



Д. Р. ШЕПІЛОВ¹, Т. М. КОВАЛЕНКО¹, І. О. ОСАДЧЕНКО¹,
Н. МАРУНГРУАНГ², А. ЧОПЕК², Ф. ХОЛЕНІУС²,
О. ПРИХОДЬКО², Г. Г. СКИБО¹

¹Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ

²Лундський університет, Швеція

Вплив ягід брусниці на стан вуглеводного метаболізму, структуру гіпокампа та когнітивну функцію у мишей, нокаутних за геном аполіпопротеїну E

Мета — оцінити кількісні зміни показників вуглеводного метаболізму, пов'язаних із нервовою функцією (рівня глюкози і активності α -амілази в крові), охарактеризувати структуру зони СА1 гіпокампа та когнітивну здатність у мишей, нокаутних за геном аполіпопротеїну E (ApoE^{-/-}), при додаванні цілих ягід брусниці та нерозчинної фракції ягід до високожирового (ВЖ) раціону.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 8-тижневих самцях мишей ApoE^{-/-}, яких розділили на чотири групи по 10 тварин залежно від складу дієти: НЖ-контроль — низькожировий (НЖ) раціон (12% ккал жиру); ВЖ-контроль — високожирова (ВЖ) дієта (38% ккал жиру); ЦЯ — тварини, яких годували ВЖ-дієтою із додаванням цілих ягід брусниці; НФЯ — тварини, котрі отримували нерозчинну фракцію ягід брусниці у складі ВЖ-раціону. Період експериментального годування становив 8 тиж. Протягом останнього тижня дослідження проводили тест у Т-лабіринті на просторову робочу пам'ять, а також пероральний глюкозотолерантний тест. По завершенні експерименту визначали активність α -амілази в сироватці крові та вивчали гістологічну структуру гіпокампа.

Результати. Застосування цілих ягід брусниці та їх нерозчинної фракції пришвидшувало виведення надлишкової глюкози з крові, про що свідчило зменшення площі під глікемічною кривою протягом перорального глюкозотолерантного тесту на 9,2—19,0% порівняно з НЖ-контролем і ВЖ-контролем. Тварини групи НФЯ демонстрували значуще збільшення активності α -амілази в сироватці крові: на 12,5% порівняно з НЖ-контролем і на 12,3% порівняно з ВЖ-контролем. В групі НЖ-контролю тварини мали порушену структуру пірамідного шару в зоні СА1 гіпокампа та знижену щільність неушкоджених пірамідних нейронів порівняно з іншими групами. Споживання ягід брусниці не спричиняло суттєвих змін структури пірамідного шару зони СА1 гіпокампа мишей ApoE^{-/-}, на відміну від ВЖ-дієти. У групах ЦЯ та НФЯ відзначено збільшення площі перерізу ядер пірамідних нейронів, що, ймовірно, свідчить про підвищення функціональної активності цих клітин. Під час поведінкового тестування всі миші ApoE^{-/-} мали високий показник чергування у Т-лабіринті (76,7—93,3%). Лише у тварин НЖ-контролю виявлено тенденцію до когнітивного зниження порівняно з групами ВЖ і ЦЯ.

Висновки. Установлено, що цілі ягоди брусниці та їх нерозчинна фракція поліпшують вуглеводний метаболізм у мишей ApoE^{-/-}, що може позитивно впливати на структурно-функціональний стан мозкової тканини шляхом зміни інсулінової сигналізації. Ягоди брусниці в складі досліджуваних дієт здатні посилити функціональну активність у пірамідних клітинах зони СА1 гіпокампа. Поведінковий тест не виявив значущих когнітивних порушень, що, ймовірно, пов'язано з молодим віком тварин.

Ключові слова: гіпокамп, брусниця, низько- та високожирова дієта, глюкоза, амілаза, пірамідні нейрони, просторова пам'ять.

Останнім часом збільшується кількість доказів того, що порушення ліпідного обміну може спричинити хронічне системне запалення,

інсулінорезистентність, метаболічні та структурні зміни в мозку і когнітивний дефіцит [3, 18]. Моделлю, яку часто використовують для вивчення наслідків ліпідного дисбалансу в організмі, є трансгенна лінія мишей, нокаутних за геном аполіпопротеїну E (ApoE^{-/-}) [9].

© Д. Р. Шепілов, Т. М. Коваленко, І. О. Осадченко, Н. Марунгруанг, А. Чопек, Ф. Холеніус, О. Приходько, Г. Г. Скибо, 2020

Аполіпопротеїн Е — це білок, який транспортує холестерол у складі ліпопротеїнів і хіломікронів (переважно в печінці та головному мозку), відіграючи важливу роль у трофічних та регенеративних процесах в організмі [8]. У мишей ApoE^{-/-} розвиваються гіперхолестеролемія, атеросклеротичні ураження, ожиріння та системне запалення, особливо у разі високожирового (ВЖ) раціону [15]. У пірамідних нейронах гіпокампа мишей ApoE^{-/-}, яких тримали на ВЖ-дієті, зафіксували гіперхроматоз, каріопікноз і активацію проапоптичних білків [23]. Однак наше попереднє дослідження виявило, що ВЖ-дієта не завжди є шкідливою для тварин цієї лінії. Порівняно з тваринами з низькожировим (НЖ) раціоном миші ApoE^{-/-} на ВЖ-дієті, збагаченій жирами тваринного походження, мали більшу кількість інтактних пірамідних нейронів, а також менший ступінь гліальної активації у зоні CA1 гіпокампа [1].

Важливою ланкою, котра пов'язує дисліпідемію в системному кровотоці зі структурно-функціональними розладами нервової системи, може бути інсулінорезистентність. Одним із її головних маркерів є гіперглікемія, яку часто спостерігають у тварин із порушенням ліпідного обміну [10]. Гіперглікемія корелює зі зниженням синаптичної пластичності, цілісності мозкових судин та когнітивною дисфункцією у мишей [14]. Своєю чергою інсулін регулює експресію низки панкреатичних ферментів, зокрема α -амілази, активність якої може змінюватися залежно від активації інсулінових рецепторів на поверхні гландулоцитів, будучи маркером інсулінового гомеостазу [13].

Раніше нами показано, що ягоди брусниці (*Vaccinium vitis-idaea*) завдяки біоактивним компонентам — харчовим волокнам і поліфенолам здатні зменшувати масу тіла, нормалізувати ліпідний обмін, змінювати експресію генів синтезу жирних кислот і композицію кишкової мікробіоти у 16-тижневих мишей ApoE^{-/-} на тлі ВЖ-дієти [11, 12]. Однак не відомо, чи впливає споживання брусниці на стан вуглеводного обміну у зазначених тварин і чи пов'язано це зі зміною структури мозкової тканини та поведінки.

Мета роботи — оцінити кількісні зміни показників вуглеводного метаболізму, пов'язаних із нервовою функцією (рівня глюкози та активності α -амілази в крові), охарактеризувати структуру зони CA1 гіпокампа і когнітивну здатність у мишей ApoE^{-/-} при додаванні цілих ягід брусниці та нерозчинної фракції ягід до високожирового раціону.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на 8-тижневих самцях мишей лінії ApoE^{-/-} (n = 40, Taconic Biosciences Inc., Данія). Молоді 7-тижневі гризуни із середньою масою тіла (21,9 ± 0,2) г були доставлені до віварію, де протягом тижня адаптувалися до умов середовища (температура повітря 22 °С, цикл 12 год світла/12 год темряви) та відповідної дієти.

Тварин розділили на чотири групи по 10 особин залежно від складу дієти:

НЖ-контроль — низькожировий раціон (12 % ккал жиру);

ВЖ-контроль — високожирова дієта (38 % ккал жиру);

ЦЯ — високожирова дієта із додаванням цілих ягід брусниці;

НФЯ — високожирова дієта із додаванням нерозчинної фракції ягід брусниці.

Мишей годували протягом 8 тиж. Інформацію про кількісний та якісний склад експериментальних дієт (Research Diets, Inc., США) наведено у таблиці. Усі маніпуляції з лабораторними тваринами було схвалено етичним комітетом Лундського університету, Швеція (номер затвердження M114-15).

На 7-му тижні експерименту проводили тест на просторову робочу пам'ять — спонтанне чергування у Т-лабіринті (за Діконом і Роулінзом із модифікаціями) [7]. Тест передбачав два випробування. Під час першого тварину розміщували у стартовій зоні Т-лабіринту. Через 10 с підіймали дверця стартової зони, дозволяючи тварині обрати один із двох рукавів. Протягом наступних 30 с тварина вивчала обраний рукав. Через 1 хв проводили друге випробування, в якому миша повторно обирала один із двох рукавів Т-лабіринту. В другому випробуванні очікували спонтанне чергування (вибір твариною рукава, який раніше вона не відвідувала). Тест виконували тричі протягом доби — вранці, вдень і ввечері, щоб виключити вплив добових коливань поведінкових реакцій. Оцінювали відсоток спонтанного чергування.

Наступного дня після дослідження просторової пам'яті проводили пероральний глюкозолерантний тест (ПГТТ). Базальний рівень глюкози визначали у крові із хвостової вени натще за допомогою глюкометра НемоСюе Glucose 201+ (Немосюе АВ, Швеція) [4]. Для цього мишам перорально вводили розчин глюкози (3 г/кг маси тіла) і через 0, 15, 30, 60, 90 і 120 хв після глюкозного навантаження вимірювали рівень глюкози в крові. За результатами вимірювань будували глікемічну криву та обчислювали площу під кривою для кожної з дослідних груп.

По завершенні експерименту тварин анестезували інгаляцією ізофлурану (Abbott, США). Із серця відбирали зразки крові, після чого мишей перфузували розчином 2 % параформальдегіду і 0,25 % глютаральдегіду на 0,1 М фосфатному буфері. Виділяли головний мозок, ізолювали гіпокампи та виготовляли фронтальні гіпокамपालні зрізи завтовшки 400 мкм за допомогою чопера (McIlwain, Велика Британія). Зрізи постфіксували у 2,5 % глютаральдегіду протягом 1,5 год, а потім у 1 % OsO₄ протягом 1 год. Зразки дегідрували в батареї етанолу зростаючої концентрації і абсолютному ацетону, заливали в смолу EPON відповідно до стандартного протоколу [2]. На ультрамікротомі LKB 8800 (LKB, Швеція) отримували напівтонкі

Таблиця
Склад експериментальних дієт

Склад дієти	НЖ-контроль		ВЖ-контроль		ЦЯ		НФЯ	
	% г	% ккал	% г	% ккал	% г	% ккал	% г	% ккал
Поживні речовини								
Білки	15	16	15	14	15	14	15	14
Жири	5	12	18	38	18	38	18	38
Вуглеводи	72	72	57	48	39	34	43	37
Компоненти	г	ккал	г	ккал	г	ккал	г	ккал
Казеїн	157,5	630	157,5	630	157,5	630	157,5	630
Крохмаль	713,5	2540	544,9	1940	362,9	1292	401,7	1430
Сахароза	50	200	50	200	50	200	50	200
Целюлоза	60	0	60	0	0	0	0	0
Цілі ягоди брусниці	0	0	0	0	264,3	648	0	0
Нерозчинна фракція ягід брусниці	0	0	0	0	0	0	215,3	510
Соева олія	50	450	50	450	50	450	50	450
Смалець	0	0	140	1260	140	1260	140	1260
Холестерол	0	0	10	0	10	0	10	0

зрізи гіпокампа завтошки 1 мкм, фарбували їх метиленовим синім та аналізували за допомогою світлового мікроскопа Olympus CX21 (Hitachi Ltd., Японія). Досліджували морфологію пірамідного шару, за допомогою програми ImageJ 1.50i (NIH, США) підраховували кількість неушкоджених нейронів на 1 мм довжини пірамідного шару і площу ядер нейронів у зоні CA1 гіпокампа.

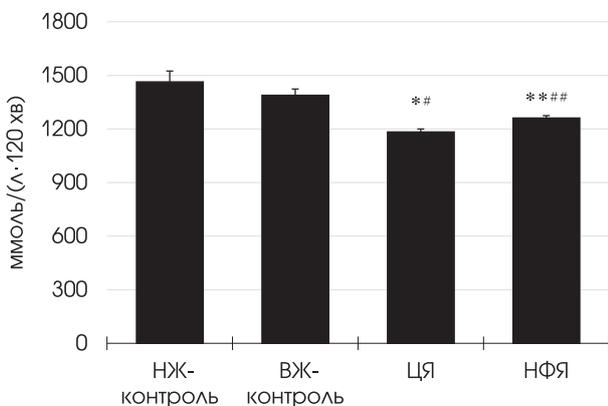
Амілолітичну активність у сироватці крові визначали в реакції гідролізу етилідену-рNP-G7 (субстрату α-амілази), використовуючи комерційний набір реактивів Infinity Amylase Liquid Stable Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Протокол методики надано виробником.

Статистичний аналіз виконували за допомогою програми GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad

Software, Inc., США). Категоріальні дані поведінкового тесту виражали у відсотках і обробляли за допомогою точного критерію Фішера. Морфологічні та біохімічні дані представлено як середнє арифметичне ± похибка середнього арифметичного ($M \pm m$). Порівняльну статистику проводили із використанням однофакторного ANOVA і критерію Т'юкі. Різницю між групами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

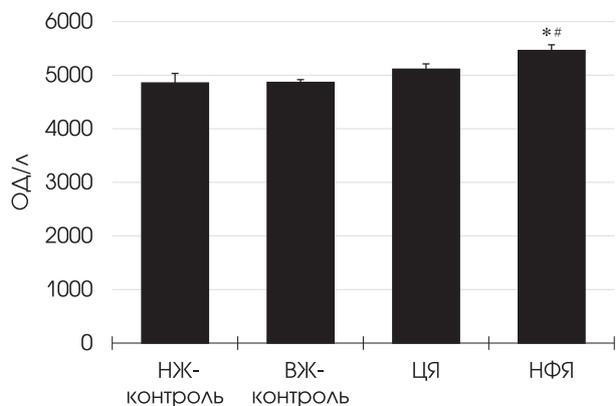
Результати та обговорення

З огляду на результати інших дослідників можна припустити, що порушення вуглеводного обміну разом із системною запальною реакцією є головними метаболічними чинниками, які призводять до розвитку структурно-функціональних змін у мозковій



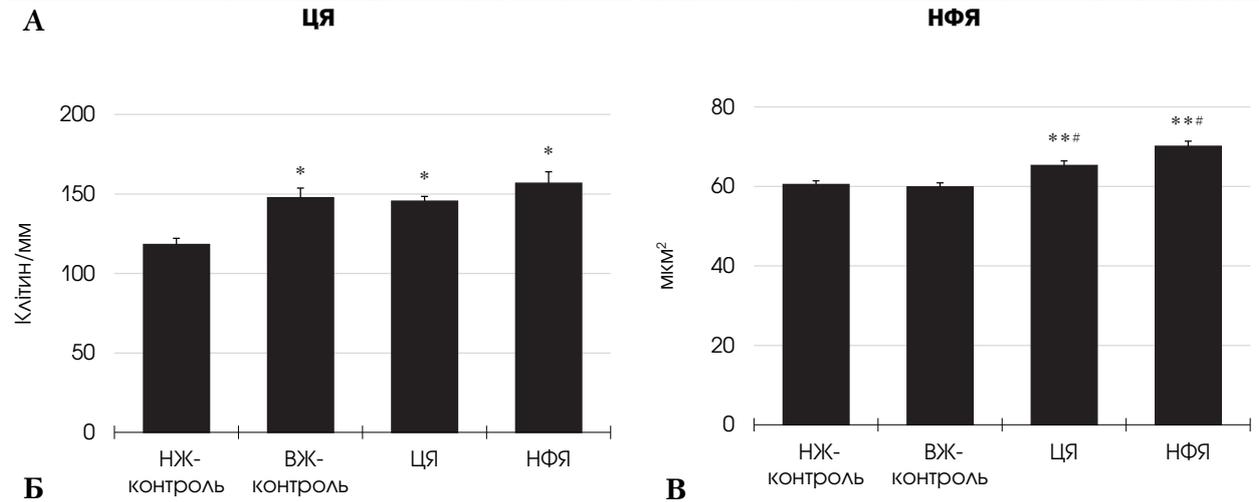
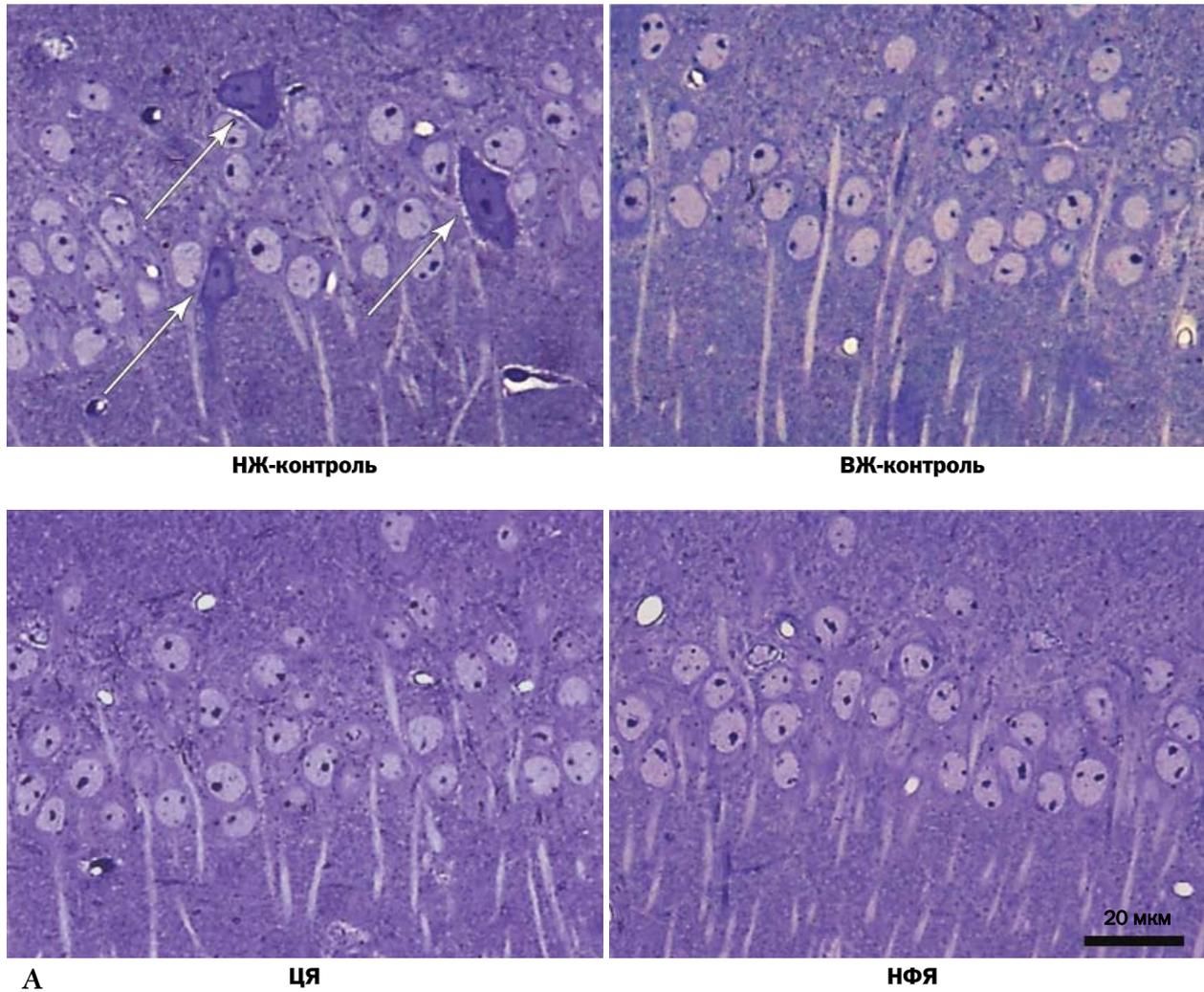
Статистично значуща різниця щодо НЖ-контролю: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. Статистично значуща різниця щодо ВЖ-контролю: # $p < 0,01$, ## $p < 0,05$.

Рис. 1. Площа під глікемічною кривою протягом 120 хв перорального глюкозолерантного тесту



Статистично значуща різниця щодо НЖ-контролю: * $p < 0,01$. Статистично значуща різниця щодо ВЖ-контролю: # $p < 0,01$.

Рис. 2. Активність α-амілази у сироватці крові мишей ApoE-/-



Стрілками позначено гіперхромні нейрони.
 Статистично значуща різниця щодо НЖ-контролю: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.
 Статистично значуща різниця щодо ВЖ-контролю: # $p < 0,001$.

Рис. 3. Пірамідні нейрони зони СА1 гіпокампа мишей ApoE^{-/-}: А — морфологія пірамідного шару; В — кількість неушкоджених нейронів на 1 мм довжини шару; В — площа ядра пірамідних клітин

тканині. Показано, що надмірна інсулінова сигналізація в нейронах спричиняє десенситизацію інсулінових рецепторів і порушення низки молекулярних каскадів, залучених, зокрема, в синаптичну пластичність та гіпокампальний нейрогенез [20, 22]. Взаємозв'язок між інсуліновою чутливістю та периферичним метаболізмом глюкози визначали опосередковано шляхом вимірювання сироваткової концентрації глюкози під час ПГТТ [21].

Площа під глікемічною кривою протягом ПГТТ у тварин груп НЖ-контролю і ВЖ-контролю становила $(1464,0 \pm 59,9)$ і $(1389,0 \pm 34,9)$ ммоль/(л·120 хв) відповідно. У мишей груп ЦЯ та НФЯ відзначено зниження рівня глюкози в крові. При споживанні цілих ягід брусниці площа під кривою зменшувалася на 19,0% ($p < 0,001$) і 14,8% ($p < 0,01$), а при використанні нерозчинної фракції ягід — на 13,9% ($p < 0,01$) та 9,2% порівняно з групами НЖ-контролю і ВЖ-контролю відповідно (рис. 1).

Отримані результати свідчать, що жировий склад дієти не впливає на динаміку зміни концентрації глюкози в крові 16-тижневих мишей АроЕ-/-, тоді як біологічно активні сполуки у складі цілих ягід брусниці та їх нерозчинної фракції здатні поліпшити глюкозний метаболізм. Оскільки гіперглікемія пов'язана із низкою патологічних станів нервової системи, виявлене її зниження може мати позитивне значення для запобігання віковим і нейродегенеративним змінам у мозку.

Ще одним показником вуглеводного обміну є активність α -амілази, яка обернено пропорційно корелює з рівнем сироваткового інсуліну [16]. Активність α -амілази в сироватці крові становила в середньому $(4856,0 \pm 176,2)$ ОД/л у групі НЖ-контролю та $(4864,0 \pm 54,2)$ ОД/л у ВЖ-контролю. Додавання нерозчинної фракції ягід брусниці до ВЖ-дієти спричинило статистично значуще підвищення амілалітичної активності в крові мишей АроЕ-/-: на 12,5% ($p < 0,01$) порівняно з НЖ-дієтою і на 12,3% ($p < 0,01$) порівняно з ВЖ-раціоном (рис. 2).

Уважають, що знижена активність α -амілази в сироватці крові пов'язана з підвищенням ризиком інсулінорезистентності та діабету, а підвищення — із поліпшенням глюкозного обміну. Зокрема S.G. Pierzupowski та співавт. продемонстрували, що додаткове споживання амілази з їжею зменшувало рівень глюкози в крові у молодих свиней з екзокринною панкреатичною недостатністю [17]. Тому посилення активності α -амілази під дією ВЖ-дієти із додаванням ягід брусниці та особливо їх нерозчинної фракції є свідченням сприятливого метаболічного ефекту брусниці, що може позитивно впливати на нервову функцію у мишей АроЕ-/-.

У зоні СА1 гіпокампа тварин із НЖ-контролю виявлено порушення організації пірамідного шару, зокрема його стоншення, збільшення кількості гіперхромних (ушкоджених) нейронів і дифузну локалізацію клітин (рис. 3А). У гіпокампі тварин ВЖ-контролю не спостерігали структурних змін.

Кількість інтактних нейронів на 1 мм довжини пірамідного шару у мишей цієї групи становила в середньому $147,7 \pm 6,0$, що на 24,9% ($p < 0,001$) більше, ніж у тварин НЖ-контролю (рис. 3Б). Споживання як цілих ягід брусниці, так і їх нерозчинної фракції на тлі ВЖ-дієти не спричинило суттєві зміни цитоархітектоніки зони СА1 гіпокампа і щільності пірамідних нейронів. Нами встановлено, що брусниця може посилювати функціональну активність у нейронах мишей АроЕ-/- . Про це опосередковано свідчить збільшення площі перерізу ядра пірамідних клітин. У ЦЯ-групі цей показник був вищим на 7,9% ($p < 0,01$) і 9,0% ($p < 0,01$), а у НФЯ-групі — на 15,9% ($p < 0,001$) і 17,0% ($p < 0,001$) порівняно з групами НЖ-контролю та ВЖ-контролю відповідно.

Відмінності в структурі зони СА1 гіпокампа тварин груп НЖ і ВЖ, імовірно, пов'язані з різним жирнокислотним складом дієт, які вони споживали. Так, НЖ-дієта містить лише рослинні жири (соєва олія), багаті на поліненасичені жирні кислоти, а ВЖ-раціон — переважно жири тваринного походження (смалець) з великим вмістом насичених і мононенасичених жирних кислот. Як нещодавно показано, фосфоліпіди у мозку включають у свої молекули менше поліненасичених і більше мононенасичених жирних кислот порівняно із серцем, печінкою та нирками [5]. Отже, ВЖ-дієта на основі тваринних жирів може бути кориснішою для нервової пластичності у тварин АроЕ-/-, ніж НЖ-дієта, як у нашому випадку.

Незважаючи на відмінності у вуглеводному метаболізмі, гістологічній структурі та морфометричних параметрах зони СА1 гіпокампа, тест спонтанного чергування у Т-лабіринті не виявив статистично значущої різниці у просторовій робочій пам'яті між дослідними групами. Відсоток чергування рукавів Т-лабіринту становив 76,7—93,3%, що є більшим за середнє значення успішності проходження тесту для мишей (рис. 4) [7]. Можливо, 16-тижневі миші АроЕ-/- виявилися занадто молодими для того, щоб у них розвинулися порушення поведінкових паттернів. Однак тварини

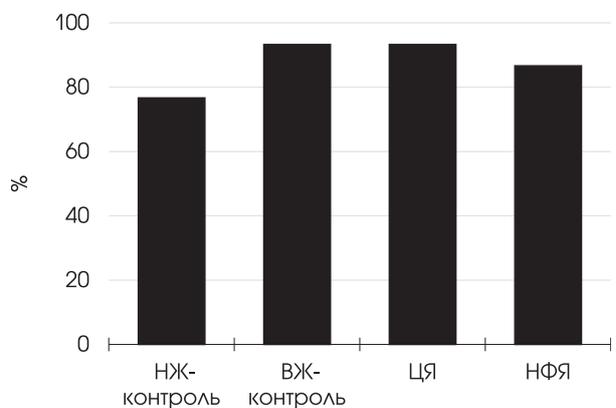


Рис. 4. Дослідження просторової пам'яті АроЕ-/- мишей у тесті спонтанного чергування в Т-лабіринті

НЖ-контролю демонстрували тенденцію до когнітивного зниження порівняно з мишами груп ВЖ і ЦЯ ($p = 0,14$ для обох груп).

Позитивний ефект ягід брусниці частково пояснюється їх пребіотичними властивостями. У попередньому дослідженні ми виявили, що у тварин груп ЦЯ і НФЯ значуще збільшувалася відносна рясність бактерій роду *Akkermansia* у сліпій кишці порівняно з групами НЖ і ВЖ і зменшувалася відносна рясність бактерій роду *Mucispirillum* порівнянні з ВЖ-контролем [11]. *Mucispirillum* корелює із запаленням шлунково-кишкового тракту та віковими змінами [19], тоді як *Akkermansia* нормалізує ліпідний профіль, рівень глюкози в крові та має протизапальні властивості [6]. Тому доцільним є вивчення пребіотичної дії брусниці для визначення активних компонентів, здатних модифікувати кишкову мікробіоту і спричиняти позитивні метаболічні та когнітивні ефекти.

Висновки

Додавання цілих ягід брусниці та їх нерозчинної фракції до ВЖ-раціону сприяло поліпшенню вуглеводного обміну в мишей ApoE^{-/-}. У тварин груп ЦЯ

та НФЯ спостерігали значуще зменшення площі під глікемічною кривою, а у мишей НФЯ-групи — також посилення активності α -амілази в сироватці крові порівняно з групами НЖ і ВЖ. Це опосередковано вказує на поліпшення метаболізму інсуліну та інсулінової сигналізації в організмі тварин, що впливає на нейрональну пластичність.

У тварин ЦЯ та НФЯ відзначено статистично значуще збільшення площі перерізу ядер пірамідних нейронів порівняно з обома контрольними групами, яке, ймовірно, свідчить про підвищення функціональної активності цих клітин. При цьому споживання ягід брусниці не спричинило суттєвих змін структури пірамідного шару зони CA1 гіпокампа мишей ApoE^{-/-} порівняно з ВЖ-дієтою.

Усі дослідні групи характеризувалися високим рівнем розвитку просторової робочої пам'яті. З огляду на це, можна припустити, що 16-тижневий миші ApoE^{-/-} є занадто молодими для того, щоб наявні зміни вуглеводного метаболізму та структури гіпокампа трансформувалися у порушення поведінкових паттернів. Тому для з'ясування ролі біоактивних компонентів брусниці у корекції когнітивного дефіциту слід використати доросліших тварин.

Дослідження виконано за грантової підтримки фондів *Direktör Albert Pålsson Foundation* та *Swedish Research Council FORMAS*.

Участь авторів: концепція і дизайн експерименту — Н. М., Ф. Х., О. П., Г. С.; збір та обробка матеріалу — Д. Ш., Т. К., І. О., Н. М., А. Ч.; статистичне опрацювання даних, написання тексту — Д. Ш.; редагування — Т. К., І. О., Г. С.

Література

1. Коваленко Т. М., Осадченко І. О., Шепілов Д. Р. та ін. Вплив низько- та високожирової дієти на структуру гіпокампа у нокаутних мишей ApoE^{-/-} // *Фізіол. журн.* — 2019. — Т. 65(4). — С. 31—40. doi: <https://doi.org/10.15407/fz65.04.031>.
2. Уикли Б. *Электронная микроскопия для начинающих.* — М.: Мир, 1975. — 336 с.
3. Al-Mahmood A. K., Afrin S. F., Hoque N. Dyslipidemia in insulin resistance: cause or effect // *Bangladesh J. Med. Biochem.* — 2014. — Vol. 7(1). — P. 27—31. doi: [10.3329/bjmb.v7i1.18576](https://doi.org/10.3329/bjmb.v7i1.18576).
4. Ayala J. E., Samuel V. T., Morton G. J. et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice // *Dis. Model Mech.* — 2010. — Vol. 3(9—10). — P. 525—534. doi: [10.1242/dmm.006239](https://doi.org/10.1242/dmm.006239).
5. Choi J., Yin T., Shinozaki K. et al. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids // *Mol. Cell. Biochem.* — 2018. — Vol. 442(1—2). — P. 187—201. doi: [10.1007/s11010-017-3203-x](https://doi.org/10.1007/s11010-017-3203-x).
6. Dao M. C., Everard A., Aron-Wisniewsky J. et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology // *Gut.* — 2016. — Vol. 65(3). — P. 426—436. doi: [10.1136/gutjnl-2014-308778](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778).
7. Deacon R. M., Rawlins J. N. T-maze alternation in the rodent // *Nat. Protoc.* — 2006. — Vol. 1(1). — P. 7 12. doi: [10.1038/nprot.2006.2](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2).
8. Fuentes D., Fernández N., García Y. et al. Age-related changes in the behavior of apolipoprotein E knockout mice // *Behav. Sci. (Basel).* — 2018. — Vol. 8(3). — 33. doi: [10.3390/bs8030033](https://doi.org/10.3390/bs8030033).
9. Kolovou G., Anagnostopoulou K., Mikhailidis D. P. et al. Apolipoprotein E knockout models // *Curr. Pharm. Des.* — 2008. — Vol. 14(4). — P. 338 351. doi: [10.2174/138161208783497769](https://doi.org/10.2174/138161208783497769).
10. Li J., Wang Q., Chai W. et al. Hyperglycemia in apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility // *Cardiovasc. Diabetol.* — 2011. — Vol. 10. — 117.
11. Marungruang N., Kovalenko T., Osadchenko I. et al. *Lingonberries* and their two separated fractions differently alter the gut microbiota, improve metabolic functions, reduce gut inflammatory properties, and improve brain function in ApoE^{-/-} mice fed high-fat diet // *Nutr. Neurosci.* — 2018 Oct 24. — P. 1—13. doi: [10.1080/1028415X.2018.1536423](https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1536423).
12. Matziouridou C., Marungruang N., Nguyen T. D. et al. *Lingonberries* reduce atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice in association with altered gut microbiota composition and improved lipid profile // *Mol. Nutr. Food Res.* — 2016. — Vol. 60(5). — P. 1150 1160.
13. Mössner J., Sommer C., Spiekermann G. et al. Pancreatic enzyme synthesis and secretion are independently regulated by insulin and glucocorticosteroids // *Digestion.* — 1990. — № 46. — P. 208—216. doi: [10.1159/000200388](https://doi.org/10.1159/000200388).
14. Ninomiya T. Epidemiological evidence of the relationship between diabetes and dementia // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2019. — № 1128. — P. 13—25. doi: [10.1007/978-981-13-3540-2_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3540-2_2).
15. Oppi S., Lüscher T. F., Stein S. Mouse models for atherosclerosis research — which is my line? // *Front. Cardiovasc. Med.* — 2019. — Vol. 6. — 46. doi: [10.3389/fcvm.2019.00046](https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00046).
16. Pierzynowska K. G., Lozinska L., Woliński J. et al. The inverse relationship between blood amylase and insulin levels in pigs during development, bariatric surgery, and intravenous infusion of amylase // *PLoS One.* — 2018. — Vol. 13(6). — e0198672. doi: [10.1371/journal.pone.0198672](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198672).
17. Pierzynowski S. G., Goncharova K., Gregory P. C. et al. Experiments suggesting extra-digestive effects of enteral pancreatic amylase and its peptides on glucose homeostasis in a pig model // *Sci. Rep.* — 2017. — Vol. 7(1). — 8628.

18. Rutkowski J. M., Lee L. L., Puchowicz M. et al. Reduced cognitive function, increased blood-brain-barrier transport and inflammatory responses, and altered brain metabolites in LDLr^{-/-} and C57BL/6 mice fed a western diet // *PLoS One*. — 2018. — Vol. 13 (2). — e0191909. doi: 10.1371/journal.pone.0191909.
19. Shenghua P., Ziqin Z., Shuyu T. et al. An integrated fecal microbiome and metabolome in the aged mice reveal anti-aging effects from the intestines and biochemical mechanism of FuFang zhenshu TiaoZhi (FTZ) // *Biomed. Pharmacother.* — 2020. — № 121. — 109421.
20. Spinelli M., Fusco S., Grassi C. Brain insulin resistance and hippocampal plasticity: mechanisms and biomarkers of cognitive decline // *Front. Neurosci.* — 2019. — Vol. 13. — 788.
21. Stumvoll M., Mitrakou A., Pimenta W. et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity // *Diabetes Care*. — 2000. — Vol. 23 (3). — P. 295—301. doi: 10.2337/diacare.23.3.295.
22. Walker K. A., Ficek B. N., Westbrook R. Understanding the role of systemic inflammation in Alzheimer's disease // *ACS Chem. Neurosci.* — 2019. — Vol. 10 (8). — P. 3340—3342. doi: 10.1021/acscchemneuro.9b00333.
23. Zhao X. S., Wu Q., Peng J. et al. Hyperlipidemia-induced apoptosis of hippocampal neurons in apoE^{-/-} mice may be associated with increased PCSK9 expression // *Mol. Med. Rep.* — 2017. — Vol. 15 (2). — P. 712—718. doi: 10.3892/mmr.2016.6055.

Д. Р. ШЕПИЛОВ¹, Т. Н. КОВАЛЕНКО¹,
 И. О. ОСАДЧЕНКО¹, Н. МАРУНГРУАНГ², А. ЧОПЕК²,
 Ф. ХОЛЕНИУС², О. ПРИХОДЬКО², Г. Г. СКИБО¹

¹ Інститут фізіології імені А. А. Богомольця НАН України, Київ

² Лундський університет, Швеція

Влияние ягод брусники на состояние углеводного метаболизма, структуру гиппокампа и когнитивную функцию у мышей, нокаутных по гену аполиipoproteина E

Цель — оценить количественные изменения показателей углеводного метаболизма, связанных с нервной функцией (уровня глюкозы и активности α -амилазы в крови), охарактеризовать структуру зоны СА1 гиппокампа и когнитивную способность у мышей, нокаутных по гену аполиipoproteина E (ApoE^{-/-}), при добавлении целых ягод брусники и нерастворимой фракции ягод к высокожировому (ВЖ) рациону.

Материалы и методы. Исследование проведено на 8-недельных самцах мышей ApoE^{-/-}, которых разделили на четыре группы в зависимости от состава диеты: НЖ-контроль — низкожировой (НЖ) рацион (12% ккал жира), ВЖ-контроль — высокожировая (ВЖ) диета (38% ккал жира), ЦЯ — животные, которых кормили ВЖ-диетой с добавлением целых ягод брусники; НФЯ — животные, получавшие нерастворимую фракцию ягод брусники в составе ВЖ-рациона. Период экспериментального кормления составлял 8 нед. На протяжении последней недели исследования проводили тест в Т-лабиринте на пространственную рабочую память, а также пероральный глюкозотолерантный тест. По окончании эксперимента определяли активность α -амилазы в сыворотке крови и изучали гистологическую структуру гиппокампа.

Результаты. Применение целых ягод брусники и их нерастворимой фракции ускорило выведение избыточной глюкозы из крови, о чем свидетельствовало уменьшение площади под гликемической кривой в течение перорального глюкозотолерантного теста на 9,2—19,0% по сравнению с НЖ-контролем и ВЖ-контролем. Животные группы НФЯ демонстрировали значимое усиление активности α -амилазы в сыворотке крови: на 12,5% по сравнению с НЖ-контролем и на 12,3% по сравнению с ВЖ-контролем. В группе НЖ-контроля животные имели нарушенную структуру пирамидного слоя в зоне СА1 гиппокампа и сниженную плотность интактных пирамидных нейронов по сравнению с остальными группами. Употребление ягод брусники не вызывало существенных изменений структуры пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа мышей ApoE^{-/-}, по сравнению с ВЖ-диеты. В группах ЦЯ и НФЯ отмечено увеличение площади сечения ядер пирамидных нейронов, что, вероятно, свидетельствует о повышенной функциональной активности данных клеток. Во время поведенческого тестирования все мыши ApoE^{-/-} имели высокий показатель чередования в Т-лабиринте (76,7—93,3%). Только у животных группы НЖ-контроля выявлена тенденция к когнитивному снижению по сравнению с группами ВЖ-контроля и ЦЯ.

Выводы. Установлено, что целые ягоды брусники и их нерастворимая фракция улучшают углеводный метаболизм у мышей ApoE^{-/-}, что может положительно влиять на структурно-функциональное состояние мозговой ткани посредством изменения инсулиновой сигнализации. Ягоды брусники в составе исследуемых диет способны усилить функциональную активность в пирамидных клетках зоны СА1 гиппокампа. Поведенческий тест не выявил значимых когнитивных нарушений, что, вероятно, связано с молодым возрастом животных.

Ключевые слова: гиппокамп, брусника, низко- и высокожировая диета, глюкоза, амилаза, пирамидные нейроны, пространственная память.

D. R. SHEPILOV¹, T. M. KOVALENKO¹,
I. O. OSADCHENKO¹, N. MARUNGRUANG², A. CHOPEK²,
F. HÅLLENIUS², O. PRYKHODKO², G. G. SKIBO¹

¹Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv

²Lund University, Sweden

Impact of lingonberries on carbohydrate metabolism, the hippocampal structure and cognitive function in ApoE-knockout mice

Objective — to evaluate the qualitative changes in indicators of carbohydrate metabolism that associated with nervous function (glucose level and alpha-amylase activity in the blood), as well as characterize the structure of the hippocampal CA1 area and cognitive ability in ApoE^{-/-} mice when adding whole lingonberries and insoluble fraction of the berries into a high-fat (HF) diet.

Methods and subjects. The study was conducted on 8-week-old male ApoE^{-/-} mice which were distributed into 4 groups in accordance with diets' composition: 1 — LF (low-fat) control (12% kcal of fat); 2 — HF control (38% kcal of fat); 3 — WL: the animals fed a HF diet with whole lingonberries; 4—IFL: the animals that consumed insoluble fraction of lingonberries within a HF diet. The feeding period lasted 8 weeks. During the last week of the investigation, T-maze test and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed. After the end of the experiment we determined alpha-amylase activity in blood serum, examined the hippocampal histological structure.

Results. Whole lingonberries and their insoluble fraction accelerated the removal of excess glucose from the blood, as evidenced by decreased area under the OGTT glucose response curve in ApoE^{-/-} mice by 9.2—19%, compared with LF and HF control diets. IFL animals also demonstrated a significant increase in the activity of serum alpha-amylase: by 12.5% compared to LF controls and by 12.3% compared to HF controls. Meanwhile, LF control mice had an impaired pyramidal layer structure in the hippocampal CA1 area, as well as reduced density of intact pyramidal neurons relative to other groups. The intake of lingonberries did not induce substantial changes in the structure of CA1 area in ApoE^{-/-} mice, compared to HF controls. Nevertheless, an increase in the area of pyramidal cells nuclei was observed in WL and IFL animals, which may indicate an elevated functional activity of these cells. In behavioral testing, all ApoE^{-/-} animals had a high alternation rate in the T-maze test (76.7—93.3%). And only the LF control group was characterized by a tendency to cognitive decline, compared with the HF control and WL groups.

Conclusions. The results presented in the work indicate that whole lingonberries and their insoluble fraction improve carbohydrate metabolism in ApoE^{-/-} mice, which may have a beneficial impact on the structural and functional state of brain tissue via alterations in insulin signaling. Berries as a part of investigated diets may also increase the functional activity in the pyramidal cells of the hippocampal CA1 area. Behavioral test did not find significant cognitive impairments, possibly because of young age of the animals.

Key words: hippocampus, lingonberry, low- and high-fat diet, glucose, amylase, pyramidal neurons, spatial memory.