

Биомедицинские аспекты влияния мелатонина на экспрессию LYVE1 и HIF-1 α в мозге у мышей с генетически детерминированной моделью сахарного диабета II типа

Мичурина С.^{1*}, Серых А.^{1,2}, Ищенко И.¹, Архипов С.¹, Завьялов Е.¹

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, СО РАН, Новосибирск, Россия

* michurinasv3000@gmail.com

Ключевые слова: сахарный диабет II типа; лимфатическая система; LYVE1; HIF-1 α

Мотивация и цель: В настоящий момент сахарный диабет и осложнения связанные с ним, находятся в десятке лидирующих причин смертности во всем мире. Ввиду того что существующие препараты для лечения диабета имеют многочисленные побочные эффекты, остро стоит необходимость поиска вещества, имеющего высокий терапевтический потенциал. Известно, что течение сахарного диабета II типа (СДII), вследствие существования реципрокной связи мелатонин-инсулин, связано со снижением уровня мелатонина [1]. Кроме того, терапия экзогенным мелатонином, выполненная на клеточных линиях, лабораторных животных и пациентах с СДII показала свою эффективность в облегчении связанных с ним осложнений. Примечательно, что среди таких осложнений существует повышенный риск развития различных неврологических заболеваний, таких как шизофрения и болезнь Альцгеймера, возникающих как закономерное следствие метаболических нарушений в организме, с последующим развитием окислительного и гипоксического стресса в головном мозге [2]. Поэтому мелатонин, являющийся антиоксидантом широкого спектра, и, благодаря своим гидро- и липофильным свойствам легко преодолевающий биологические барьеры представляется нам отличным кандидатом для терапии неврологических осложнений, связанных с СДII. Однако данные о воздействии мелатонина на мозг всё еще противоречивы [3], а потому важно исследовать его воздействие на лимфатическую систему и гипоксию клеток мозга в свете различных моделей СДII. Цель работы – установить влияние мелатонина на экспрессию HIF-1 α и рецептора LYVE1 в головном мозге db/db мышей, с генетически обусловленным ожирением и сахарным диабетом II типа.

Методы и алгоритмы: Исследование проводили на трехмесячных самках мышей линии BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J (db/db). Животных содержали в барьерных помещениях ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН (RFMEFI62119X0023). Фенотип данных мышей, ввиду мутации в гене рецептора лептина, проявляется в ожирении, инсулинорезистентности и нарушении метаболизма глюкозы. Были сформированы следующие группы: «Контроль» ($n = 5$) – интактные животные; «Плацебо» ($n = 5$) – мыши, ежедневно получавшие внутривенно 200 мкл дистиллированной воды в течение недели;

«Мелатонин» ($n = 5$) – мыши, которым аналогичным образом вводили мелатонин (MP Biomedical) в дозировке 1 мг/кг массы тела, разведенный в 200 мкл дистиллированной воды. Для исследования забирали головной мозг целиком, совершали стандартную гистологическую пробоподготовку. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм получали в соответствии с координатами брегмы в диапазоне от -1.0 до -1.5 мм по Allen Mouse Brain Atlas [4]. Выявление LYVE1 и HIF-1 α проводили с помощью непрямого пероксидазного метода при использовании ИГХ-системы детекции Novocastra (RE7110-K), антител специфичных к LYVE1 (ab-14917) и к HIF-1 α (AF-1009). С помощью программы "ImageJ" определяли относительную площадь и яркость участков (параметр, обратно пропорциональный концентрации маркера) препаратов мозга, окрашенных на LYVE1 и HIF-1 α . С каждого препарата оценивали не менее 20 полей зрения. В качестве целевых анализируемых участков использовали: моторную, соматосенсорную, висцеральную, ретроспленальную, агранулярную островковую, грушевидную коры головного мозга, в зоне поверхностных слоев. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического теста Краскала–Уоллеса, с помощью программного обеспечения STATISTICA 12 (StatSoft, 2015). В качестве исходных данных сравнивали различия по среднему полю зрения в группе. Данные на графиках представлены в виде: медиана (Q1; Q3). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты: Нами выявлено интенсивное иммуногистохимическое HIF-1 α окрашивание на срезах головного мозга db/db мышей, локализованное в цитоплазме нервных и глиальных клеток мозга, особенно в группе «Плацебо». При этом площадь экспрессии HIF-1 α у животных, получавших мелатонин, несколько снижалась, по сравнению с группой «Плацебо», также снижалась и концентрация, по сравнению как с контролем, так и с плацебо (рис. 1). Необходимо отметить, что экспрессия HIF-1 α была значительно повышена у мышей группы «Плацебо», по сравнению с другими группами животных, что может быть объяснено стрессом, вызванным внутрижелудочным введением мелатонина и плацебо через зонд животным. Это подтверждается данными касательно площади распределения маркера, которая достоверно увеличивалась у мышей группы «Плацебо» и возвращалась к уровню контроля после введения мелатонина. В группе «Контроль» выявлено выраженное LYVE1 окрашивание капилляров и лимфатических эндотелиальных клеток в паренхиме исследованных зон головного мозга. Вокруг капилляров определялись патологически расширенные пространства Вирхова-Робина. Во время вывода животных из эксперимента, в группах «Контроль» и «Плацебо» были обнаружены по одному животному с гидроцефалией. В группе db/db мышей, получавших мелатонин, особей с гидроцефалией отмечено не было. На препаратах наблюдалось уменьшение пространств Вирхова-Робина за счет снижения накопления жидкости в межклеточном пространстве. Морфометрический анализ показал, что у db/db мышей, получавших мелатонин, незначительно снижалась площади экспрессии LYVE1, однако концентрация данного рецептора в лимфатической системе мозга остается сравнимой с группами «Контроль» и «Плацебо» (рис. 2).

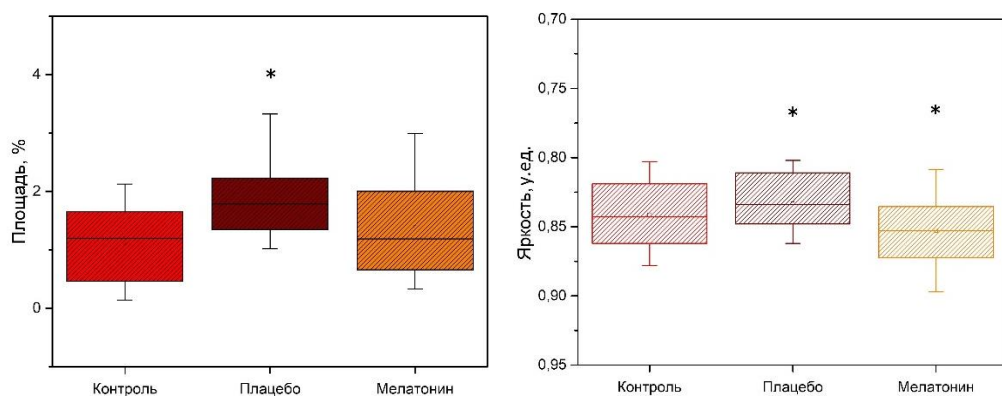


Рис. 1. Площадь и яркость окрашивания HIF-1 α в мозге db/db мышей экспериментальных групп: «Контроль», «Плацебо» и «Мелатонин». Примечание: * сравнение с группой «Контроль», * $p < 0.05$, тест Краскала–Уоллеса

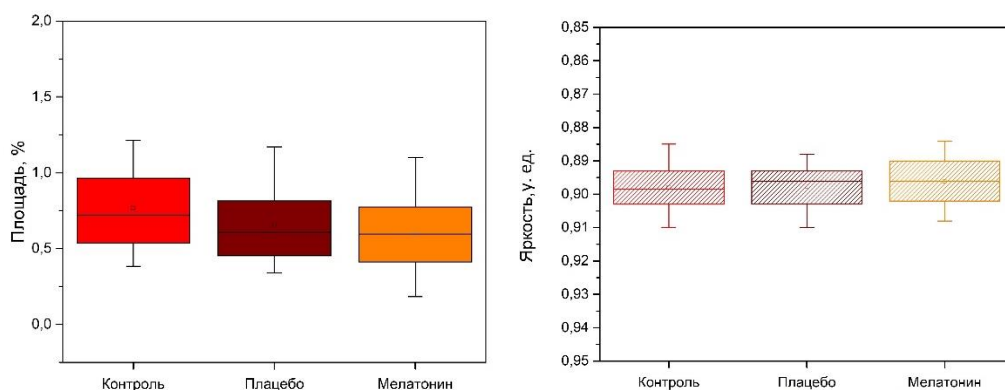


Рис. 2. Площадь и яркость окрашивания рецептора LYVE1 в мозге db/db мышей экспериментальных групп: «Контроль», «Плацебо» и «Мелатонин». Примечание: * сравнение с группой «Контроль», * $p < 0.05$, тест Краскала–Уоллеса

Выводы: Полученные нами результаты свидетельствуют, что мелатонин оказывает антигипоксический эффект на клетки головного мозга db/db мышей, нормализует жидкостный гомеостаз в глимфатической системе мозга. Важно отметить, что мелатонин хоть и обладает положительным противоотечным действием, но его эффекты обеспечиваются не через регуляцию экспрессии рецептора LYVE1, а посредством других механизмов, вероятно, включающих и биоритмологические, лимфодренажные и антиоксидантные аспекты его влияния на организм.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках проекта НИИКЭЛ — филиала ИЦиГ СО РАН (FWNR-2022-0009).

Biomedical aspects of the effect of melatonin on LYVE1 and HIF-1 α expression in the brain in mice with a genetically determined model of type II diabetes mellitus

Michurina S.^{1*}, Serykh A.^{1,2}, Ishchenko I.¹, Arkhipov S.¹, Zavjalov E.¹

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

²Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* michurinasv3000@gmail.com

Key words: type II diabetes mellitus; glymphatic system; LYVE1; HIF-1 α

Motivation and Aim: At present, diabetes mellitus and its complications are among the top ten leading causes of death worldwide. In view of the fact that existing diabetes drugs have numerous side effects, there is an urgent need to find a substance with high therapeutic potential. It is known that the course of type II diabetes mellitus (T2DM), due to the existence of a reciprocal melatonin-insulin relationship, is associated with a decrease in melatonin levels [1]. In addition, exogenous melatonin therapy performed on cell lines, laboratory animals and patients with T2DM has been shown to be effective in alleviating the complications associated with it. Notably, among such complications, there is an increased risk of developing various neurological diseases such as schizophrenia and Alzheimer's disease, arising as a natural consequence of metabolic disorders in the body, with the subsequent development of oxidative and hypoxic stress in the brain [2]. Therefore, melatonin, which is a broad-spectrum antioxidant and, due to its hydro- and lipophilic properties, easily crosses biological barriers, seems to us to be an excellent candidate for the therapy of neurological complications associated with T2DM. However, data on the effects of melatonin on the brain are still contradictory [3], and therefore it is important to investigate its effects on the glymphatic system and brain cell hypoxia in light of different models of T2DM. The aim of this work was to determine the effect of melatonin on the expression of HIF-1 α and LYVE1 receptor in the brain of db/db mice, with genetically determined obesity and type II diabetes mellitus.

Methods and Algorithms: The study was performed on three-month-old female BKS.Cg-Dock7m^{+/+}Leprdb/J (db/db) mice. Animals were kept in barrier rooms of the collective use center “Laboratory Animal Genetic Resources Center” IC&G SB RAS (RFMEFI62119X0023). The phenotype of these mice, due to a mutation in the leptin receptor gene, is manifested by obesity, insulin resistance and impaired glucose metabolism. The following groups were formed: “Control” ($n = 5$) – intact animals; “Placebo” ($n = 5$) – mice that received intragastrically 200 μ l of distilled water daily for a week; “Melatonin” ($n = 5$) – mice that were similarly administered melatonin (MP Biomedical) at a dosage of 1 mg/kg body weight diluted in 200 μ l of distilled water. The whole brain was taken for the study and standard histologic sample preparation was performed. Paraffin sections 4 μ m thick were obtained according to bregma coordinates ranging from –1.0 to –1.5 mm using the Allen Mouse Brain Atlas [4]. LYVE1 and HIF-1 α were detected by indirect peroxidase method using Novocastra IHC detection system (RE7110-K), antibodies specific to LYVE1 (ab-14917) and to HIF-1 α (AF-1009). The relative area and brightness of areas (a parameter inversely proportional to marker concentration) of brain preparations stained for LYVE1 and HIF-1 α were determined

using the ImageJ program. At least 20 fields of view were evaluated from each preparation. As target analyzed areas were used: motor, somatosensory, visceral, retrosplenial, agranular insular, piriform cortex, in the zone of superficial layers. The significance of differences was determined using the nonparametric Kruskal-Wallis test, using STATISTICA 12 software (StatSoft, 2015). The differences in mean visual field in the group were compared as baseline data. Data on the graphs are presented as: median (Q1; Q3). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results: We found intense immunohistochemical HIF-1 α staining on brain slices of db/db mice localized in the cytoplasm of nerve and glial cells in the brain, especially in the placebo group. The area of HIF-1 α expression was slightly decreased in animals receiving melatonin compared to the placebo group, and the concentration was also decreased compared to both control and placebo (Fig. 1).

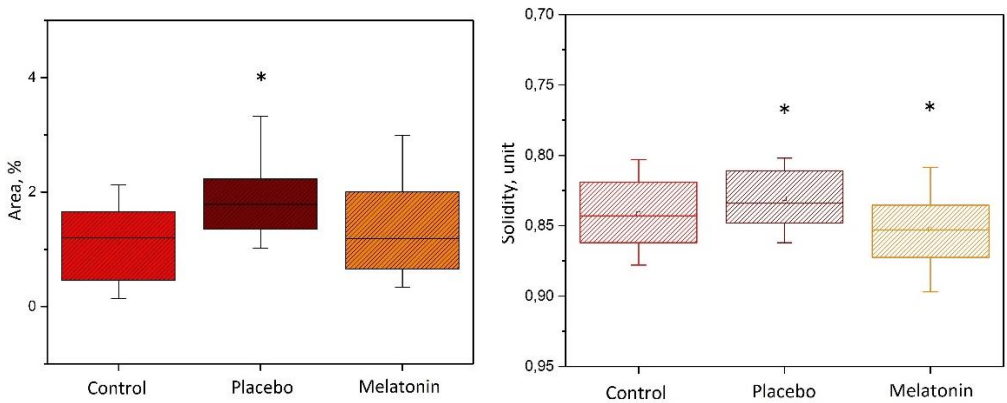


Fig. 1. Area and brightness of HIF-1 α staining in the brains of db/db mice of experimental groups: “Control”, “Placebo” and “Melatonin”. Note: * comparison with control group, * $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test

It should be noted that the expression of HIF-1 α was significantly upregulated in mice of the placebo group, compared with the other groups of animals, which may be explained by the stress induced by intragastric administration of melatonin and placebo through the probe to the animals. This is confirmed by the data concerning the distribution area of the marker, which significantly increased in mice of the placebo group and returned to the control level after melatonin administration. The control group showed pronounced LYVE1 staining of capillaries and lymphatic endothelial cells in the parenchyma of the studied brain areas. Pathologically dilated Virchow-Robin spaces were defined around capillaries. At the time of withdrawal of animals from the experiment, one animal with hydrocephalus each was found in the control and placebo groups. In the db/db group of mice receiving melatonin, no individuals with hydrocephalus were observed. The preparations showed a decrease in Virchow-Robin spaces due to decreased fluid accumulation in the intercellular space. Morphometric analysis showed that in db/db mice treated with melatonin, the expression area of LYVE1 was slightly decreased; however, the concentration of this receptor in the brain lymphatic system remains comparable to the control and placebo groups (Fig. 2).

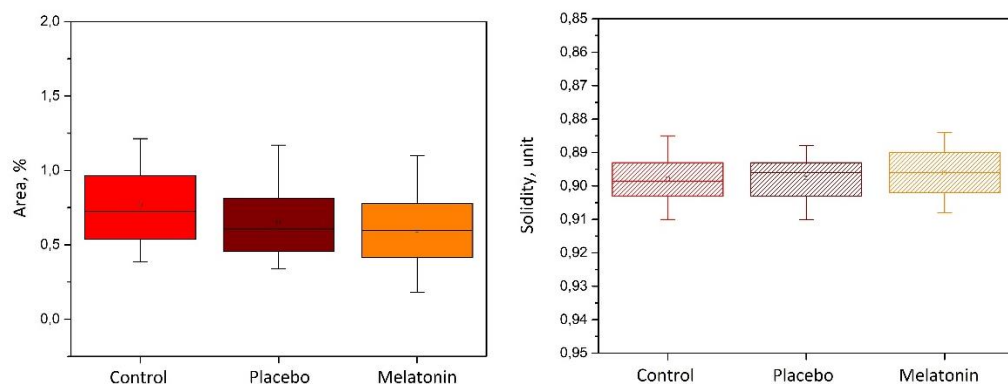


Fig. 2. Area and brightness of LYVE1 receptor staining in the brains of db/db mice of experimental groups: “Control”, “Placebo” and “Melatonin”. Note: * comparison with control group, * $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test

Conclusion: Our results indicate that melatonin has an antihypoxic effect on brain cells of db/db mice and normalizes fluid homeostasis in the brain glymphatic system. It is important to note that although melatonin has a positive antiedematous effect, its effects are provided not through regulation of LYVE1 receptor expression, but through other mechanisms, probably including biorhythmological, lymphatic drainage and antioxidant aspects of its influence on the organism.

Funding: The study was carried out within the framework of the project of Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (FWNR-2022-0009).

Список литературы/References

1. Patel R., Parmar N. et al. Diabetes mellitus and melatonin: Where are we? *Biochimie*. 2022;202:2-14. doi 10.1016/j.biochi.2022.01.001
2. Shen S., Liao Q., Wong Y. et al. The role of melatonin in the treatment of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Int J Biol Sci*. 2022;18(3):983-994. doi 10.7150/ijbs.66871
3. Garaulet M., Qian J., Florez J. et al. Melatonin effects on glucose metabolism: Time to unlock the controversy. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(3):192-204. doi 10.1016/j.tem.2019.11.011
4. Reference atlas: Allen mouse brain atlas. URL: <https://mouse.brain-map.org> (дата обращения: 12.02.2024)