VMH при введенні пропіонату. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

Комбіноване введення метформіну з пропіонатом у тварин із ЦД2, підвищувало експресію Vcl-x1, навіть більше ніж у контролі. Значна частина нейронів мала інтенсивно мічені макули, а їх розмір був більший ніж у контролі. У гліоцитах також виявили підвищення вмісту Vcl-x1. Рівень експресії Vcl-x1 у ендотелії судин був подібний до контрольного (Рис. 7.20).

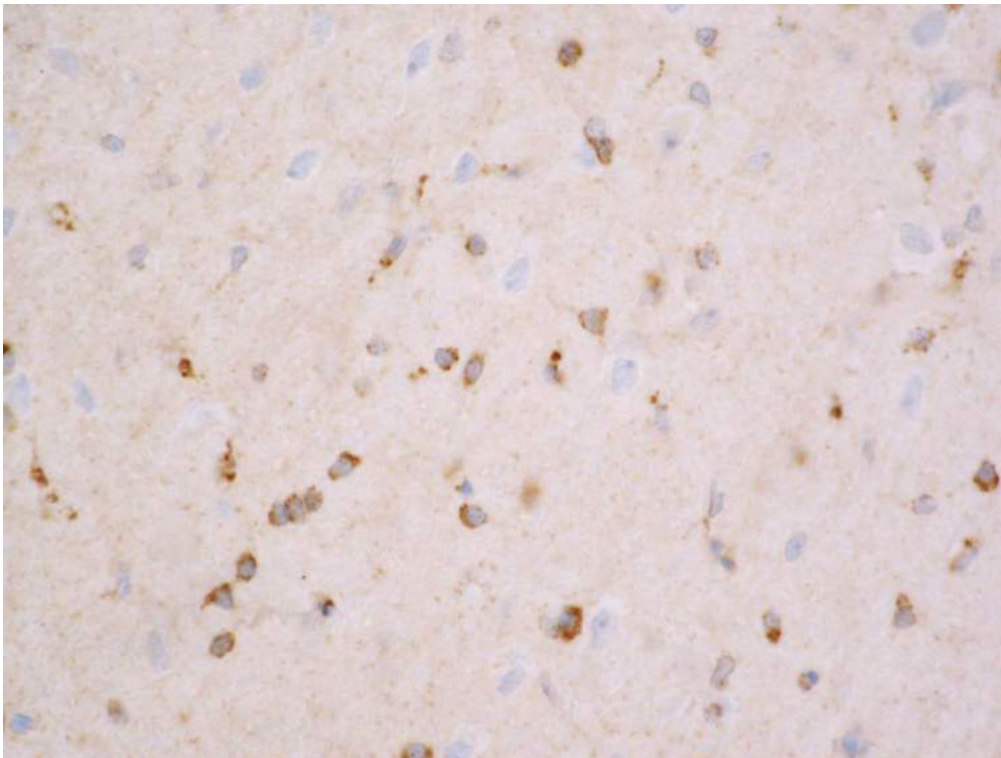


Рис. 7.20. Експресія Vcl-x1 у клітинах VMH щура ЦД2 при комбінованому введенні метформіну з пропіонатом. ІГХ-реакція, гематоксилін. Мікрофото, х400.

За даними ІГХ ми виконали напівкількісну оцінку протеїну Vcl-x1 в цитоплазмі (рис. 7.21) і виявили наступну залежність.

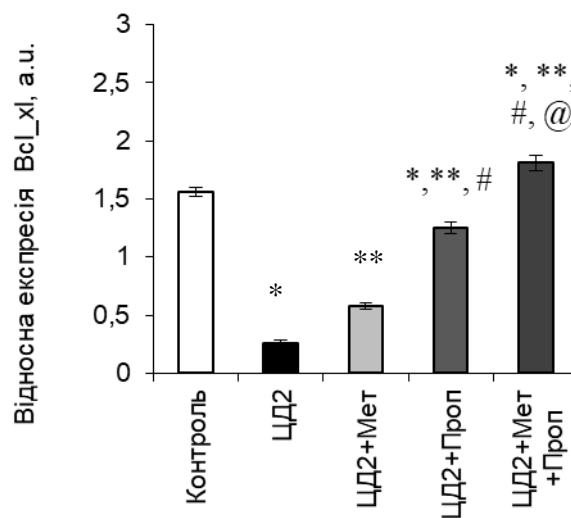


Рис. 7.21. Репрезентативна гістограма напівкількісної оцінки результату імуноцитохімічного аналізу Vcl-x1 в нейронах VMH. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у

порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із введенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із введенням пропіонату.

Результати дослідження вмісту протеїну в клітині за допомогою вестерн-блот аналізу наведені на рис. 7.22.

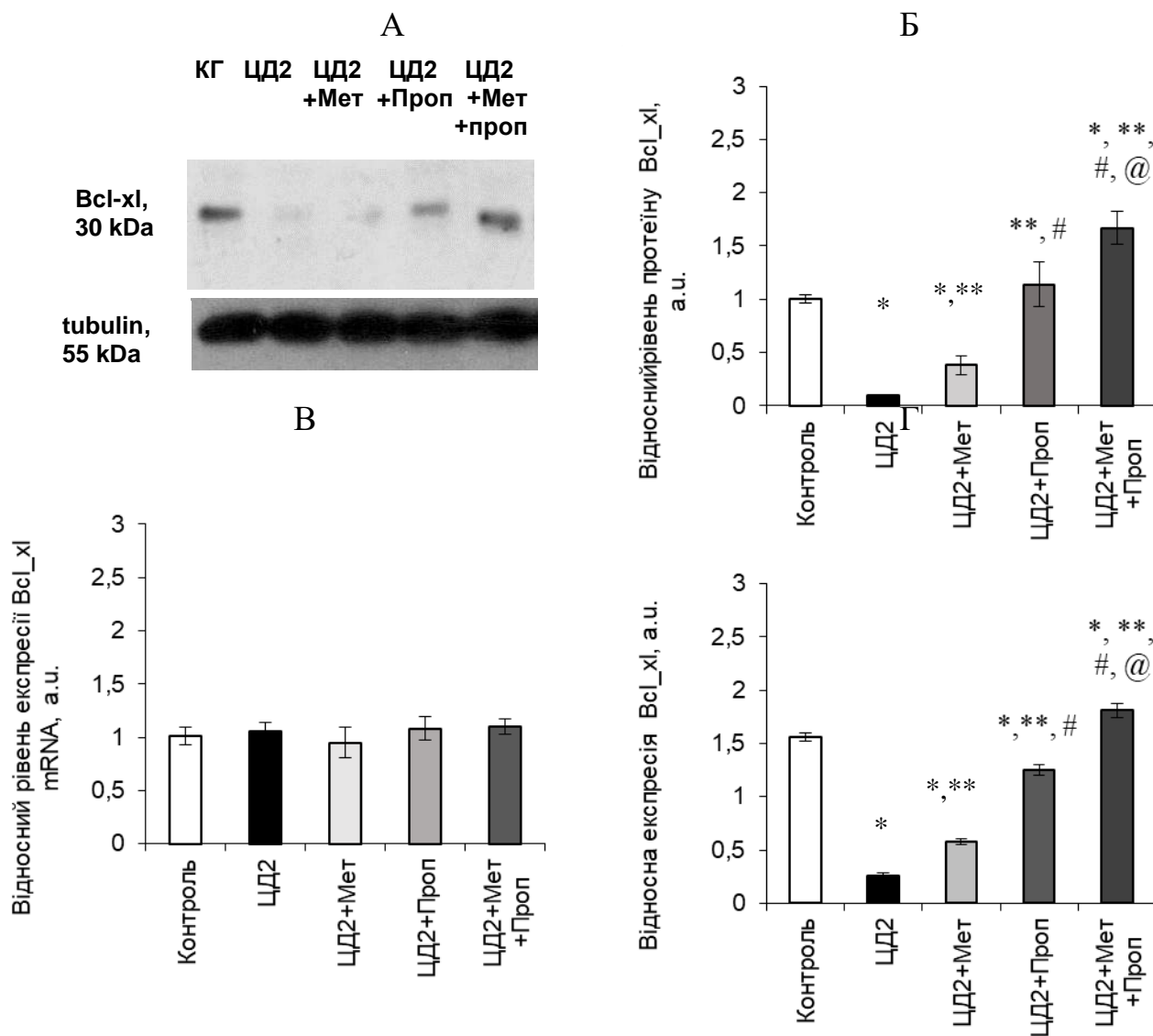


Рис. 7.22. Зміна експресії Vcl-x1 у нейронах VMN щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

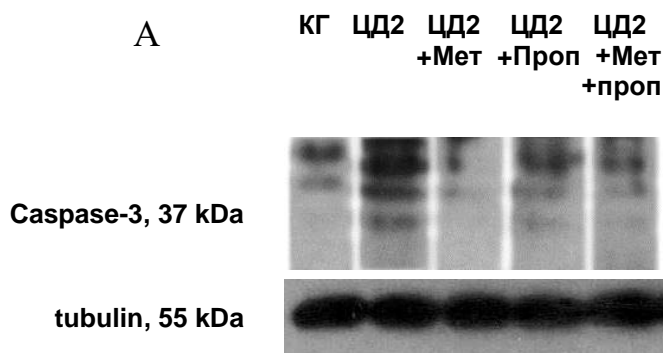
Примітка: А - репрезентативні імуноблотограми. Б - кількісно визначений рівень протеїну Vcl-x1 в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). В- результат кількісної ПЛР Vcl-x1 у VMN щурів: дані нормалізували до β -актину та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів ($n=6$ щурів у кожній групі). Г - репрезентативні гістограми напівкількісної оцінки результату імуноцитохімічного аналізу

ВАН в нейронах VMH. Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * $p < 0,05$ у порівнянні із контролем, ** $p < 0,05$ у порівнянні із ЦД2, # $p < 0,05$ у порівнянні із введенням метформіну, @ $p < 0,05$ у порівнянні із введенням пропіонату.

Ми виявили, що на тлі ЦД2 спостерігається мінімальна експресія протиапоптотичного протеїну Bcl-x1, вміст якого в 10 разів менше контролю ($p=0,0002$). Лікування підвищувало експресію Bcl-x1: при введенні метформіну вміст протеїну був в 3,8 разів більше у порівнянні із ЦД2 ($p= 0,0058$), але залишався нижче контролю в 3,7 разів ($p =0,0065$), при введенні пропіонату – рівень Bcl-x1 дорівнював контролю, а комбінація метформіну та пропіонату підвищувала Bcl-x1 на 67% вище контрольних значень і це було в 16 разів ($p = 0,0005$) вище, ніж при ЦД2. Напівкількісна оцінка ІГХ забарвлення відображала аналогічну картину. Однак, ступінь експресії генів Bcl-x1 в ядрі практично не змінювалася протягом усього спостереження.

Таким чином, на тлі ЦД2 різко зменшується активація протиапоптотичного Bcl-x1, для активації апоптозу нейронів. Корекція препаратами призводила до підвищення протеїну в усіх структурах VMH, причому, комплексне введення метформіну та пропіонату сприяє найбільш ефективній протиапоптотичній дії.

Важливим маркером апоптичної активності клітин є оцінка вмісту Caspase-3 (рис. 7.23).



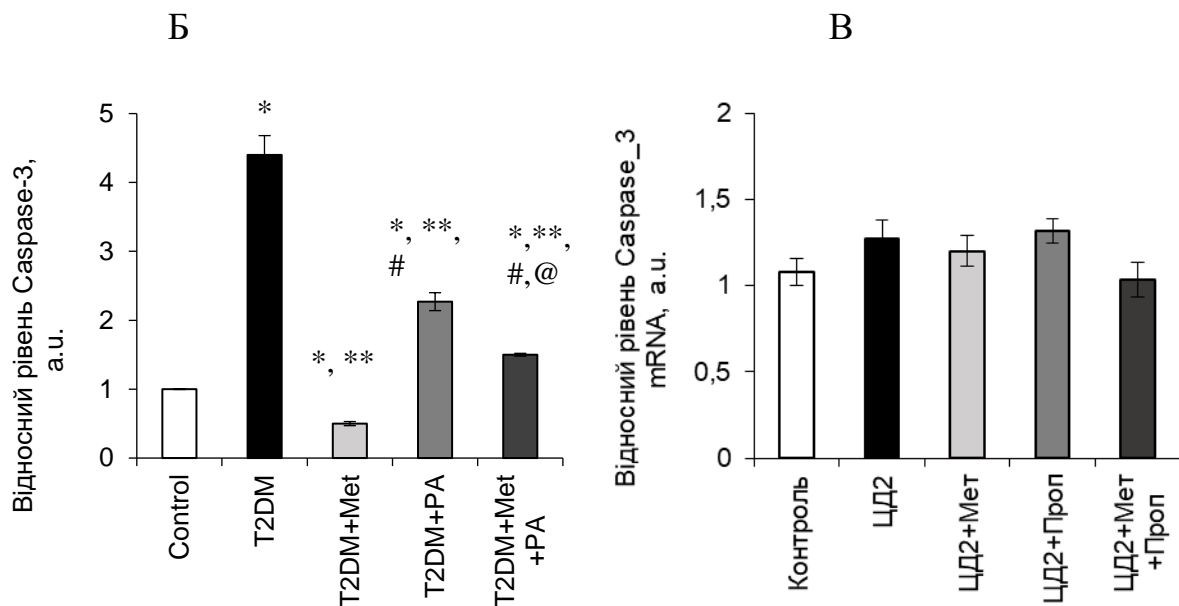


Рис. 7.23. Зміна експресії Caspase-3 у нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та фармакологічної корекції.

Примітка: А - репрезентативні імуноблотограми. Б - кількісно визначений рівень протеїну Caspase-3 в лізатах гіпоталамусу відносно експресії тубуліну (в якості контролю). В- результат кількісної ПЛР Caspase-3 у VMH щурів: дані нормалізували до β -актину та об'єднали за результатами трьох незалежних експериментів (n=6 щурів у кожній групі). Усі дані відображаються як середні значення \pm SEM; * p <0,05 у порівнянні із контролем, ** p <0,05 у порівнянні із ЦД2, # p <0,05 у порівнянні із введенням метформіну, @ p <0,05 у порівнянні із введенням пропіонату.

Як видно з рис 7.23, ми виявили суттєве підвищення в 4,4 рази (p=0,001) Caspase-3 на тлі ЦД2 відносно контролю. Введення метформіну призводить до критичного зменшення протеїну у 8,8 разів (p=0,0001) і повертає значення протеїну практично до значень контролю. На тлі корекції пропіонатом спостерігали 2-кратне зниження Caspase-3 відносно ЦД2, але вміст протеїну залишався більшим в 2,2 рази (p= 0,0002) відносно контролю. Комбіноване введення препаратів знижувало вміст Caspase-3 відносно ЦД2 в 2,93 рази (p=0,0001), однак значення в 1,5 рази (p=0,0001) було більше ніж в контрольній групі. Вивчення експресії гену Caspase-3 не виявило суттєвих коливань на тлі ЦД2 та лікування.

Таким чином, моделювання ЦД2 призводить до максимальної активності апоптозу нейронів VMH та відображується підвищенням Caspase-

3. Лікування метформіном максимально знижує показник до значень КГ. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом є ефективним проти апоптозу, але показник Caspase-3 залишається у 1,5 рази вище контрольної групи.

Для оцінки апоптотичної активності вважається доцільним співставлення маркерів проапоптозу і антиапоптотичних. Ми провели кореляційний аналіз кількісного вмісту маркерів, які ми досліджували (табл. 7.1)

Таблиця 7.1.

Кореляція вмісту протеїнів системи аутофагія/апоптоз в нейронах VMH щурів на тлі ЦД2 та лікування

	Beclin_1	Caspase_3	Bcl_xL	Bax_dimer	LC3
Beclin_1	1	-,042	,537**	,061	,781**
Caspase_3	-,042	1	-,417*	,779**	-,109
Bcl_xL	,537**	-,417*	1	-,344	,477*
Bax_dimer	,061	,779**	-,344	1	-,214
LC3	,781**	-,109	,477*	-,214	1

Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

За даними кореляційного аналізу (табл.7.1), виявлений високий позитивний зв'язок між маркерами аутофагії Beclin-1 та LC3 ($R=0,781$, $p < 0,01$), що підтверджує значну активацію механізмів аутофагії в дослідних групах, і відповідає нашим даним ультрамікроскопічних досліджень, за результатами яких ми виявляла мікропухирці (аутофагосоми) в нейронах щурів VMH. Поряд із цим високий кореляційний зв'язок виявлений між вмістом маркерів аутофагії Beclin-1 та LC3 із антиапоптотичним протеїном Bcl-xL ($R=0,537$, $p < 0,01$ та $R=0,477$, $p < 0,05$), що в свою чергу підтверджує нашу гіпотезу про те, що у даному випадку (на тлі ЦД2 та корекції препаратами) аутофагія є ланкою механізмів, які запобігають апоптозу, і таким чином забезпечують нейрону виживання й адаптацію до умов стресу.

Високий кореляційний зв'язок ($R=0,779$, $p < 0,01$) між універсальним маркером апоптозу Caspase-3 та BAX-димером підтверджує наше уявлення про реалізацію апоптотичної загибелі нейронів за умов ЦД2 саме через мітоптоз - утворення пори в мембрані мітохондрій та їх ушкодження. Очікуваним виявився негативний кореляційний зв'язок цих маркерів апоптозу із антиапоптотичним протеїном Bcl-xL ($R= - 0,417$, $p < 0,01$ та $R=-0,344$).

Отже, проведений кореляційний аналіз підтверджує наші припущення про послідовність та взаємозв'язок апоптозу й аутофагії – як важливих механізмів підтримки внутришньоклітинного балансу і забезпечення виживання нейрону під час стресу ER, який чинить ЦД2.

Висновок: на тлі ЦД2 процеси апоптозу в нейронах VMH набувають максимальної активності, що відображує 4-кратне підвищення Caspase-3 відносно контролю. Важливим механізмом реалізації апоптозу є мітоптоз, через підвищення BAX-димера в 5,7 рази ($p=0,003$) проти контролю. При цьому антиапоптотичний Bcl-x1 в нейронах демонструє зменшення в 10 разів ($p= 0,0002$). Введення препаратів має протективну дію: метформін викликає різке зменшення Caspase-3 в нейронах, але за даними BAX-димера та Bcl-x1 найбільш ефективно знижувало апоптоз нейронів комбінація препаратів метформіну та пропіонату.

Водночас, при введенні пропіонату на тлі ЦД2 виявлена максимальна активність аутофагії, що супроводжується підвищенням в нейронах сигнальних протеїнів, які забезпечують формування мікровезикул: 3-кратне збільшення Beclin-1 ($p =0,003$) та 4-кратне LC3 ($p= 0,002$) проти контролю та ЦД2.

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ожиріння, метаболічний синдром (МС) та цукровий діабет 2 типу (ЦД2) визнані найсерйознішою проблемою здоров'я населення у 21 столітті [15, 34, 54, 104]. Генетичні та молекулярні фактори, вплив середовища, харчування, поведінки сприяють поглибленню МС до ЦД2 і розвитку ряду ускладнень, зокрема діабетичної нейропатії, однак патогенетичні ланки пошкодження нейронів під впливом комбінованого порушення глюкозного та ліпідного гомеостазу залишаються не вивченими. [71, 117, 170].

Дослідження на тваринних моделях відкривають шлях до аналізу внутрішньооклітинних механізмів, що лежать в основі порушень центральної ланки гомеостазу, перш за все дисфункції гіпоталамічних структур на тлі несприятливого впливу ЦД2, і також надають можливість визначити напрямки нових варіантів лікування. Для дослідження ЦД2 в експерименті є декілька шляхів: використання тварин із генетичними модифікаціями, у яких є вроджена гіперглікемія, або тварин із штучно розвинутих порушеннями обміну. Традиційно модулюють ЦД шляхом введення хімічної речовини (аллоксан, стрептозотонин, токсини вірусів тощо); хірургічного пошкодження підшлункової залози; тривалого харчового навантаження або комбінованого впливу факторів [39, 87]. Усі підходи є важливими, оскільки дозволяють аналізувати певні механізми, пов'язані з хворобою і важливі для розуміння патогенезу, прогресування хвороби та екстраполяції на людину. Однак, оскільки ЦД2 є захворюванням із метаболічними розладами, які відображають складну інтеграцію систем організму, необхідно дуже уважно ставитися до вибору правильної моделі тварин для використання в різних експериментах *in vivo* [164].

Описано багато варіацій впливів та навантаження, оскільки різні школи та наукові групи використовують різні комбінації підходів і відповідно

отримують значну варіабельність змін в тканинах, яку складно порівняти і екстраполювати як певний патогенетичний або фармакологічний вплив. Відсутність при дослідженні узгоджених в науковому середовищі стандартів операційних процедур (СОП) значно ускладнює інтерпретацію отриманого результату [18]. З нашої точки зору, для вивчення в експерименті на тваринній моделі стану поєданого порушення ліпідного та вуглеводного обміну, який виникає у людини при розвитку МС і складає патогенетичну основу ЦД2, важливо досягнути розвитку інсулінорезистентності (ІР) [87]. Оскільки, ІР є основним інтегральним механізмом, навколо якого формується ланцюг метаболічних, гемодинамічних порушень і формується симптомокомплекс МС. У 1989 р N. Kaplan додатково виділив абдомінальне ожиріння як найважливіший етіологічний фактор формування ІР та, об'єднавши його з артеріальною гіпертонією, ЦД і гіпертригліцеридемією, ввів поняття «смертельний квартет». У 1992 р Haffner запропонував термін «синдром інсулінорезистентності» [11], під яким прийнято розуміти зниження реакції інсулінчутливих тканин на інсулін при його достатній концентрації, що приводить до хронічної гіперінсулінемії. В основі зниження чутливості до інсуліну може лежати порушення здатності інсуліну пригнічувати продукцію глюкози в печінці і/або стимулювати захоплення глюкози периферичними тканинами. Оскільки у здорових людей 75-80% глюкози утилізується скелетною мускулатурою, основною причиною ІР вважається порушення утилізації глюкози скелетними м'язами.

Історично вважалося, що уявлення про патогенез ЦД2 обертається навколо вісі «глюкоза-інсулін», і діабет є розладом, в першу чергу пов'язаним з порушенням метаболізму глюкози. Пізніше, патогенез ЦД2 почали розглядати в контексті основних порушень ліпідного обміну [23]. Сьогодні доведено, що підвищення в плазмі вмісту вільних жирних кислот грає ключову роль в розвитку ЦД2, викликаючи ІР [41, 44, 62, 90, 98, 128]. Цей механізм є зрозумілим через усвідомлення еволюційного шляху раціонального використання енергетичного «палива» в організмі. Відповідно

до гіпотези «економного гену», ймовірність того, що людина виживе під час голоду, буде збільшена, якщо вона зможе накопичувати енергію (у вигляді жиру) під час надлишку їжі, а потім під час голодування збережений жир може бути використаний [23]. Для цього, адіпоцити поглинають і зберігають ЖК, а при зменшенні надходження в організм продуктів, що вміщують «легкі» джерела енергії - вуглеводи, ЖК вивільняються із жирової тканини і інші тканини використовують їх якості енергетичного палива. Але, якщо рівень ЖК в плазмі підвищується більш ніж на кілька годин, виникає ЖК-індукована ІР, яка сприяє збереженню вуглеводів для використання тканинами, наприклад, нервова, які не використовують інший енергетичний субстрат [41]. Це дуже обґрунтований механізм для раціонального виживання і роботи мозку під час голодування, або в другій половині вагітності, коли резистентність до інсуліну у матері зберігає глюкозу для зростаючого плоду, але в інших випадках ЖК-індукована ІР стає контрпродуктивною. В дослідження описано про вплив тривалого HFD навантаження на функції мозку мишей. Автори виявили когнітивні порушення через підвищений окислювальний стрес, резистентність до інсуліну, пригнічення рецептора адипонектину нейрозапалення [50, 56, 62].

В експерименті харчове навантаження у вигляді високожирової дієти (High Fat Diet – HFD) є досить розповсюдженим екзогенним фактором, який викликає підвищення маси тіла експериментальних тварин. Однак, доза жиру, його склад, та головне – тривалість харчування суттєво розрізняється у дослідників від 3 до 8 тижнів [4, 9]. Як відомо, харчування фруктозою сприяє розвитку ІР оскільки виключає стимулювання інсулінового апарату підшлункової залози [3, 4]. Дослідження [4] із фруктозною стимуляцією показали, що використання 10% розчину фруктози впродовж 8 тижнів сприяло помірному збільшенню маси тіла та незначному підвищенню рівня глюкози. Застосування 60% розчину фруктози мало певні переваги у виразності основних клінічних ознак ІР (розвиток гіперглікемії, гіпертригліцеридемії, гіперхолестеринемії, підвищення концентрації

ЛПНЩ). Автори вважають високофруктозну дієту оптимальною моделлю для експериментального формування ІР [4].

В нашій роботі, для відтворення в експерименті розвитку порушень гомеостазу на кшталт МС/ЦД2 щурів утримували на харчуванні HFD із додаванням фруктози протягом трьох місяців, із подальшим додатковим пригніченням функції β -клітин підшлункової залози однократною ін'єкцією стрептозотоцину. Для підтвердження адекватності нашої експериментальної моделі були проведені тести толерантності до інсуліну (ПТТ), виміряні параметри тіла тварин, рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну (HbA1c). Тварини групи ЦД2 продемонстрували значне збільшення ваги та показників тіла порівняно з контрольними щурами, що відображає розвиток ожиріння. Підвищення рівня глюкози в крові в сироватці крові щурів ЦД2 було свідченням стійкої гіперглікемії, а стабільно підвищений рівень HbA1c - чітким біомаркером, що підтверджує розвиток експериментально індукованого ЦД2 у щурів. Нарешті, виявлене суттєве гальмування виділення інсуліну у відповідь на глюкозну стимуляцію (на основі ПТТ) підтвердили порушення периферичного гомеостазу глюкози.

Отримані дані ми співставили із нашими дослідженнями ліпідного метаболізму хворих із різним ступенем діабетичної ретинопатії (ДР) на тлі ЦД2 [122] і аналізом інформативності біохімічних маркерів для оцінки порушення ліпідного метаболізму на тлі гіперглікемії у пацієнтів із ДР [27, 85, 113]. При цьому в роботі [122] ми порівнювали групи відносно здорових осіб, пацієнтів із діагностованим тривалим ЦД2, та пацієнтів без ЦД2, але із визначеними метаболічними зсувами за показниками ліпідного та вуглеводного обміну. Ми прийшли висновку що у пацієнтів із ЦД2 показники загального холестерину та ЛПВЩ та тригліцеридів не мали достовірної різниці у порівнянні із здоровими особами. Основною відмінністю ліпідного обміну пацієнтів з ускладненим тривалим ЦД2 та здорових осіб була суттєва різниця перерозподілу вмісту ЖК в мембранах еритроцитів у вигляді підвищення «насиченості». Вміст НЖК у пацієнтів з

ЦД2 був вище ніж в КГ за рахунок пальмітинової, мірістинової, пентадеканової та маргаринової ЖК. Вміст ННЖК змінювався різнонаправлено, але суттєво зменшувався вміст лінолевої та арахідонової ЖК. Вважається, що саме розподіл ЖК в мембранах клітин є найбільш важливим параметром, за яким оцінюють ступінь порушення ліпідного метаболізму [85]. Для наочності відтворених змін у експериментальних тварин, вважаємо доцільним навести діаграми перерозподілу вмісту інтегральних компонентів ЖК в мембранах еритроцитів пацієнтів вказаних груп (рис. 8.1) для співставлення із змінами вмісту ЖК, які ми спостерігали в печінці експериментальних щурів.

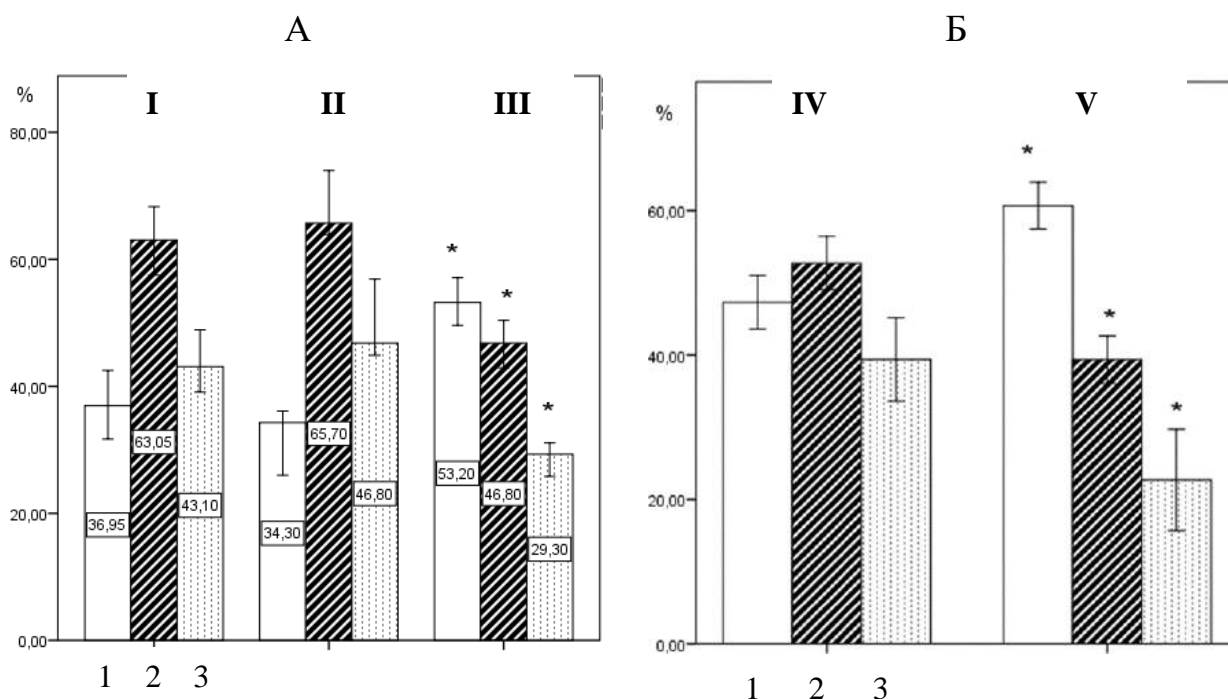


Рис. 8.1. Вміст (%) суми насичених (1), ненасичених (2), поліненасичених (3) ЖК в складі мембрани еритроцитів людей (А) та тканини печінки щурів (Б). I - група здорових осіб, II – пацієнти без ЦД2, але із підвищеними біохімічними показниками ліпідного та вуглеводного обміну, III -пацієнти із довготривалим ЦД2, ускладненим ДР, IV – щури контрольної групи, V – щури із експериментальним ЦД2. Примітка * - відмінність із відповідним показником контрольної групи $P < 0,05$.

Отже, моделювання на щурах експериментального ЦД2 шляхом харчового навантаження (високо-жирова дієта (45% жиру)+фруктоза) протягом 3 місяців із подальшою однократною індукцією стрептозотоцином

(25 мг/кг), викликає зміни ліпідного та вуглеводного метаболізму в організмі тварин співставні з аналогічними змінами в організмі пацієнтів із розвинутими мікросудинними ускладненнями на тлі ЦД2. Ми визначили оптимальну комбінацію впливів, та розробили послідовну схему навантаження яка дозволяє отримати в експерименті тваринну модель на кшталт ЦД2. За допомогою діагностичного алгоритму, який включає фізіологічні та лабораторні методи, визначили ступінь ушкоджень органів та систем і провели порівняння із рівнем метаболічних порушень у пацієнтів з ЦД2 та осіб без діабету.

Основним об'єктом нашого вивчення були нейрони гіпоталамусу, як центру регуляції гомеостазу організму, зокрема його венстромедіального (VMH) ядра. Оскільки, дизрегуляція функцій ядер гіпоталамусу вважається одним із основних механізмів порушення метаболізму глюкози та розвитку ЦД2 і пов'язана з запаленням гіпоталамусу низького ступеня, виникнення резистентності нейронів гіпоталамусу до лептину та порушенням нейрогенезу. [35, 56, 72, 95, 96, 137].

Нейробиологічна основа лептинорезистентності залишається остаточно нез'ясованою і розглядається гіпотеза, яка визначає шляхи формування стану: гіпоталамічне запалення; порушення аутофагії нейронів; стрес ER [49, 57, 76, 125, 152], який активує сигнальну UPR-систему [42]. Тому, наше дослідження було присвячено вивченню структурних змін ER в нейронах VMH, процесу аутофагії, системі UPR та ERAD і пов'язаним з дисбалансом внутрішньоклітинного гомеостазу – апоптозом нейронів на тлі експериментального ЦД2 щурів та варіантах фармакологічної корекції.

Для корекції порушень в нервовій тканині, викликаних ЦД2, ми обрали метформін та пропіонат, який є призначається у якості дієтичної добавки пацієнтам із нейродегенеративними (аутоімунними) захворюваннями [24, 64, 144]. Недоліки монотерапії метформіном обговорюються вже давно, але все ж таки він залишається найпопулярним препаратом зниження гіпеглікемії [47, 54, 110, 129, 163]. Механізм впливу пропіонату на нейрони не відомий і

активно вивчається. Вважається, що пропіонат, при надходженні у кишечник, стимулює імунні клітини, зокрема Т-лімфоцити стінки кишечника, викликає синтез нейромедіаторів, цитокінів, гормонів, які акцептуються нейроглією, що пригнічує демієлінізацію і опосередковано впливає на властивості нейронів [12, 14, 20, 22, 45, 58, 144, 158, 165].

Дослідження нейронів шляхом електронної мікроскопії, які набули основну популярність у 60-70 роки минулого сторіччя, сьогодні не дуже поширені, але вивчення особливостей зміни важливих внутрішньоклітинних структур є можливим лише на рівні ультраструктури [83, 150, 159, 171, 181,]. У ході електронно мікроскопічного дослідження ми спостерігали глибокі ультраструктурні зміни нейронів, спричинені HFD: каналці та цистерни ER в більшості нейронів були збільшені; виявлено скупчення фрагментованих мітохондрій з ознаками руйнування крист та набряком матриксу; ядра були пікнотично змінені з ознаками конденсації хроматину, виявлені глибокі інвагінації ядерної мембрани, схожі механізми ушкодження демонстрували [134]. У групі ЦД2 більшість нейронів мали ознаки апоптозу та втрату дендритів. Більше того, ми виявили морфопатологічні зміни гліальних клітин у VMH - набухання цитоплазми, зменшення кількості органел. Це узгоджується з даними, що розглядають діабет як хворобу стресу ER, але в β -клітинах [157], або за умов активації сигнальних систем клітини [150] Більше того, дослідження в периферичних тканинах встановили роль ER-сигналінгу як ключового прозапального медіатора в патогенезі захворювань, пов'язаних із переїданням [154, 179].

Під впливом фармакологічної корекції ЦД2 спостерігалася цікава тенденція: усі змінені параметри покращувалися, але у різній мірі при введенні метформіну, пропіонату та їх комбінуванні. Однак, незважаючи на підтвердження розвитку дисфункції ER на тлі ЦД2, і загального позитивного впливу лікування, ми також отримали нові дані щодо впливу метформіну та пропіонату на морфологію ER у VMH. Так, важливою відзнакою введення

метформіну було виявлення нейронів із значною кількістю ліпофусцину. Вважається, що накопичення ліпофусцину, ознака «старіння» клітини, пригнічення убіквілін-протеосомної системи, реакції на стрес, підвищення окисдації ненасичених ЖК, що призводить до дегенерації нейронів. Тому, незважаючи на традиційне призначення метформіну на тлі ЦД2, вважаємо, що монотерапія метформіном є недостатньою, оскільки не запобігає розвитку діабетичної енцефалопатії [47, 48, 54, 163].

Введення пропіонату на тлі ЦД2 викликало також покращення архітекtonіки ER, як це спостерігалось у групі метформіну, але з більш вираженим ефектом. Відносна площа ER-мембран і цистерн як і загальна доля ER в клітинах суттєво зменшувалась. Крім того, добре візуалізувалися цистерни та трубочки ER, із чіткими рибосомами на поверхні, які практично не відрізнялися від контролю. Більше того, ми отримали нові дані щодо впливу пропіонату на апоптоз та аутофагію нейронів. Введення пропіонату призвело до зменшення кількості апоптотичних темних нейронів з пікнотично зміненими ядрами порівняно з групою ЦД. Варто підкреслити, що на відмінність від групи ЦД2, яка отримувала метформін, при введенні пропіонату астроцитозна глія не демонструє ознак набряку. І головною ознакою впливу пропіонат ми виявили збільшення аутофагосом.

Варто зазначити, що за даними електронної мікроскопії, при комбінованому введенні метформіну з пропіонатом, ми не виявили очікуваних найбільш ефективних змін нервової тканини, ніж при роздільному введенні препаратів. Тим не менше, після комбінованого введення ми виявили збільшення кількості мікрогліальних клітин, преапоптотичних та апоптотичних нейронів, які в свою чергу можуть активувати мікроглію, а також значне зменшення відсотка світлих нейронів порівняно з контрольною групою. Слід зазначити вплив комбінованого введення метформіну з пропіонатом та на ER – суттєве зменшення відносної площі мембран та цистерн порівняно з усіма 3 групами (контроль, ЦД2 та ЦД+Мет). Єдиними параметрами, які встановилися до контрольних значень

після комбінованого введення препаратів, були співвідношення S цист/S мембр та відношення площі перинуклеарного простору/довжини периметра ядра. І цікавим спостереженням ми вважаємо при введенні пропіонату: суттєве зменшення відносної площі мембран ER, яке поєднується із підвищенням аутофагосом, які розташовані в зоні ER, підвищенням вмісту в нервовій тканині маркерів аутофагії LC3 та Beclin-1, та зниженням активності апоптозу нейронів (який ми спостерігали на тлі ЦД2). Отримані дані надали нам підставу сформулювати гіпотезу про утворення мікропухирців в нейронах VMH щурів тлі ЦД2 із мембрани ER, що розкриває механізм реалізації ERAD-системи – утилізації пошкоджених протеїнів в межах ER (англ., Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) [149].

Визнаним сучасним підходом вважається оцінка вмісту в досліджуваній тканині протеїнів, які формують систему UPR [93, 39, 130, 143, 176, 177] Тому, ми вивчали вміст шаперону BiP/GRP78 та його трансмембранних партнерів ATF6, IRE1 α й PERK [106] в нервовій тканині VMH на тлі ЦД2 шляхом ІГХ фарбування та напівкількісного аналізу і визначення вмісту білків за допомогою Вестерн-блот методики. Додатково ми визначали ступінь експресії гену кожного протеїну, шляхом підрахунку кількості мРНК, яку визначали за допомогою ПЛР-реал тайм аналізу.

Наші спостереження виявили цікаву тенденцію, зміни рівнів мРНК компонентів системи UPR були незначними у максимум на 36-38% від контролю, водночас вміст протеїнів в клітині відрізнявся у рази. Ми вважаємо, що пояснити цю розбіжність можна тим, що цитоплазматичні процеси (накопичення протеїнів, руйнування, витрачання тощо) це більш реактивні процеси і вони можуть змінюватися під впливом екзогенних факторів, зокрема гіперглікемії, гіперліпідемії, впливу препаратів. Водночас, транскрипція в ядрі певних ділянок ДНК і підвищення вмісту мРНК, мають більшу консервативність, у ряді випадків це генетично детерміновані. Тому, при компенсації стресу ER ми спостерігали більш виражені коливання PERK, ATF6 та IRE1 у нейронах VMH ніж процесів їх ядерної транскрипції.

Дослідження компонентів системи UPR-системи стало одним із ключових напрямків роботи. Отже, нами був досліджений вміст GRP78 - як визнаного головного регулятора стресу ER [93, 130, 169, 176], завдяки його властивостям контролювати активацію сигналізації UPR та координувати внутрішньоклітинний гомеостаз.

Ми виявили, що рівень GRP78 у VMH щурів ЦД2 був значно нижчим, ніж у контролі як на ІГХ, так і при Вестерн-блот дослідженні. З нашої точки зору це може бути пояснено структурною перебудовою протеїну під час його функціональної активності. За умов стресу ER, шаперон секвеструється в цистерну та поєднується із місфолдінговими протеїнами для їх інактивації. Ці комплекси «шаперон+неструктурований білок» ефективно утилізує система ERAD. Трансмембранні партнери шаперону негайно відгукуються на зниження вмісту протеїну і їх вміст значно підвищується, що співпадає із досвідом [149]. Особливо ATF6 і IRE1 – датчиків, які стимулюють транскрипцію в ядрі гену GRP78 [66]. Доречи, при цьому навіть спостерігали тенденцію до підвищення транскрипції відповідного гену GRP78 (за даними мРНК). Така гіпотеза підтверджується і зменшенням ATF6 і IRE1 по мірі підвищення в цитоплазмі GRP78 на тлі корекції. При цьому і введення пропіонату, і комбіноване введення пропіонату з метформіном демонструє позитивний ефект.

Щодо протеїну PERK – ми бачимо стрімке зростання маркера вже на тлі розвитку ЦД2 – що є природнім, оскільки клітина має призупинити фолдінг, якій є неефективним. На тлі корекції стану окремо метформіном та пропіонатом ми спостерігаємо підвищення PERK. Але саме комбінація препаратів знижує PERK хоча і не до значень контролю, але найбільш ефективно. Вважаємо це корисним ефектом, оскільки тривалий блок трансляції за рахунок стійкого сигналу PERK є несумісним з виживанням [63, 161].

Отримані дані ми пропонуємо розглянути на схемі (рис. 8.2), яка демонструє взаємовідношення компонентів UPR-системи нейрону VMH в спокою, за умов ЦД2 та корекції та складається в певну концепцію.

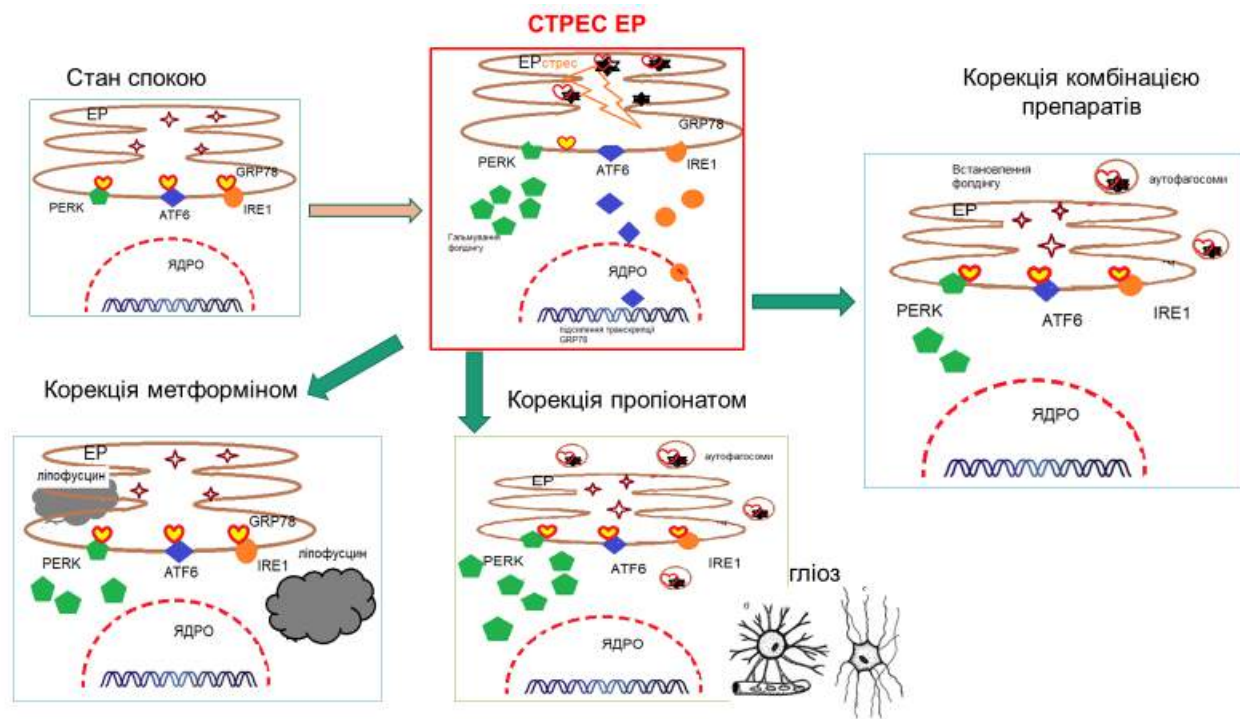


Рис. 8.2. Схема зміни співвідношення компонентів UPR-системи нейрону VMH в спокою, за умов ЦД2 та корекції.

За умов ЦД2 в нейронах VMH виникає стрес EP: вміст шаперону GRP78 зменшується в цитоплазмі вдвічі, оскільки він секвеструється в цистерну EP та поєднується із місфолдінговими протеїнами для їх інактивації. Вміст трансмембранних UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK значно підвищується для стимуляції транскрипції в ядрі гену GRP78 та гальмування фолдингу. Введення препаратів підвищує в ядрі транскрипцію відповідного гену GRP78 (за даними мРНК), і по мірі підвищення в цитоплазмі GRP78 зменшує ATF6 і IRE1. Введення метформіну на тлі ЦД2 супроводжується накопиченням ліпофусцину, що є ознакою «старіння» клітини, пригнічення убіквітин-протеосомної системи та дегенерації нейронів. Введення пропіонату

поліпшує ультраструктуру VMH, індукує аутофагію за рахунок структур ER, що на тлі зменшення апоптотичних змін нейронів, демонструє ефективний механізм компенсації стресу ER системою ER-деградації, водночас супроводжувалося максимальною активацією гліальних структур. Найбільш ефективно встановлює синтез білків в ER за рахунок зниження PERK - комбіноване введення препаратів.

Як ми вже вказували, протективними заходами при функціональному напруженні в клітинах, стресі ER - є універсальні механізми, притаманні усім еукаріотам, активація UPR-системи, механізми аутофагії та апоптозу [86, 93, 130, 169, 178]. Оскільки процеси аутофагії та апоптозу пов'язані між собою, вважається що долю клітини при адаптації до стресу вирішує «перемикання» головного регулятора аутофагії Beclin-1 та його взаємодія з Bcl-2 і іншими шляхами апоптотичної загибелі клітин [151]. Однак, як регулюється експресія вказаних протеїнів, які регулятори і точні механізми це визначають поки ще не з'ясовано [160]. За нашими даними і проведенням кореляційним аналізом вмісту маркерів ми виявили високий кореляційний зв'язок ($R=0.779$, $p < 0,01$), між Caspase-3 та BAX-димером, що свідчить про реалізацію апоптозу нейронів VMH за рахунок мітоптозу. Враховуючи наші спостереження – ця думка підтверджується ультрамікроскопічними даними, виявленими набряком та деструкцією мітохондрій на тлі ЦД2. Виявлений нами високий кореляційний зв'язок маркерів аутофагії Beclin-1 та LC3 із антиапоптотичним протеїном Bcl-xL свідчить про механізми протидії апоптозу та адаптацію нейронів до умов стресу ER саме за рахунок утворення аутофагосом. Ми вже вказували, що за даними електронномікроскопічних досліджень та морфометрії, мікровезикули формуються із мембран ER і максимальна їх кількість спостерігається на тлі введення пропіонату.

Отже, підсумовуючи дані нашої роботи ми пропонуємо також схему процесів, які демонструють «переключення/switch» шляху потенційної апоптотичної загибелі нейронів, загроза якої виникає на тлі некоригованої гіперглікемії на механізми підсиленої аутофагії, утилізації протеїнів ERAD-

системою, але тим самим збереження нейронів, певної адаптації до зсувів гомеостазу і компенсації стресу ЕР (рис. 8.3).

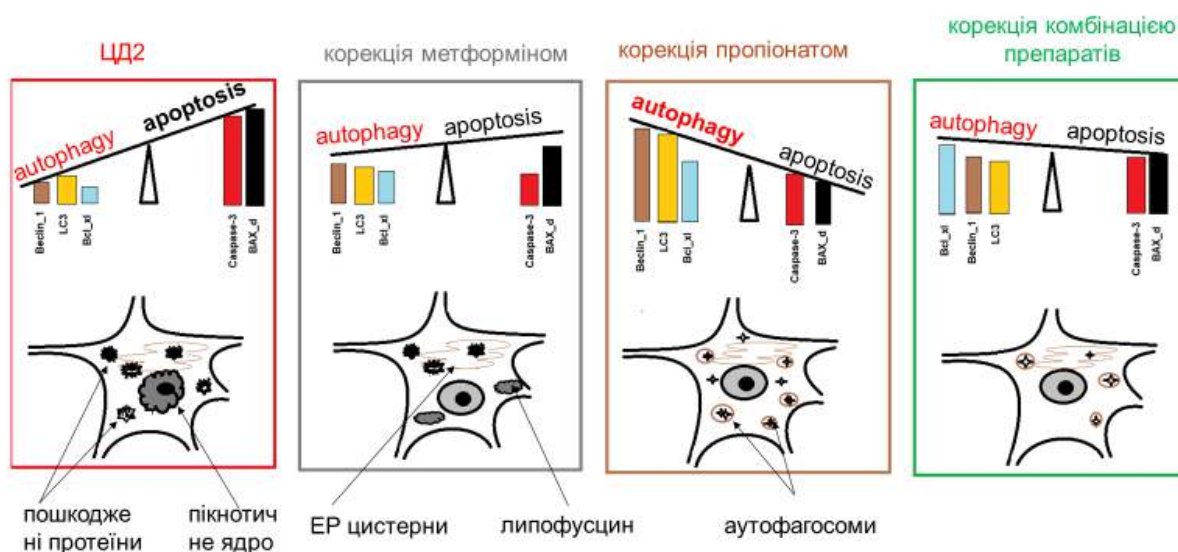


Рис. 8.3. Схема «переключення/switch» шляху апоптотичної загибелі на механізми аутофагії для утилізації протеїнів ERAD-системою і збереження клітини.

На тлі ЦД2 в нейронах VMH спостерігали максимальне підвищення вмісту маркерів апоптозу Caspase-3 та BAX-димеру, що свідчить про загибель нейронів, переважно шляхом митоптозу. Введення метформіну щурам із ЦД2 призводить до найбільш ефективного зниження Caspase-3, але не забезпечує систему ефективного виведення продуктів деградації протеїнів. Проте, введення пропіонату максимально підсилює аутофагію і демонструє «переключення/switch» шляху апоптотичної загибелі на механізми аутофагії. Найбільший баланс механізмів компенсації стресу ЕР та адаптації нейронів спостерігали при комбінованому введенні препаратів.

Отже, вивчення ультраструктурних змін нейронів VMH на тлі ЦД2 показало високу ступінь ушкодження ЕР, розширення цистерн, перинуклеарного простору, десквамації рибосом, ушкодження через набряк мітохондрій та великої кількості нейронів із пікнотично зміненими ядрами.

Такі морфологічні зміни у сукупності із біохімічними маркерами UPR-системи повністю пояснюють механізм ушкодження нейронів на тлі HFD розвитком стресу ER. При цьому в клітинах максимально пригнічується система протиапоптотичного збереження і активується апоптоз.

Введення препаратів щурам з ЦД2 певною мірою покращує стан нейронів. Однак, на тлі монотерапії метформіном ефективно зменшувався лише один маркер Caspase-3, водночас, особливістю введення метформіну було виявлення клітин із значною кількістю ліпофусцину, який сигналізує пригнічення убіквітин-протеосомної системи, підвищення оксидативної ненасичених ЖК і є ознакою «старіння» та дегенерації нейронів. Тому, вірогідно, монотерапія метформіном не запобігає розвитку діабетичної енцефалопатії і є недостатньою при ЦД2. Введення пропіонату на тлі ЦД2 максимально активує аутофагію в нейронах, що можна розцінити як адаптивну реакцію на стрес ER, однак через дію на вісь «кишківник-глія-нейрон», призводить до нейрогліозу.

Комбіноване введення метформіну та пропіонату за більшістю показників демонструє ефективний вплив на нейрони, з огляду на реалізацію в клітині сигналів UPR-системи, маркери анти- та проапоптозу, і в результаті найбільшу адаптацію нейронів до виживання за умов стресу ER, що може бути підґрунтям для подальшої перспективи використання вказаних препаратів і розробки схем нейропротекції.

ВИСНОВКИ

1. Моделювання на щурах експериментального ЦД2 шляхом харчового навантаження (високо-жирова дієта (45% жиру)+фруктоза) протягом 3 місяців із подальшою однократною індукцією стрептозотоцином (25 мг/кг), викликає зміни ліпідного та вуглеводного метаболізму в організмі тварин (гіперглікемію, інсулінорезистентність, ожиріння, підвищення в печінці вмісту насичених жирних кислот тощо), співставні з аналогічними змінами в організмі пацієнтів із розвинутими мікросудинними ускладненнями на тлі ЦД2, що обґрунтовує використання моделі для дослідження порушень нервовій тканині та їх корекції.

2. На тлі ЦД2 в VMH за допомогою електронної мікроскопії виявлено значна кількість апоптотичних нейронів, набряк нейропілю та зміни ER: збільшення відносної площі цистерн в 2,25 рази ($p=0,024$), розширення перинуклеарного простору 44% ($p=0,038$). Введення препаратів зменшувало відносну площу цистерн ER: метформіну на 36% ($p=0,046$); пропіонату в 3 рази ($p=0,009$), а поєднання препаратів в 3,4 рази ($p=0,008$). Загальна доля ER у клітині зменшувалась після дії пропіонату на 66% ($p=0,03$); поєднання препаратів на 80% ($p=0,019$).

3. Функціональною ознакою стресу ER на тлі ЦД2 в нейронах VMH було зниження у 2 рази рівню GRP78 та підвищення трансмембранних протеїнів PERK, ATF6, IRE1. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом найбільш ефективно активувало ядерну транскрипцію GRP78, через сигнальні шляхи ATF6, IRE1, а також ефективно знижувало PERK, що відновлювало синтез протеїнів і сприяло встановленню функції ER у нейронах.

4. На тлі ЦД2 в зоні VMH виявили ознаки нейрогліозу за підвищенням рівня Iba1 у 5,44 разів ($p=0,01$) та зниженням маркера десмосом ZO-1 на 89% ($p=0,002$). Рівень білка GFAP не змінювався в групі ЦД2. Введення пропіонату на тлі ЦД2 ще додатково призводило до активації гліальних структур і підвищувало рівень усіх маркерів: Iba1 на 63% ($p=0,035$),

GFAP у 3 рази ($p < 0,001$) і ZO-1 до значень контролю. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом найбільш позитивно впливало на стан нейроглії: знижувався рівень Iba1, GFAP та підвищувався вміст ZO-1.

5. Відтворення ЦД2 не змінювало маркери аутофагії нейронів VMH, а введення метформіну з пропіонатом підвищувало вміст LC3 та Beclin-1. Максимальний рівень протеїнів спостерігали на тлі введення пропіонату: підвищувався Beclin-1 у 3 рази ($p=0,003$) та LC3 у 4 рази ($p=0,002$), що відповідало ультрамікроскопічній картині збільшення кількості аутофагосом.

6. На тлі ЦД2 в нервовій тканині VMH рівень Caspase-3 був підвищений в 4,4 рази ($p=0,001$), BAX-димеру - в 5,7 разів ($p=0,003$), вміст протиапоптотичного протеїну Bcl-x1 було зменшено в 10 разів ($p=0,002$), що відповідало ультрамікроскопічній картині збільшення кількості апоптотично пошкоджених нейронів. Комбіноване введення метформіну з пропіонатом знижувало вміст Caspase-3 в 4,5 рази ($p=0,0001$), вміст BAX до значень контролю, а експресію Bcl-x1 підвищувало в 16 разів ($p=0,0005$) відносно ЦД2.

7. Сформована концепція зміни нейронів VMH щурів на тлі ЦД2 та протективного впливу комбінованого введення метформіну з пропіонатом на стан нервової тканини. На тлі ЦД2 в нейронах VMH виникає стрес ER: рівень шаперону GRP78 зменшується в 2 рази, оскільки він секвеструється в цистерну ER та поєднується із місфолдінговими протеїнами для їх інактивації. Вміст трансмембранних UPR-датчиків ATF6, IRE1, PERK значно підвищується. Під дією метформіну або пропіонату шляхи ATF6, IRE1 активуються різною мірою, що сприяє синтезу GRP78, але зберігається підвищення PERK, який гальмує фолдінг в клітині. Комбіноване введення препаратів найбільш ефективно відновлює вміст в цитоплазмі GRP78, зменшує ATF6, IRE1, PERK і сприяє компенсації стресу ER.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Байрашева ВК. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте. Современные проблемы науки и образования. 2015.(4). Доступный з: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21024>.
2. Кравчук ЕН, Галагудза ММ. Экспериментальные модели метаболического синдрома. Артериальная гипертензия. 2014; 20 (5): 377-83. Доступный з: <https://cyberleninka.ru/article/n/eksperimentalnye-modeli-metabolicheskogo-sindroma>.
3. Лещенко ДВ, Костюк НВ, Егорова ЕН, Белякова МБ, Миняев МВ, Петрова, МБ. Моделирование метаболического синдрома у животных действием химических агентов и диеты. Вестник ТвГУ. Серия: Химия. 2015;2:141-152. Доступный з: <http://eprints.tversu.ru/5385/>.
4. Мархонь НО, Мамчур ВЙ, Жилюк ВІ, Левих АЕ. Порівняльний аналіз експериментальних підходів у відтворенні метаболічного синдрому. Вісник проблем біології і медицини. 2015;1:156-62. Доступний з: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2015_1_33.
5. Натрус Л. Осадчук Ю, Лабудзинський Д, Чайковський Ю, Смирнов А. Патогенетичне обґрунтування шляхів моделювання експериментального цукрового діабету 2 типу. Медична наука України. 2019;15(3-4):10-8. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2019.02>.
6. Натрус ЛВ, Брюзгіна ТС, Петренко ОВ, Таварткіладзе К, Осадчук ЮС винахідник. Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України власник. Спосіб оцінки ліпідних порушень у хворих на діабетичну ретинопатію при дослідженні клітин крові Патент 125191 UA, МПК G01N 33/49 (2006.01) B01D15/08 (2006.01). 2018 Квіт 25.
7. Натрус ЛВ, Рижко ІМ, Черновол ПА, Брюзгіна ТС. винахідник. Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України власник. Спосіб оцінки механізмів ушкодження тканин при

- експериментальному цукровому діабеті 1-го типу у щурів. Патент 125810 UA, МПК G01N 33/49 (2006.01) B01D15/08 (2006.01). 2018 Берз 12.
8. Осадчук Ю, Чайковський Ю, Натрус Л, Брюзгина Т. Особливості зміни жирнокислотного складу тканин при різних моделях експериментального цукрового діабету 1 типу. Медична наука України. 2018;14(3-4):13-22. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2018.02>.
 9. Спасов АА, Бабков ДА, Мулеева ДР, Майка ОЮ. Моделирование сахарного диабета типа 2 у крыс на высокожировой диете с индукцией стрептозотоцином. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2017;1(61):30-2. Доступний з: <https://cyberleninka.ru/article/n/modelirovanie-saharnogo-diabeta-tipa-2-u-krysa-na-vysokozhirovoy-diete-s-induksiey-streptozototsinom>.
 10. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. с. 528.
 11. Творогова МГ, Яськова КН, Мычка ВБ, Чазова ИЕ. Инсулинорезистентность и методы ее диагностики. [Интернет]. Лабораторная медицина №6; 2003; [цитовано 1 липня 2019 року]. Доступний з: <http://www.ramld.ru/articles/article.php?id=20>.
 12. Agusti A, Garcia-Pardo MP, Lopez-Almela I, et al. Interplay between the gut-brain axis, obesity and cognitive function. *Front Neurosci*. 2018;12:155. doi: 10.3389/fnins.2018.00155.
 13. Al-Lahham S, Roelofsen H, Rezaee F, Weening D, Hoek A, Vonk R, et al. Propionic acid affects immune status and metabolism in adipose tissue from overweight subjects. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(4):357-64. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02590.x .
 14. Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*. 2019;568:499–504. doi: 10.1038/s41586-019-0965-1.

15. Al-Zubairi T, Al-Habori M, Saif-Ali R. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and its metabolic characteristics among Yemeni type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2021;14:4223-32. doi: 10.2147/DMSO.S332416.
16. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2001;276(15):11615-23. doi: 10.1074/jbc.M010810200.
17. Atshaves BP, G Martin G, Hostetler HA, et al. Liver fatty acid binding protein and obesity. *J Nutr Biochem.* 2010;21(11):1015–32. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.01.005.
18. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 2010;3(9-10):525–34. doi:10.1242/dmm.006239.
19. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:767–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-095555>.
20. Bauer PV, Hamr SC, Duca FA. Regulation of energy balance by a gut–brain axis and involvement of the gut microbiota. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:737–55. doi: 10.1007/s00018-015-2083-z.
21. Bhusal A, Rahman MH, Suk K. Hypothalamic inflammation in metabolic disorders and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2021;79(1):32. doi: 10.1007/s00018-021-04019-x.
22. Bliss ES, Whiteside E. The gut-brain Axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity. *Front Physiol.* 2018;9:900. doi: 10.3389/fphys.2018.00900.
23. Boden G, Laakso M. Lipids and glucose in type 2 diabetes. What is the cause and effect? *Diabetes Care.* 2004;27(9):2253-9. doi: 10.2337/diacare.27.9.2253.

24. Boscaini S, Leigh SJ, Lavelle A, Garcia-Cabrero R, Lipuma T, Clarke G, et al. Microbiota and body weight control: Weight watchers within? *Mol Metab.* 2022;57:101427. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101427.
25. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a013201. doi: 10.1101/cshperspect.a013201.
26. Bravo R, et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(1):16-20. doi: 10.1016/j.biocel.2011.10.012.
27. Bykhovets MY, Rykov SO, Natrus LV. Features of the lifestyle as a factor of the risk of development and progression of diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus of 2 types. *Arkhiv oftal'molohiyi Ukrayiny.* 2019;7(1):54-61. doi: <http://dx.doi.org/10.22141/2309-8147.7.1.2019.163000>.
28. Cai D, Khor S. Hypothalamic microinflammation paradigm in aging and metabolic diseases. *Cell Metab.* 2019;30(1):19-35. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.021.
29. Cai D, Khor S. Hypothalamic microinflammation. *Handb Clin Neurol.* 2021;181:311-22. doi: 10.1016/B978-0-12-820683-6.00023-3.
30. Cakir I, Nillni EA. Endoplasmic reticulum stress, the hypothalamus, and energy balance. *Trends Endocrinol Metab.* 2019;30(3):163-76. doi: 10.1016/j.tem.2019.01.002.
31. Camargo A, Meneses ME, Pérez-Martínez P, et al. Dietary fat modifies lipid metabolism in the adipose tissue of metabolic syndrome patients. *Genes Nutr.* 2014;9(4):409. doi: 10.1007/s12263-014-0409-3.
32. Canabal DD, Song Z, Potian JG, Beuve A, McArdle JJ, et al. Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(4):R1418-28. doi: 10.1152/ajpregu.00216.2006.

33. Cansell C, Stobbe K, Sanchez C, Le Thuc O, Mosser, CA, Ben-Fradj S, et al. Dietary fat exacerbates postprandial hypothalamic inflammation involving glial fibrillary acidic protein-positive cells and microglia in male mice. *Glia*. 2020;69(9):1–19.
34. Cardoso CRL, Leite NC, Moram CBM, Salles GF. Long-term visit-to-visit glycemic variability as predictor of micro- and macrovascular complications in patients with type 2 diabetes: *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):33. doi: 10.1186/s12933-018-0677-0.
35. Carmo-Silva S, Cavadas C. Hypothalamic dysfunction in obesity and metabolic disorders. *Adv Neurobiol*. 2017;19:73-116. doi: 10.1007/978-3-319-63260-5_4.
36. Caroline A, Guzman-Quevedo O, Charlotte R, Rémus-Borel J, Samantha C, Castellanos-Jankiewicz A, et al. Inhibiting microglia expansion prevents diet-induced hypothalamic and peripheral inflammation. *Diabetes*. 2017;66(4):908-19. doi.org/10.2337/db16-0586.
37. Carraro RS, Souza GF, Solon C, Razolli DS, Chausse B, Barbizan R, et al. Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;460:238-45.
38. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;6(9):943–57. doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.019.
39. Chen J, Bassot A, Giuliani F, Simmen T. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): stressed by dysfunctional mitochondria-endoplasmic reticulum contacts (MERCs). *Cells*. 2021;10(7):1789. doi: 10.3390/cells10071789.
40. Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol*. 2010;190(4):533-9. doi: 10.1083/jcb.201002108.

41. Choromanska B, Mysliwiec P, Dadan J, Hady HR, Chabowski A. The clinical significance of fatty acid binding proteins. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011;65:759-63. doi: 10.5604/17322693.966983.
42. Corazzari M, Gagliardi M, Fimia, GM, Piacentini M. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate. *Front Oncol*. 2017;7:78. doi:10.3389/fonc.2017.00078.
43. Cragle FK, Baldini G. Mild lipid stress induces profound loss of MC4R protein abundance and function. *Mol Endocrinol*. 2014;28(3):357–67. doi: 10.1210/me.2013-1357.
44. Crispino M, Trinchese G, Penna E, Cimmino F, Catapano A, Villano I, et al. Interplay between peripheral and central inflammation in obesity-promoted disorders: the impact on synaptic mitochondrial functions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):5964. doi: 10.3390/ijms21175964.
45. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain Axis. *Physiol Rev*. 2019;99(4):1877–2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018.
46. Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, Han DY, Wellhauser L, Liu Y, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41:149–58.
47. Dhore-Patil A, Thannoun T, Samson R, Le Jemtel TH. Diabetes mellitus and heart failure with preserved ejection fraction: role of obesity. *Front Physiol*. 2022;12:785879. doi: 10.3389/fphys.2021.785879.
48. Docrat TF, Nagiah S, Naicker N, Baijnath S, Singh S, Chaturgoon AA. The protective effect of metformin on mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in diabetic mice brain. *Eur J Pharmacol*. 2020;875:173059. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173059.
49. Dragano NR, Haddad-Tovolli R, Velloso LA. Leptin, neuroinflammation and obesity. *Front Horm Res*. 2017;48:84–96. doi: 10.1159/000452908.

50. Du S, Zheng H. Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. *Cell Biosci.* 2021;11(1):188. doi: 10.1186/s13578-021-00700-7.
51. El-Ansary AK, Ben Bacha A, Kotb M. Etiology of autistic features: the persisting neurotoxic effects of propionic acid. *J Neuroinflammation.* 2012;9:74. doi.org/10.1186/1742-2094-9-74.
52. Frye R, Rose S, Chacko J. et al. Modulation of mitochondrial function by the microbiome metabolite propionic acid in autism and control cell lines. *Transl Psychiatry.* 2016;6:1-10. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.189>.
53. Gallagher CM, Garri C, Cain EL, Ang KK, et al. Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6 α branch. *eLife.* 2016;5:5.
54. Gebrie D, Manyazewal T, A Ejigu D, Makonnen E. Metformin-insulin versus metformin-sulfonylurea combination therapies in type 2 diabetes: a comparative study of glycemic control and risk of cardiovascular diseases in addis ababa, ethiopia. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2021;14:3345-59. doi: 10.2147/DMSO.S312997.
55. Ghemrawi R, Khair M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6127. doi: 10.3390/ijms21176127.
56. Gomez-Apo E, Mondragon-Maya A, Ferrari-Diaz M, Silva-Pereyra J. Structural brain changes associated with overweight and obesity. *J Obes.* 2021;6613385. doi: 10.1155/2021/6613385.
57. Gong J, Wang XZ, Wang T, Chen JJ, Xie XY, Hu H, et al. Molecular signal networks and regulating mechanisms of the unfolded protein response. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2017;18(1):1-14. doi: 10.1631/jzus.B1600043.
58. Goswami C, Iwasaki Y, Yada T. Short-chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons. *J Nutr Biochem.* 2018;57:130–5. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.009.

59. Gupta S, You P, SenGupta T, Nilsen H, Sharma K. Crosstalk between different DNA repair pathways contributes to neurodegenerative diseases. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):163. doi: 10.3390/biology10020163.
60. Haase S, Haghikia A, Gold R, Linker RA. Dietary fatty acids and susceptibility to multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(1):12-6. doi:10.1177/1352458517737372.
61. Haddad-Tovoli, R, Dragano NRV, Ramalho AFS, Velloso LA. Development and function of the blood-brain barrier in the context of metabolic control. *Front Neurosci*. 2017;11:224. doi: 10.3389/fnins.2017.00224.
62. Hahm JR, Jo MH, Ullah R, Kim MW, Kim MO. Metabolic stress alters antioxidant systems, suppresses the adiponectin receptor 1 and induces A'zheimer's like pathology in mice brain. *Cells*. 2020;9(1):249. doi: 10.3390/cells9010249.
63. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. PERK is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000;5(5):897-904. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80330-5.
64. Haruwaka, K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun*. 2019, 10(1):5816. doi: 10.1038/s41467-019-13812-z.
65. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Cambridge: Cambridge University Press. 2000; p.543-8.
66. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3787-99. doi: 10.1091/mbc.10.11.3787.
67. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009;43:67-93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.

68. Heimann E, Nyman M, Degerman E. Propionic acid and butyric acid inhibit lipolysis and de novo lipogenesis and increase insulin-stimulated glucose uptake in primary rat adipocytes. *Adipocyte*. 2014;4(2):81-8. doi:10.4161/21623945.2014.960694.
69. Hetz C, Papa FR. The Unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell*. 2018;69(2):169-81. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
70. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:121-30. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004.
71. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas: 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2019. Available from: <https://diabetesatlas.org/en/resources/>. Accessed July 12, 2021.
72. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, et al. Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients*. 2019;11(11):2704.
73. Jeng PS, Inoue-Yamauchi A, Hsieh JJ, Cheng EH. BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis. *Curr Opin Physiol*. 2018;3:71-81. doi: 10.1016/j.cophys.2018.03.005.
74. Josephine LR, Nicole AM, Paul G. Weightman P, Hannah ES, Craig B, et al. Ellacott, immunometabolic changes in glia – a potential role in the pathophysiology of obesity and diabetes. *Neuroscience*. 2020;447:167-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.021.
75. Joshua P. Thaler, Matthias H. Tschöp, Michael W. Schwartz Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans [Article] // *J Clin Invest*. 2012;122(1):153-162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>.
76. Jung CH, Kim MS. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res*. 2013;36(2):201-7. doi: 10.1007/s12272-013-0020-y.
77. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome

- membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.
78. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):571-80. doi: 10.1038/cdd.2010.191.
79. Kaushik S, Rodriguez-Navarro JA, Arias E, Kiffin R, Sahu S, Schwartz GJ, et al. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab.* 2011 3;14(2):173-83. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.008.
80. Kazakov VN, Natrus LV. Modulation of neuronal impulse activity of the anterior hypothalamus as a functional basis of the mechanisms underlying hypothalamic control. *Neurophysiology.* 2005;37:407–17. <https://doi.org/10.1007/s11062-006-0018-x>.
81. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015;282:4067–79. doi: 10.1111/febs.13412.
82. Khawar MB, Gao H, Li W. Autophagy and lipid metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:359-74. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_17.
83. Kittelmann M. 3D Electron Microscopy of the ER. *Methods Mol Biol.* 2018;1691:15-21. doi: 10.1007/978-1-4939-7389-7_2.
84. Klöckener, T, Hess S, Belgardt BF, Paeger L, Verhagen, LAW, Husch A, et al. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat Neurosci.* 2011;14(7):911-8. doi: 10.1038/nn.2847.
85. Koehrer P, Saab S, Berdeaux O, Isaïco R, Gregoire S, et al. Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy. *PloS one.* 2014;9(9):e106912. doi: 10.1371/journal.pone.0106912.
86. Kong FJ, Ma LL, Guo JJ, Xu LH, Li Y, Qu S. Endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in diabetes-induced neuronal apoptosis

- and cognitive decline in mice. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(1):111-25. doi: 10.1042/CS20171432.
87. Kottaisamy C, Raj DS, Prasanth KV, Sankaran U. Experimental animal models for diabetes and its related complications-a review. *Lab Anim Res*. 2021;37(1):23. doi: 10.1186/s42826-021-00101-4.
88. Kouvari M, D'Cunha NM, Travica N, Sergi D, Zec M, Marx W, et al. Metabolic syndrome, cognitive impairment and the role of diet: a narrative review. *Nutrients*. 2022;14(2):333. doi: 10.3390/nu14020333.
89. Kreutzer C, Peters S, Schulte DM, Fangmann D, Türk K, Wolff S, et al. Hypothalamic inflammation in human obesity is mediated by environmental and genetic factors. *Diabetes*. 2017;66:2407–15.
90. Lackey DE, Lazaro RG, Li P, Johnson A, Hernandez-Carretero A, Weber N, et al. The role of dietary fat in obesity-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(6):E989-E97. doi: 10.1152/ajpendo.00323.2016.
91. Lee CH, Kim HJ, Lee YS, Kang GM, Lim HS, Lee, S.H. et al. Hypothalamic macrophage inducible nitric oxide synthase mediates obesity-associated hypothalamic inflammation. *Cell Rep*. 2018;25(4):934-46. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.070.
92. Lee CH, Shin SH, Kang GM, Kim S, Kim J, Yu R, et al. Cellular source of hypothalamic macrophage accumulation in diet-induced obesity. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):221. doi: 10.1186/s12974-019-1607-0.
93. Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, Bartelt A. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Mol Metab*. 2021;47:101169. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101169.
94. Liu C, Gao KC, Zhao H, Zhou Z, Shen Z, Guo Y, et al. Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(4):534-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.148.

95. Liu J, Yang X, Yu S, et al. The leptin resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1090:145-63. doi: 10.1007/978-981-13-1286-1_8.
96. Liu Y, Li M, Zhang Z, Ye Y, Zhou J. Role of microglia-neuron interactions in diabetic encephalopathy. *Ageing Res Rev.* 2018;42:28-39. doi: 10.1016/j.arr.2017.12.005.
97. Liu Z, Patil I, Sancheti H, Yin F, Cadenas E. Effects of lipoic acid on high-fat diet-induced alteration of synaptic plasticity and brain glucose metabolism: a PET/CT and ¹³C-NMR study. *Sci Rep.* 2017;7(1):5391. doi: 10.1038/s41598-017-05217-z.
98. Liu Z, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, et al. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One.* 2015;10(5):e0128274. doi: 10.1371/journal.pone.0128274.
99. Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, Dong X, Wei J, Qiu C, et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:158. doi: 10.1186/1475-2840-12-158.
100. Lopez M, Rios-Silva M, Huerta M. Effects of *Moringa oleifera* leaf powder on metabolic syndrome induced in male Wistar rats: a preliminary study. *J Int Med Res.* 2018;46(8):3327–36. doi:10.1177/0300060518781726.
101. Lugovaya AV, Emanuel VS, Kalinina NM, Ivanov AM, Artemova AV. Apoptosis and autophagy in the pathogenesis of acute ischemic stroke (review of literature). *Klin Lab Diagn.* 2020;65(7):428-34. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-7-428-434.
102. MacFabe DF. Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:28177. doi:10.3402/mehd.v26.28177.

103. MacFabe, DF. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Health Dis.* 2012;24:23. doi: 10.3402/mehd.v23i0.19260.
104. Maddaloni E, Coleman RL, Agbaje O, Buzzetti R, Holman RR. Time-varying risk of microvascular complications in latent autoimmune diabetes of adulthood compared with type 2 diabetes in adults: a post-hoc analysis of the UK Prospective Diabetes Study 30-year follow-up data (UKPDS 86). *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(3):206-15. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30003-6.
105. Mahmood K, Naeem M, Rahimnajjad NA. Metformin: the hidden chronicles of a magic drug. *Eur J Intern Med.* 2013;24(1):20–6. doi: 10.1016/j.ejim.2012.10.011.
106. Maly DJ, Papa FR. Druggable sensors of the unfolded protein response. *Nat Chem Biol.* 2014;10: 892-901. doi: 10.1038/nchembio.1664.
107. Mao J, Hu Y, Ruan L, Ji Y, Lou Z. Role of endoplasmic reticulum stress in depression (Review). *Mol Med Rep.* 2019;20(6):4774-80. doi: 10.3892/mmr.2019.10789.
108. Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Szydłowska A, Skupień A, Mikiciuk-Olasik E, Huttunen KM. Metformin - a future therapy for neurodegenerative diseases: theme: drug discovery, development and delivery in Alzheimer's disease guest editor: davide brambilla. *Pharm Res.* 2017;34(12):2614-27. doi: 10.1007/s11095-017-2199-y.
109. Martinez de Morentin PB, Varela L, Ferno J, et al. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):350-61. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.09.016.
110. Maruthur NM, Tseng E, Hutfless S, Wilson LM, Suarez-Cuervo C, Berger Z, et al. Diabetes medications as monotherapy or metformin-based combination therapy for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2016;164(11):740-51. doi: 10.7326/M15-2650.

111. Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 2010;151(2):576-85. doi: 10.1210/en.2009-1122.
112. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018;36(1):14-20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
113. McIntosha AL, Barbara P, Martina AGG. Effect of liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene ablation on lipid metabolism in high glucose diet (HGD) pair-fed mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(7):985-1004. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.03.009.
114. McKnight, NC, Zhong Y, Wold MS, Gong S, Phillips GR, Dou Z, et al. Beclin 1 is required for neuron viability and regulates endosome pathways via the UVRAG-VPS34 complex. *PLoS genetics*. 2014;10(10):e1004626. doi: 10.1371/journal.pgen.1004626.
115. Mcmanus CM, Michel KE, Simon DM, Washabau RJ. Effect of short-chain fatty acids on contraction of smooth muscle in the canine colon. *Am J Vet Res*. 2002;63(2):295-300. doi: 10.2460/ajvr.2002.63.295.
116. Mendes NF, Jara CP, Zanesco AM, de Araújo EP. Hypothalamic microglial heterogeneity and signature under high fat diet-induced inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2256. <https://doi.org/10.3390/ijms22052256>.
117. Merino J, Guasch-Ferré M, Ellervik C, et al. Quality of dietary fat and genetic risk of type 2 diabetes: individual participant data meta-analysis. *BMJ*. 2019;366:l4292. doi: 10.1136/bmj.l4292.
118. Moraes, JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli, J.R, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2009;4(4):e5045. doi: 10.1371/journal.pone.0005045.

119. Morton GJ. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol.* 2007;583(Pt 2):437-43. doi: 10.1113/jphysiol.2007.135590.
120. Mst Mamuna S, Moeko M, Hayashi S, Wataru A, Shotaro S, Shinichi Y. Effects of fatty acids on inducing endoplasmic reticulum stress in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 2020;103(9):8643-54. doi: 10.3168/jds.2019-18080.
121. National Mouse Metabolic Phenotyping Centers (MMPC) [Internet]. 2017. Available from: <https://www.mmpc.org/shared/document.aspx?id=272&docType=Protocol>.
122. Natrus LV, Gayova LV, Byhovets MYu, Osadchuk YuS, Konovalov SE. The value of regulatory effects on lipid metabolism in during complicated diabetes mellitus. *Fiziologichnyi zhurnal.* 2020;66(1):25-34. doi.org/10.15407/fz66.01.025.
123. Natrus LV. Changes in activity of the hypothalamic neurons in response to physiological fluctuations of the homeostasis constants *Fiziologicheskii zhurnal.* 2006;52(3):57-63.
124. Natrus LV. Modulation of spiking of neurons of the cat anterior hypothalamus induced by experimental shifts in the osmolarity of the blood plasma. *Neurophysiology.* 2006;38(1):40–5.
125. Naughton M, McMahon J, Healy S, FitzGerald U. Profile of the unfolded protein response in rat cerebellar cortical development. *J Comp Neurol.* 2019;527(17):2910-24. doi: 10.1002/cne.24718.
126. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:173-94. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
127. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* 2013;19(12):1584-96. doi: 10.1038/nm.3407.

128. Oussaada SM, van Galen KA, Coومان MI, et al. The pathogenesis of obesity. *Metabolism*. 2019;92:26–36. doi: 10.1016/j.metabol.2018.12.012.
129. Palmer SC, Mavridis D, Nicolucci A, Johnson DW, Tonelli M, Craig JC, et al. Comparison of clinical outcomes and adverse events associated with glucose-lowering drugs in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *JAMA*. 2016;316(3):313-24. doi: 10.1001/jama.2016.9400.
130. Pandey VK, Mathur A, Kakkar P. Emerging role of Unfolded Protein Response (UPR) mediated proteotoxic apoptosis in diabetes. *Life Sci*. 2019;216:246-58. doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.041.
131. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*. 2015;64(1):24-34. doi: 10.1016/j.metabol.2014.08.004.
132. Park K, Lee MS. Current status of autophagy enhancers in metabolic disorders and other diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:811701. doi: 10.3389/fcell.2022.811701.
133. Park S, Aintablian A, Coupe B, Bouret SG. The endoplasmic reticulum stress-autophagy pathway controls hypothalamic development and energy balance regulation in leptin-deficient neonates. *Nat Commun*. 2020;11(1):1914. doi: 10.1038/s41467-020-15624-y.
134. Paul S, Saha D, Bk B. Mitochondrial dysfunction and mitophagy closely cooperate in neurological deficits associated with Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Mol Neurobiol*. 2021;58(8):3677-91. doi: 10.1007/s12035-021-02365-2.
135. Pekny M, Pekna M. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(3):483-91. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.014.
136. Pincus D, Chevalier MW, Aragón T, van Anken E, Vidal SE, El-Samad H, et al. BiP binding to the ER-stress sensor IRE1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol*. 2010;8(7):e1000415. doi: 10.1371/journal.pbio.1000415.

137. Qingyuan M, Dongsheng C. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(37):32324-32. doi: 10.1074/jbc.M111.254417.
138. Ramírez S, Claret M. Hypothalamic ER stress: a bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett.* 2015;589(14):1678-87. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.025.
139. Reginato A, Veras ACC, Baqueiro MDN, Panzarin C, Siqueira BP, Milanski M, et al. The role of fatty acids in ceramide pathways and their influence on hypothalamic regulation of energy balance: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10):5357. doi: 10.3390/ijms22105357.
140. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol.* 2014;204(6):869-79. doi: 10.1083/jcb.201312042.
141. Ruud J, Steculorum SM, Brüning JC. Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nat Commun.* 2017;8:15259. doi: 10.1038/ncomms15259.
142. Saito A, Imaizumi K. The broad spectrum of signaling pathways regulated by unfolded protein response in neuronal homeostasis. *Neurochem Int.* 2018;119:26-34. doi: 10.1016/j.neuint.2017.06.012.
143. Saito A, Imaizumi K. Unfolded protein response-dependent communication and contact among endoplasmic reticulum, mitochondria, and plasma membrane. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3215. doi: 10.3390/ijms19103215.
144. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell.* 2016;167:1469–80.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.018.

145. Schneeberger M, Gomis R, Claret M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol.* 2014;220(2):T25-46. doi: 10.1530/JOE-13-0398.
146. Sergi D, Williams LM. Potential relationship between dietary long-chain saturated fatty acids and hypothalamic dysfunction in obesity. *Nutr Rev.* 2020;78(4):261-77. doi: 10.1093/nutrit/nuz056.
147. Sharma RB, Snyder JT, Alonso LC. ATF6A impacts cell number by influencing survival, death and proliferation. *Mol Metab.* 2019;27S(Suppl):S69-80. doi: 10.1016/j.molmet.2019.06.005.
148. Shin DW. Lipophagy: molecular mechanisms and implications in metabolic disorders. *Mol Cells.* 2020;43(8):686-93. doi: 10.14348/molcells.2020.0046.
149. Shruthi K, Reddy SS, Chitra PS, Reddy GB. Ubiquitin-proteasome system and ER stress in the brain of diabetic rats. *J Cell Biochem.* 2019;120(4):5962-73. doi: 10.1002/jcb.27884.
150. Simmen T, Herrera-Cruz MS. Plastic mitochondria-endoplasmic reticulum (ER) contacts use chaperones and tethers to mould their structure and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;53:61-9. doi: 10.1016/j.ceb.2018.04.014.
151. Su J, Zhou L, Kong X, Yang X, Xiang X, Zhang Y, et al. Endoplasmic reticulum is at the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in the pathogenesis of diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2013;2013:193461. doi: 10.1155/2013/193461.
152. Sundaram A, Appathurai S, Plumb R, Mariappan M. Dynamic changes in complexes of IRE1 α , PERK, and ATF6 α during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 2018;29(11):1376-88. doi: 10.1091/mbc.E17-10-0594.
153. Szalanczy AM, Key CC, Solberg Woods LC. Genetic variation in satiety signaling and hypothalamic inflammation: merging fields for the study of obesity. *J Nutr Biochem.* 2022;101:108928. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108928.

154. Szymański J, Janikiewicz J, Michalska B, Patalas-Krawczyk P, Perrone M, Ziółkowski W, et al. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1576. doi: 10.3390/ijms18071576.
155. Talebi M, Mohammadi Vadoud SA, Haratian A, Talebi M, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, et al. The interplay between oxidative stress and autophagy: focus on the development of neurological diseases. *Behav Brain Funct.* 2022;18(1):3. doi: 10.1186/s12993-022-00187-3.
156. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012;122(1):153-62. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>.
157. Thomas SE, Dalton LE, Daly ML, Malzer E, Marciniak SJ. Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26(8):611-21. doi: 10.1002/dmrr.1132.
158. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(10):747-56. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30147-4.
159. Tsuboi M, Hirabayashi Y. New insights into the regulation of synaptic transmission and plasticity by the endoplasmic reticulum and its membrane contacts. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2021;97(10):559-72. doi: 10.2183/pjab.97.028.
160. Turk M, Tatli O, Alkan HF, Ozfiliz Kilbas P, Alkurt G, Dinler Doganay G. Co-chaperone Bag-1 plays a role in the autophagy-dependent cell survival through Beclin 1 interaction. *Molecules.* 2021;26(4):854. doi: 10.3390/molecules26040854.
161. Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3507-17. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.

162. Valdearcos M, Douglass JD, Robblee MM, Dorfman MD, Stifler DR, Bennett ML, et al. Microglial inflammatory signaling orchestrates the hypothalamic immune response to dietary excess and mediates obesity susceptibility. *Cell Metab.* 2017;26(1):185-97.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.015.
163. Vieira IH, Barros LM, Baptista CF, Rodrigues DM, Paiva IM. Recommendations for practical use of metformin, a central pharmacological therapy in type 2 diabetes. *Clin Diabetes.* 2022;40(1):97-107. doi: 10.2337/cd21-0043.
164. Vieira R, Souto SB, Sánchez-López E, Machado AL, Severino P, Jose S, et al. Sugar-lowering drugs for type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome-strategies for in vivo administration: part-II. *J Clin Med.* 2019;8(9):1332. doi: 10.3390/jcm8091332.
165. Vujkovic-Cvijin I, Sklar J, Jiang L, Natarajan L, Knight R, Belkaid Y. Host variables confound gut microbiota studies of human disease. *Nature.* 2020;587:448–54. doi: 10.1038/s41586-020-2881-9.
166. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-6. doi: 10.1126/science.1209038.
167. Wang GQ, Bonkovsky HL, de Lemos A, Burczynski FJ. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res.* 2015;56(12):2238-47. doi: 10.1194/jlr.R056705.
168. Wang L, Xu XB, You WW, Lin XX, Li CT, Qian HR, et al. The cytoplasmic nuclear shuttling of Beclin 1 in neurons with Alzheimer's disease-like injury. *Neurosci Lett.* 2017;661:63-70. doi: 10.1016/j.neulet.2017.09.055.
169. Wang Z, Huang Y, Cheng Y, Tan Y, Wu F, Wu J, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced neuronal inflammatory response and apoptosis likely plays a key role in the development of diabetic encephalopathy. *Oncotarget.* 2016;7(48):78455-72. doi: 10.18632/oncotarget.12925.

170. Williams R, Karuranga S, Malanda B, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108072. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108072.
171. Wu Y, Whiteus C, Xu CS, Hayworth KJ, Weinberg RJ, Hess HF, et al. Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(24):E4859-67. doi: 10.1073/pnas.1701078114.
172. Xie Y, Li J, Kang R, Tang D. Interplay between lipid metabolism and autophagy. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:431. doi: 10.3389/fcell.2020.00431.
173. Xu F, Fang Y, Yan L, Xu L, Zhang S, Cao Y, et al. Nuclear localization of Beclin 1 promotes radiation-induced DNA damage repair independent of autophagy. *Sci Rep.* 2017;7:45385. doi: 10.1038/srep45385.
174. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell.* 2007;13(3):365-76. doi: 10.1016/j.devcel.2007.07.018.
175. Ye Z, Liu G, Guo J, Su Z. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesity-induced leptin resistance. *Obes Rev.* 2018;19(6):770-85. doi: 10.1111/obr.12673.
176. Yilmaz E. Endoplasmic reticulum stress and obesity. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:261-76. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_11.
177. Zhang L, Yan F, Li L, Fu H, Song D, Wu D, Wang X. New focuses on roles of communications between endoplasmic reticulum and mitochondria in identification of biomarkers and targets. *Clin Transl Med.* 2021;11(11):e626. doi: 10.1002/ctm2.626.
178. Zhang S, Peng X, Yang S, Li X, Huang M, Wei S, et al. The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. *Cell Death Dis.* 2022;13(2):132. doi: 10.1038/s41419-022-04593-3.

179. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.043.
180. Zhou C, Teegala SB, Khan BA, Gonzalez C, Routh VH. Hypoglycemia: role of hypothalamic glucose-inhibited (GI) neurons in detection and correction. *Front Physiol*. 2018;9:192. doi: 10.3389/fphys.2018.00192.
181. Zucker B, Kozlov MM. Mechanism of shaping membrane nanostructures of endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(1):e2116142119. doi: 10.1073/pnas.2116142119.