



Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J

Т.В. Яковлева¹✉, А.Ю. Казанцева¹, Е.Н. Макарова¹, Н.М. Бажан^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

В патогенезе сахарного диабета 2-го типа важную роль играет снижение чувствительности к инсулину. Существуют половые различия в развитии метаболических нарушений: самцы мышей по сравнению с самками более склонны к развитию с возрастом гиперинсулинемии и к снижению толерантности к глюкозе при содержании на высококалорийной диете. Целью данной работы было исследовать экспрессию генов трансдукции сигнала инсулина у мышей разного пола и возраста. Исследования проводили на мышах линии C57BL/6J. Оценку экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина в печени, мышцах и в жировой ткани выполняли методом ПЦР в реальном времени. Показано, что независимо от возраста чувствительность к инсулину у самок выше, чем у самцов, поскольку уровень глюкозы в плазме крови у самок и самцов не различается, тогда как уровень инсулина у самок ниже, чем у самцов. С возрастом у самок повышается толерантность к глюкозе, и в возрасте 30 недель толерантность к глюкозе у самок выше, чем у самцов. Показано, что пол и возраст влияют на уровень экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина. В возрасте 10 недель существуют половые различия по уровню мРНК *Pik3cd* в печени, мРНК *Irs1* в мышцах, мРНК *Irs1* и *Slc2a4* в жировой ткани, в возрасте 30 недель – по уровню мРНК *Irs2* и *Pik3cd* в печени, мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* в мышцах, мРНК *Insr* и *Pik3cd* в жировой ткани. В возрасте 10 недель во всех тканях экспрессия генов выше у самок, чем у самцов. В возрасте 30 недель у самок экспрессия генов в печени выше, а в мышцах и жировой ткани ниже, чем у самцов. С возрастом у самцов снижается уровень мРНК *Insr* в печени и мышцах и мРНК *Pik3cd* в жировой ткани, повышается уровень мРНК *Pik3cd* в мышцах. У самок с возрастом снижается уровень мРНК *Irs1* в мышцах и мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* в жировой ткани. Таким образом, молекулярной основой половых различий и возрастных изменений чувствительности к инсулину может быть изменение экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина в тканях-мишенях.

Ключевые слова: половые различия; толерантность к глюкозе; чувствительность к инсулину; мРНК; *Insr*; *Irs1/2*; *Pik3cd*; *Slc2a2/4*; real-time ПЦР; мыши линии C57BL/6J.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Яковлева Т.В., Казанцева А.Ю., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):833-840. DOI 10.18699/VJ17.303

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Makarova E.N., Bazhan N.M. Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in young and adult C57BL/6J mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):833-840. DOI 10.18699/VJ17.303 (in Russian)

Received 30.09.2017
Accepted for publication 25.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: jakov@bionet.nsc.ru

Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in young and adult C57BL/6J mice

T.V. Yakovleva¹✉, A.Yu. Kazantseva¹, E.N. Makarova¹, N.M. Bazhan^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Reduced insulin sensitivity plays an important role in the pathogenesis of type II diabetes. There are sex differences in the development of metabolic disorders. The aim of this work was to investigate the insulin signal transduction gene expression in mice of different sex and age. Male and female C57BL/6J mice were used in our studies. Gene expression was assayed by RT-PCR. It was shown that insulin sensitivity in females was higher than in males regardless of age because the level of glucose in blood plasma of females does not differ from that in males, whereas female insulin levels were lower than male insulin levels. Female glucose tolerance increased with age, and glucose tolerance was higher in females than in males at the age of 30 weeks. It was shown that sex and age affect the expressions of insulin signal transduction genes. It was shown that there are sex differences in the levels of mRNA *Pik3cd* in the liver, in the levels of mRNA *Irs1* in the muscle, in the levels of mRNA *Irs1* and *Slc2a4* in adipose tissue at the age of 10 weeks, and there are sex differences in the levels of mRNA *Irs2* and *Pik3cd* in the liver, in the levels mRNA *Pik3cd* and *Slc2a4* in the muscle, in the levels mRNA *Insr* and *Pik3cd* in adipose tissue at the age of 30 weeks. In young animals, the expression of the genes was higher in females than in males in all tissues. In adult animals, the expression of the genes in the liver was higher in females than in males, the expression of the genes in muscle and adipose tissues were lower in females than in males. In males, the levels of mRNA *Insr* in the liver and muscles and mRNA *Pik3cd* in adipose tissue decreased with age, and the level of mRNA *Pik3cd* in muscles increased with age. In females, the levels of mRNA *Irs1* in muscle and mRNA *Pik3cd* and *Slc2a4* in adipose tissue decreased with age. Thus the molecular basis of sex differences and age-related changes in insulin sensitivity may be a change in expressions of insulin signal transduction genes in the target tissues.

Key words: sex differences; glucose tolerance; insulin sensitivity; mRNA; *Insr*; *Irs1/2*; *Pik3cd*; *Slc2a2/4*; real-time PCR, mouse C57BL/6J.

В настоящее время в патогенезе диабета второго типа ведущую роль отводят развитию инсулинорезистентности (Corps, White, 2012), однако механизм развития инсулинорезистентности изучен недостаточно. Известно, что существуют половые различия в развитии метаболических нарушений – у женщин нечувствительность к инсулину встречается реже, чем у мужчин (Tripathy et al., 2000). На лабораторных животных показано, что самки мышей менее склонны к развитию гиперинсулинемии и к снижению толерантности к глюкозе (Pettersson et al., 2012; Sentil Kumar et al., 2014), кроме того, при содержании на жирной диете у самок мышей, в отличие от самцов, не снижается чувствительность к инсулину в печени, не развивается голодная гипергликемия (Akoum et al., 2011) и не снижается толерантность к глюкозе (Ganz et al., 2014). Различия по чувствительности к инсулину могут быть обусловлены половыми различиями в синтезе и активности белков трансдукции сигнала инсулина. Так, у мышей обнаружены половые различия (у самок выше, чем у самцов) по уровню белков рецептора инсулина (INSR), субстрата рецептора инсулина (IRS1), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и транспортера глюкозы четвертого типа (GLUT4) в скелетных мышцах и в жировой ткани (Macotela et al., 2009; Shelley et al., 2009; Grove et al., 2010; Oh et al., 2011), а также по уровню стимулированного инсулином фосфорилирования протеинкиназы В (АКТ) в адипоцитах (Macotela et al., 2009). На сегодняшний день практически нет данных о том, различаются ли самцы и самки по экспрессии генов, кодирующих белки трансдукции сигнала инсулина. Показано, что у мышей в адипоцитах уровень мРНК *Insr* у самцов и самок не различается, уровень мРНК *Slc2a4* (ген, кодирующий GLUT4) у самок выше, чем у самцов (Macotela et al., 2009).

Известно, что показатели чувствительности к инсулину в постпубертатный период меняются с возрастом. У мышей C57BL/6J в период с 12 по 24 неделю у самок и с 12 по 36 неделю у самцов толерантность к глюкозе не меняется, но снижается уровень глюкозы в крови после голодания и показатель НОМА-IR (homeostasis model assessment insulin resistance) (Sairam et al., 2006; Hinder et al., 2017). Аналогично у самцов крыс Wistar в период с 4 по 24 неделю показано достоверное снижение показателя НОМА-IR, уровня триглицеридов в печени, уровней глюкозы и инсулина в крови, повышение чувствительности к инсулину в тесте толерантности (Sakamuri et al., 2016). При этом сравнение молекулярного механизма передачи сигнала инсулина у животных разных возрастов не проводили.

Целью данной работы было исследовать молекулярные сигнальные пути, определяющие чувствительность к инсулину, у мышей разного пола и возраста. Для этого мы сравнивали уровень мРНК генов, кодирующих белки трансдукции инсулинового сигнала, в печени, в мышечной и жировой тканях у самок и самцов мышей в возрасте 10 недель (молодые) и 30 недель (взрослые). Полученные данные позволяют предположить, что в основе половых различий чувствительности к инсулину, а также повышения с возрастом у самок толерантности к глюкозе лежит активация транскрипции генов, кодирующих белки трансдукции инсулинового сигнала, в печени – поскольку

у самок с возрастом повышается уровень мРНК *Irs2* в печени, и в возрасте 30 недель уровни мРНК *Irs2* и *Pik3cd* (каталитической субъединицы PI3K) в печени у самок выше, чем у самцов.

Материалы и методы

Животные. Эксперимент проводили на мышах C57BL/6J. Животных разводили и содержали в виварии Института цитологии и генетики СО РАН в условиях постоянного светового режима (12:12) и свободного доступа к воде и пище (Aller Petfood, Россия) при температуре 22 ± 2 °С. При работе соблюдали биоэтические нормы. Животных отсаживали от матерей в возрасте 4 недель по 5 мышей одного пола в клетку. Часть животных рассаживали по одному в возрасте 6 недель, остальных – в возрасте 26 недель. Через две недели индивидуального содержания часть животных тестировали в глюкозо-толерантном тесте (ГТТ), других – в инсулино-толерантном тесте (ИТТ). Через две недели после тестирования, соответственно в возрасте 10 и 30 недель, животных декапитировали утром (09:00–10:00 ч) в сытом состоянии или после ночного голодания (корм убрали накануне вечером в 18:00, оставляя свободный доступ к воде). Фазу эстрального цикла у самок не учитывали. Кровь для измерения уровня инсулина, глюкозы, триглицеридов и холестерина собирали в пробирки с 5 мкл ЭДТА, центрифугировали (4000 g, 20 мин) на холоду, плазму крови хранили при -70 °С. У сытых животных брали образцы тканей печени, абдоминального жира и мышц (quadriceps femoris). Образцы тканей немедленно помещали в жидкий азот и хранили там до выделения общей РНК.

Было сформировано четыре экспериментальные группы: самки – 10 недель, самцы – 10 недель, самки – 30 недель, самцы – 30 недель. Всего использовано 25 самок и 24 самца в возрасте 10 недель, 25 самок и 29 самцов в возрасте 30 недель.

Для животных всех экспериментальных групп определяли следующие показатели: вес тела, индекс веса печени и жировой ткани ($(\text{вес ткани (г)}/\text{вес тела (г)}) \times 100$ %), концентрации глюкозы, инсулина, триглицеридов и холестерина в плазме крови в сытом и голодном состоянии, уровень глюкозы в крови в ходе ГТТ и ИТТ, уровень мРНК *Insr*, *Irs2*, *Pik3cd*, *Slc2a2* (не зависящий от инсулина транспортер второго типа) в печени, уровень мРНК *Insr*, *Irs1*, *Pik3cd*, *Slc2a4* в мышечной и жировой тканях.

Глюкозо-толерантный и инсулино-толерантный тесты. Тестирование животных проводили натощак: воду оставляли в свободном доступе, пищу убрали в 09:00, тестирование начинали в 14:00. Глюкозу вводили перорально в дозе 2 г/кг. Инсулин (протафан – синтетический аналог инсулина, Ново Нордиск А/С, Дания) вводили внутривенно в дозе 0.5 Ед/кг. Концентрацию глюкозы в крови из хвостовой вены определяли до введения глюкозы или протафана, а также через 15, 30, 60 и 120 мин после введения. Определение концентрации глюкозы в крови в ходе глюкозо-толерантного и инсулино-толерантного тестов проводили с помощью глюкометра OneTouch Select (LifeScan; Johnson and Johnson, США).

Физиологический индекс резистентности к инсулину (НОМА-IR) определяли у животных после ночного го-

лодания и рассчитывали по формуле [Уровень глюкозы в крови (ммоль/л) × Уровень инсулина в крови (нг/мл)]/22.5. Увеличение данного показателя означает снижение чувствительности к инсулину.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли, используя реагент ExtraRNA (Евроген Лаб, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. 1 мкг РНК смешивали с 2.5 мкл праймера oligo-dT (Евроген Лаб, Москва, Россия, конечная концентрация праймера составила 2 мкМ) и денатурировали при 70 °С в течение 2 мин на амплификаторе «БИС» (Россия), затем добавляли 5 мкл (5х) буфера («СибЭнзим», Новосибирск, Россия), 2.5 мкл dNTP (5 мМ по каждому, «Медиген», Новосибирск, Россия) и 0.5 мкл (100 ед) M-MuLV («СибЭнзим», Новосибирск, Россия). Полученную смесь инкубировали при 42 °С в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при –20 °С.

Относительное количество мРНК генов определяли C_T -методом. ПЦР в реальном времени проводили, используя VIIA7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, США). Все реакции были выполнены с использованием реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии референсного красителя ROX («Синтол», Москва) в 96-луночных плашках (MicroAMP, Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. В качестве праймеров и зондов использовали коммерческие наборы TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) для мышей: рецептор инсулина – *Insr*, Mm01211875_m1; субстрат инсулинового рецептора первого типа – *Irs1*, Mm01278327_m1; субстрат инсулинового рецептора второго типа – *Irs2*, Mm03038438_m1; каталитическая субъединица дельта фосфатидилинозитол-3-киназы – *Pik3cd*, Mm00435674_m1; транспортер глюкозы четвертого типа – *Slc2a4*, Mm01245502_m1; транспортер глюкозы второго типа – *Slc2a2*, Mm00446229_m1. В качестве внутреннего контроля использовали 18srRNA Endogenous Control в жировой ткани, ген бета-актина *Actb* (Mm006007938_s1) в печени и ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Gapdh* (Mm9999915_g1) в мышцах. К 1 мкл кДНК добавляли 1 мкл TaqMan Gene Expression Assays, 8 мкл реакционной смеси, 1 мкл $MgCl_2$ (25 мМ) и 9 мкл воды (mQ). Real-time ПЦР проводили по стандартному протоколу (Applied Biosystems): 50 °С 2 мин, 95 °С 10 мин; 45 циклов – 95 °С 15 с, 60 °С 1 мин.

Определение биохимических показателей крови. Концентрацию инсулина в плазме крови определяли ИФА-методом с помощью коммерческого набора Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Millipore, США) согласно инструкции производителя. Чувствительность метода 0.2 нг/мл, внутри- и межгрупповые коэффициенты вариации 0.92–8.35 и 6.03–17.9 % соответственно.

Концентрации глюкозы, триглицеридов и холестерина в плазме крови определяли ферментативно-колориметрическим методом с использованием коммерческих наборов FluitestGLU, FluitestTG и FluitestHol (Analyticon, Германия) соответственно, согласно инструкции производителя. Чувствительность метода FluitestGLU – 0.08 ммоль/л, внутри- и межгрупповые коэффициенты вариации 0.45–0.67 и 1.46–1.88 % соответственно, чувствительность метода FluitestTG – 0.05 ммоль/л, внутри- и межгруп-

повые коэффициенты вариации 0.70–1.19 и 1.14–1.62 % соответственно, чувствительность метода FluitestTG – 0.05 ммоль/л, внутри- и межгрупповые коэффициенты вариации 0.55–1.32 и 1.06–1.38 % соответственно.

Статистическая обработка результатов. Значения представлены в виде: среднее ± SEM. Результаты обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом (ANOVA) (фактор «пол» (самка и самец) и фактор «возраст» (10 недель и 30 недель)), апостериорные сравнения выборочных средних проводили с помощью теста Дункан (post-hoc Duncan's test).

Результаты

Метаболические показатели у животных разного пола. Дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора «пол» на вес тела ($p < 0.001$), уровень инсулина в крови в сытом состоянии ($p < 0.001$), уровень холестерина в крови в сытом состоянии и после голодания ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно) и на толерантность к глюкозе ($p < 0.01$) (рис. 1–3). Половые различия были в большей степени выражены у взрослых животных: у молодых самок уровень инсулина в сытом состоянии был ниже, а уровень триглицеридов (ТГ) после голодания – выше, чем у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test, в обоих случаях), в сытом состоянии уровень ТГ был повышен в 2.6 раза, однако различия не достигали статистической значимости; у взрослых самок уровни инсулина и холестерина в сытом состоянии, а также ТГ и холестерина после голодания были ниже ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно, post-hoc Duncan's test), тогда как толерантность к глюкозе была выше, чем у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test).

Метаболические показатели у животных разного возраста. Дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора «возраст» на вес тела ($p < 0.001$), печени ($p < 0.01$), уровень глюкозы и ТГ в крови после голодания ($p < 0.001$ и $p < 0.05$ соответственно), а также на толерантность к глюкозе ($p < 0.05$): вес тела и относительный вес печени увеличивались с возрастом; уровень глюкозы в крови после голодания с возрастом снижался; толерантность к глюкозе повышалась (рис. 3 и 4). Степень изменения показателей зависела от пола: увеличение веса тела было более выражено у самцов (8 % самки и 15 % самцы), уровень глюкозы в крови после голодания снижался у самок на 32 %, а у самцов – на 26 % ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно, post-hoc Duncan's test), относительный вес печени и толерантность к глюкозе с возрастом достоверно увеличивались только у самок ($p < 0.01$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test). Кроме того, уровень ТГ в крови у животных после голодания увеличивался с возрастом только у самцов (ANOVA, взаимодействие факторов «пол» × «возраст», $p < 0.01$) (см. рис. 2 и 3), тогда как у самок наблюдалась тенденция к снижению с возрастом показателя НОМА-IR на 41 % ($p = 0.08$, post-hoc Duncan's test).

Влияние фактора «пол» на уровень мРНК исследованных генов зависело от возраста и вида исследованной ткани (рис. 5). В печени показано влияние фактора «пол» на уровни мРНК *Irs2* и *Pik3cd* ($p < 0.01$ в обоих случаях), однако уровень мРНК *Pik3cd* у самок был выше, чем у

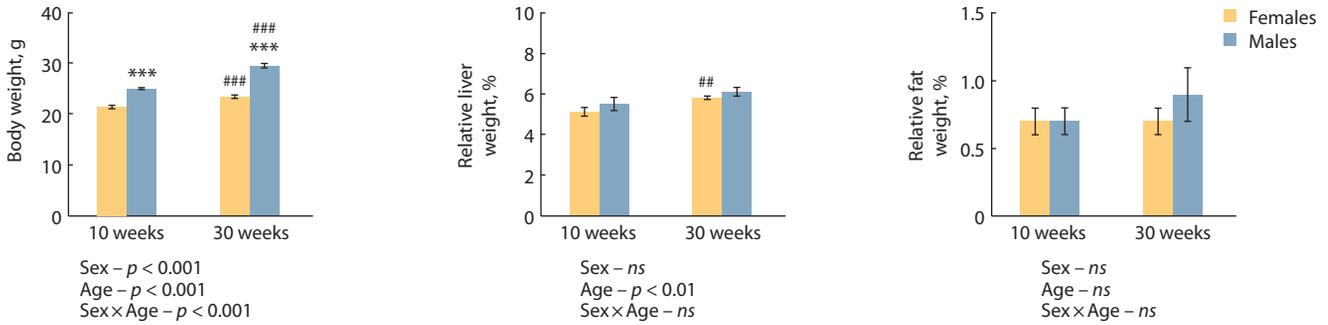


Fig. 1. Body weight and relative weights of liver and abdominal fat in females and males of mouse strain C57BL/6J at the ages of 10 and 30 weeks.

*** $p < 0.001$ vs. females; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

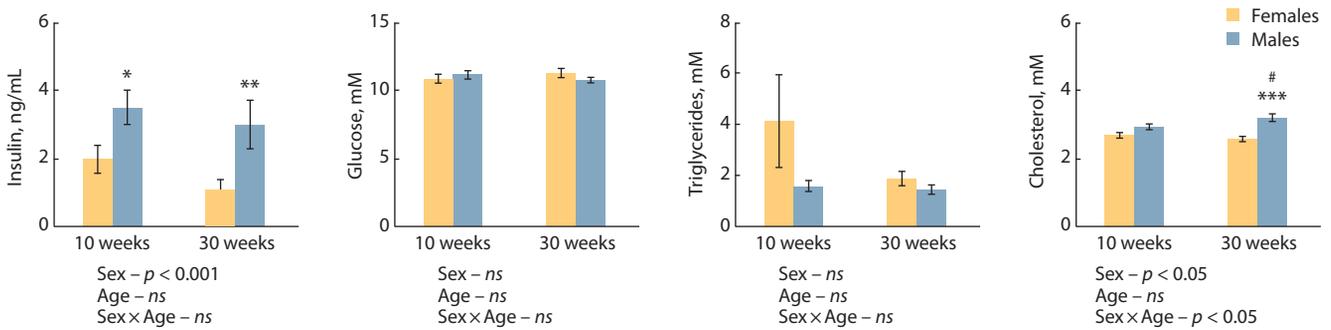


Fig. 2. Blood insulin, glucose, triglycerides, and cholesterol levels in satiate C57BL/6J females and males at the ages of 10 and 30 weeks.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. females; # $p < 0.05$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

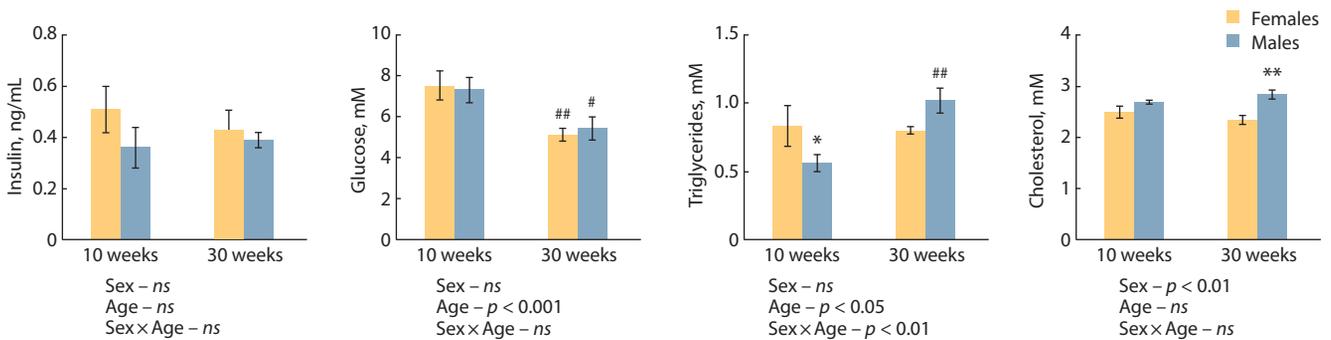


Fig. 3. Blood insulin, glucose, triglycerides, and cholesterol levels in C57BL/6J females and males at the ages of 10 and 30 weeks after overnight fasting.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. females; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

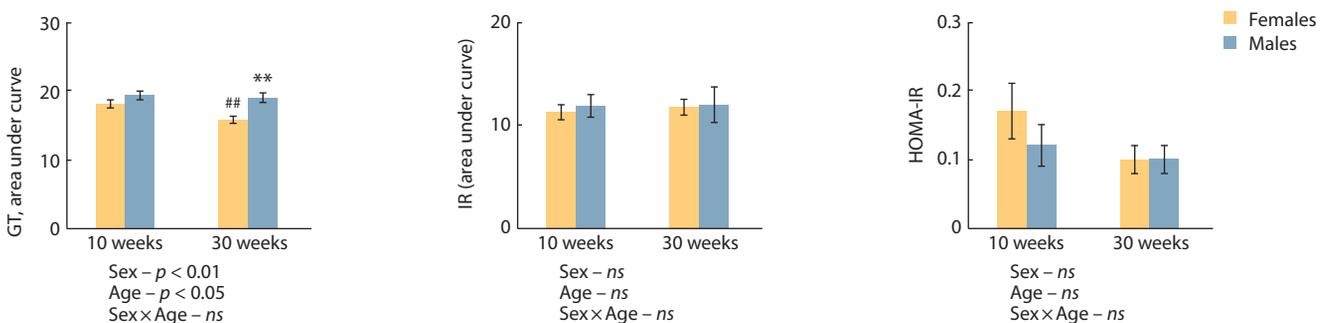


Fig. 4. Glucose tolerance (GT), insulin resistance (IR), and HOMA-IR in C57BL/6J females and males at the ages of 8 and 28 weeks.

** $p < 0.01$ vs. females; ## $p < 0.01$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

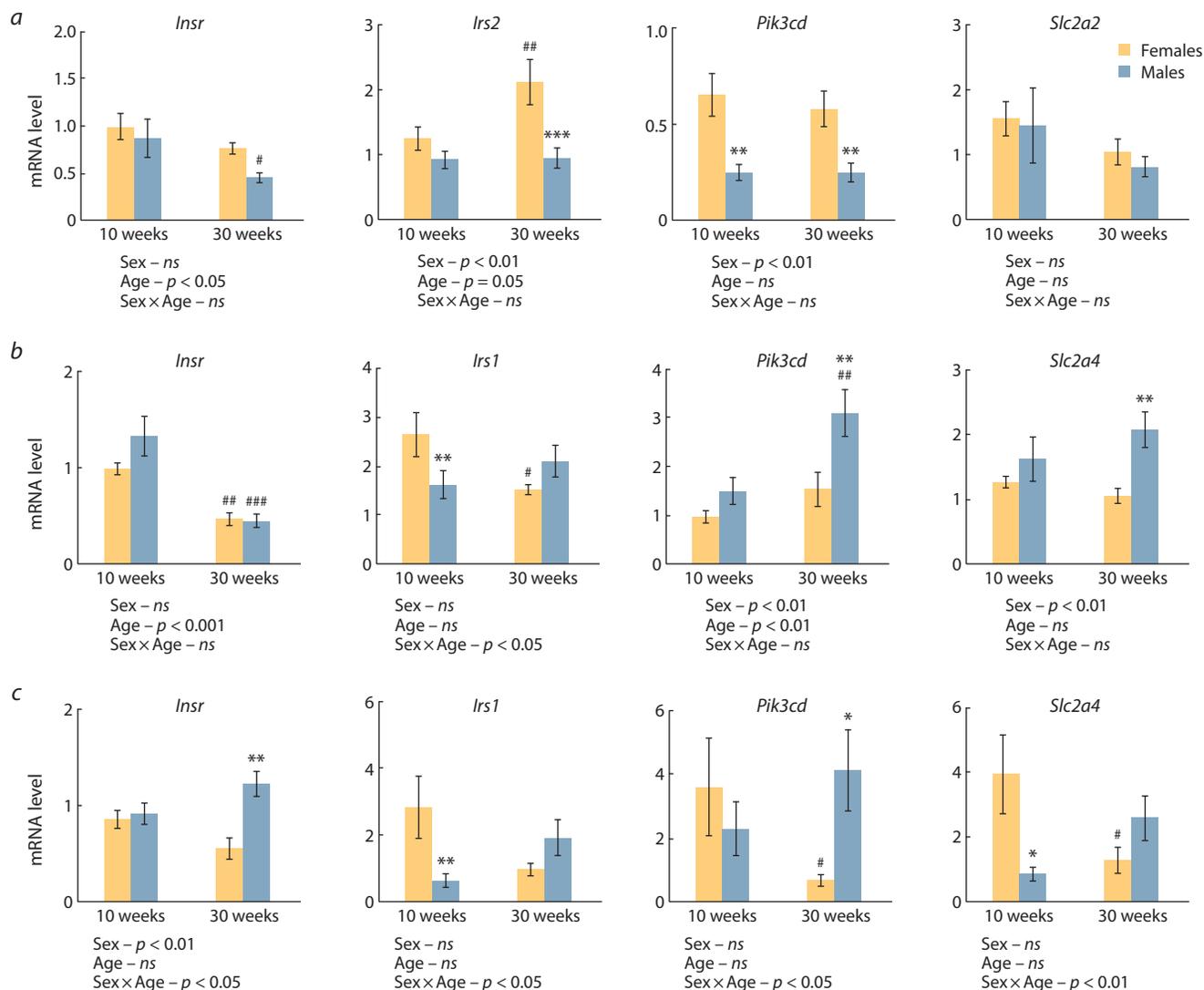


Fig. 5. Levels of *Insr*, *Irs1/2*, *Pik3cd*, and *Slc2a2/4* mRNAs in (a) the liver, (b) muscles, and (c) fat of C57BL/6J mice at the ages of 10 and 30 weeks.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. females; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

самцов, независимо от возраста ($p < 0.01$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test), тогда как уровень мРНК *Irs2* был достоверно выше, чем у самцов, только у взрослых самок ($p < 0.001$, post-hoc Duncan's test). Кроме того, у взрослых самок уровень мРНК *Insr* в печени был в 1.7 раза выше, чем у самцов, но различия не достигали статистической значимости.

В мышечной ткани показано влияние фактора «пол» на уровни мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* ($p < 0.01$ в обоих случаях) – у самок уровни мРНК были ниже, чем у самцов, причем половые различия у взрослых животных были выражены существенно сильнее ($p < 0.01$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test). Кроме того, в мышечной ткани в возрасте 10 недель у самок был повышен, по сравнению с самцами, уровень мРНК *Irs1* ($p < 0.05$, взаимодействие факторов; $p < 0.01$, post-hoc Duncan's test).

В жировой ткани показано влияние фактора «пол» ($p < 0.01$) и взаимодействия факторов «пол» и «возраст»

($p < 0.05$) на уровень мРНК *Insr*, а именно: только в возрасте 30 недель уровень мРНК *Insr* у самок был ниже, чем у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test). Показано также влияние взаимодействия факторов «пол» и «возраст» на уровни мРНК *Irs1*, *Pik3cd* и *Slc2a4* в жировой ткани ($p < 0.05$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно), а именно: у молодых самок уровни мРНК этих генов были повышены по сравнению с самцами (особенно *Irs1* и *Slc2a4* – $p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно, post-hoc Duncan's test), тогда как у взрослых самок снижены (особенно *Pik3cd* – $p < 0.05$, post-hoc Duncan's test).

Изменение уровня мРНК исследованных генов с возрастом. Влияние фактора «возраст» на уровень мРНК исследованных генов существенно зависело от пола животного и вида исследованной ткани (см. рис. 5). В печени показано влияние фактора «возраст» на уровни мРНК *Insr* и *Irs2* ($p < 0.05$ в обоих случаях). У самок в большей степени выражено стимулирующее влияние фактора «воз-

раст» на уровень мРНК в печени, у самцов – ингибирующее, а именно: уровень мРНК *Insr* снижался, особенно у самцов ($p < 0.05$, post-hoc Duncan's test), тогда как уровень мРНК *Irs2* увеличивался в печени только у самок ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test; взаимодействие факторов, $p = 0.07$).

В мышечной ткани показано влияние фактора «возраст» на уровни мРНК *Insr* и *Pik3cd* ($p < 0.001$ и $p < 0.01$ соответственно) и влияние взаимодействия факторов «пол» и «возраст» на уровень мРНК *Irs1* ($p < 0.05$). У самок преобладает ингибирующее влияние фактора «возраст» на уровень мРНК в мышцах, у самцов фактор «возраст» оказывает как ингибирующее, так и стимулирующее воздействие, а именно: уровень мРНК *Insr* снижался с возрастом в равной степени у самок и самцов ($p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно, post-hoc Duncan's test); уровень мРНК *Irs1* в мышцах снижался с возрастом только у самок ($p < 0.05$, post-hoc Duncan's test); уровень мРНК *Pik3cd* достоверно увеличивался с возрастом у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test).

В жировой ткани показано влияние взаимодействия факторов на уровень мРНК всех исследованных генов (*Insr*, *Irs1*, *Pik3cd* – $p < 0.05$; *Slc2a4* – $p < 0.01$). Фактор «возраст» оказывал ингибирующее влияние на уровень мРНК исследованных генов у самок и стимулирующее – у самцов, а именно: у самок уровень мРНК снижался, особенно *Pik3cd* и *Slc2a4* ($p < 0.05$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test), у самцов – повышался, особенно *Pik3cd* ($p < 0.05$, post-hoc Duncan's test).

Обсуждение

Согласно полученным данным, молодые самки и самцы, помимо веса тела, различались по уровням инсулина и ТГ в крови. Уровень инсулина у молодых сытых самок был ниже, чем у самцов, что хорошо согласуется с повышенными уровнями мРНК *Pik3cd* в печени, *Irs1* в мышцах, *Irs1* и *Slc2a4* в жировой ткани сытых самок по сравнению с самцами. Исходя из того, что снижение/повышение уровня мРНК генов белков трансдукции сигнала инсулина может быть молекулярной основой соответственно снижения/повышения чувствительности ткани к инсулину, можно предположить, что у молодых самок в сытом состоянии чувствительность к инсулину всех исследованных тканей выше, чем у самцов. Соответственно, уровень инсулина, который необходим самкам для поддержания эугликемии в сытом состоянии, ниже, чем таковой у самцов. Таким образом, повышенный по сравнению с самцами уровень экспрессии генов белков трансдукции сигнала инсулина в печени, мышцах и жировой ткани у молодых самок может быть молекулярной основой их большей чувствительности к инсулину в сытом состоянии. В то же время уровень ТГ в крови после ночного голодания у молодых самок был незначительно, но достоверно выше по сравнению с самцами, кроме того, у самок почти на 30 % были повышены уровень инсулина и показатель НОМА-IR ($p = 0.08$, post-hoc Duncan's test). В совокупности эти данные свидетельствуют о сниженной чувствительности к инсулину на фоне голода. Для выяснения молекулярного механизма пониженной чувствительности к инсулину у молодых самок при голодании, по-видимому, необходимо

исследовать влияние голодания на уровень экспрессии генов белков трансдукции сигнала инсулина.

Полученные данные о половых различиях сигнальных путей, определяющих чувствительность к инсулину, в целом хорошо согласуются с данными, имеющимися в литературе. Особенности, связанные с полом, по уровню белков INSR, IRS2 и PI3K и их активности, а также по уровню мРНК соответствующих генов в печени у молодых мышей не изучали. Особенности, связанные с полом, по уровню мРНК генов трансдукции сигнала инсулина в мышечной ткани у молодых животных тоже не изучали, однако показано, что в возрасте 15 недель уровень белка INSR в мышцах у самок и самцов мышей C57BL/6J не различается, тогда как уровни белков IRS1, PI3K и GLUT4 у самок выше, чем у самцов (Shelley et al., 2009; Oh et al., 2011). В жировой ткани у самок мышей C57BL/6 в возрасте 15 недель повышены уровни мРНК *Irs1* и *Slc2a4* (Grove et al., 2010), а также белка GLUT4, по сравнению с самцами (Macotela et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о большей чувствительности к инсулину в жировой и мышечной тканях у молодых самок по сравнению с самцами, что совпадает с нашими результатами. При этом, как и в нашем эксперименте, у молодых (13 недель) самок и самцов мышей C57/BL6 толерантность к глюкозе и инсулину не различается (Dakin et al., 2015).

У взрослых животных половые различия по показателям чувствительности к инсулину, согласно нашим данным, усиливались. В сытом состоянии у самок по сравнению с самцами были снижены уровни в крови инсулина и холестерина. Большая чувствительность к инсулину у сытых самок была ассоциирована с повышенными уровнями мРНК *Irs2* и *Pik3cd* в печени, тогда как в мышечной ткани самок по сравнению с самцами были снижены уровни мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4*, а в жировой – уровни мРНК *Insr* и *Pik3cd*. Половые различия по уровню мРНК могут служить молекулярной основой половых различий чувствительности к инсулину: большей чувствительности печени и меньшей – мышц и жировой ткани у взрослых сытых самок по сравнению с самцами. У взрослых самок уровни ТГ и холестерина в крови после ночного голодания были ниже, а толерантность к глюкозе натощак выше, чем у самцов. Поскольку чувствительность к инсулину в печени играет определяющую роль в чувствительности к инсулину целого организма, можно предположить, что у взрослых самок чувствительность к инсулину в печени повышена по сравнению с самцами как в сытом, так и в голодном состоянии. В то же время пониженная чувствительность жировой и мышечной ткани у самок, возможно, объясняет факт отсутствия половых различий по уровню глюкозы в крови у взрослых сытых животных. Согласно данным литературы, влияние пола животного на молекулярный механизм передачи сигнала инсулина у взрослых животных менее изучено. Показано, что в возрасте 24 недель в печени у самок мышей C57BL/6J повышен уровень мРНК *Insr*, а уровень мРНК *Irs1/2* не различается (Spruss et al., 2012). В настоящее время неизвестно, как пол животного влияет на уровень белков INSR, IRS2 и PI3K и их активность в печени у взрослых мышей.

Возрастные изменения чувствительности к инсулину зависели от пола животного: у самок чувствительность к

инсулину в целом повышалась, что подтверждается снижением уровня глюкозы в крови после голодания и повышением толерантности к глюкозе; у самцов – снижалась, о чем свидетельствует повышение уровня холестерина в крови у сытых и уровня ТГ в крови у голодных животных. Снижение чувствительности к инсулину у самцов с возрастом не сопровождалось развитием гипергликемии: уровень глюкозы в крови у сытых животных не отличался от такового у молодых, а после голодания был ниже, чем у молодых, как и у самок. Эти возрастные изменения были ассоциированы у самок с повышением уровня мРНК *Irs2* в печени и со снижением уровней мРНК *Insr* и *Irs1* в мышцах и уровней мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* в жировой ткани. У самцов возрастные изменения чувствительности к инсулину были ассоциированы со снижением уровня мРНК *Insr* в печени и мышечной ткани, тогда как уровень мРНК *Pik3cd* в мышцах и уровни мРНК всех исследованных генов в жировой ткани повышались. Эти изменения могут служить молекулярной основой повышения чувствительности к инсулину в печени и снижения чувствительности к инсулину в мышечной и жировой тканях с возрастом у самок, а также снижения чувствительности к инсулину в печени и мышцах и повышения чувствительности к инсулину в жировой ткани с возрастом у самцов. Следует заметить, что снижение с возрастом уровня мРНК *Insr* в мышцах у самцов, возможно, было компенсировано повышением уровня мРНК *Pik3cd*. Видимо, чувствительность к инсулину в печени в обоих случаях имеет решающее влияние на чувствительность к инсулину организма в целом. У самок чувствительность печени к инсулину с возрастом увеличивается, соответственно повышается чувствительность в целом, тогда как снижение чувствительности к инсулину в мышечной и жировой тканях, возможно, препятствует снижению с возрастом уровня глюкозы в крови у сытых животных. У самцов, наоборот, чувствительность печени с возрастом снижается, соответственно снижается чувствительность в целом, однако толерантность к глюкозе у самцов с возрастом не меняется, что может быть обусловлено компенсаторным повышением чувствительности к инсулину жировой и мышечной ткани. Кроме того, изменение чувствительности к инсулину в жировой и мышечной тканях, возможно, определяет ослабление с возрастом анаболического действия гормона у самок и усиление такового у самцов, что проявляется в большем увеличении веса тела и относительного веса жировой ткани у самцов.

В литературе имеются данные о влиянии возраста на чувствительность к инсулину у старых животных и пожилых людей (Barzilai et al., 2012; Anisimov et al., 2015; Markofski et al., 2015). В более раннем возрасте зависимость чувствительности к инсулину от возраста изучена только у самок. Показано, что в период с 12 по 24 неделю у самок мышей C57BL/6J после ночного голодания снижается уровень глюкозы, снижается (но не достоверно) показатель HOMA-IR, тогда как уровень инсулина, а также толерантность к инсулину не меняются (Radavelli-Bagatinil et al., 2011), что хорошо согласуется с нашими данными. Особенности молекулярного механизма передачи сигнала инсулина, связанные с возрастом, совершенно не изучены.

Исходя из полученных данных можно предположить, что в основе половых различий чувствительности к инсулину в целом, а также повышения с возрастом толерантности к глюкозе у самок лежит активация транскрипции генов, кодирующих белки трансдукции инсулинового сигнала в печени.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-03187, and State Budgeted Project 0324-2016-0002. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akoum S.E., Lamontagne V., Cloutier I., Tanguay J.F. Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011;3:34. DOI 10.1186/1758-5996-3-34.
- Anisimov V.N., Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Egormin P.A., Yurova M.N., Semenchenko A.V., Tyndyk M.L., Panchenko A.V., Trashkov A.P., Vasiliev A.G., Khaitsev N.V. Sex differences in aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice neonatally exposed to metformin. *Cell Cycle.* 2015;14(1):46-55. DOI 10.4161/15384101.2014.973308.
- Barzilai N., Huffman D.M., Muzumdar R.H., Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes.* 2012;61(6):1315-1322. DOI 10.2337/db11-1300.
- Copps K.D., White M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012;55(10):2565-2582. DOI 10.1007/s00125-012-2644-8.
- Dakin R.S., Walker B.R., Seckl J.R., Hadoke P.W., Drake A.J. Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism. *Int. J. Obes. (Lond).* 2015;39(10):1539-1547. DOI 10.1038/ijo.2015.102.
- Ganz M., Csak T., Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J. Gastroenterol.* 2014;20(26):8525-8534. DOI 10.3748/wjg.v20.i26.8525.
- Grove K.L., Fried S.K., Greenberg A.S., Xiao X.Q., Clegg D.J. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int. J. Obes. (Lond).* 2010;34(6):989-1000. DOI 10.1038/ijo.2010.12.
- Hinder L.M., O'Brien P.D., Hayes J.M., Backus C., Solway A.P., Sims-Robinson C., Feldman E.L. Dietary reversal of neuropathy in a murine model of prediabetes and the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 2017;10:717-725. DOI 10.1242/dmm.028530.
- Macotela Y., Boucher J., Tran T.T., Kahn C.R. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes.* 2009;58(4):803-812. DOI 10.2337/db08-1054.
- Markofski M.M., Dickinson J.M., Drummond M.J., Fry C.S., Fujita S., Gundermann D.M., Glynn E.L., Jennings K., Paddon-Jones D., Reidy P.T., Sheffield-Moore M., Timmerman K.L., Rasmussen B.B., Volpi E. Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women. *Exp. Gerontol.* 2015;65:1-7. DOI 10.1016/j.exger.2015.02.015.
- Oh Y.S., Lee T.S., Cheon G.J., Jang I.S., Jun H.S., Park S.C. Modulation of insulin sensitivity and caveolin-1 expression by orchidectomy in a nonobese type 2 diabetes animal model. *Mol. Med.* 2011;17(1-2):4-11. DOI 10.2119/molmed.2009.00105.
- Pettersson U.S., Waldén T.B., Carlsson P.O., Jansson L., Phillipson M. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose

- tissue. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e46057. DOI 10.1371/journal.pone.0046057.
- Radavelli-Bagatini S., Blair A.R., Proietto J., Spritzer P.M., Andrikopoulos S. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. *J. Endocrinol.* 2011;209:307-315. DOI 10.1530/JOE-11-0022.
- Sairam M.R., Wang M., Danilovich N., Javeshghani D., Maysinger D. Early obesity and age-related mimicry of metabolic syndrome in female mice with sex hormonal imbalances. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(7):1142-1154. DOI 10.1038/oby.2006.131.
- Sakamuri A., Pitla S., Putcha U.K., Jayapal S., Pothana S., Vadakkattu S.S., Konapalli N.R., Sakamuri S.S., Ibrahim A. Transient decrease in circulatory testosterone and homocysteine precedes the development of metabolic syndrome features in fructose-fed Sprague Dawley rats. *J. Nutr. Metab.* 2016; Article ID 7510840. DOI 10.1155/2016/7510840.
- Senthil Kumar S.P., Shen M., Spicer E.G., Goudjo-Ako A.J., Stumph J.D., Zhang J., Shi H. Distinct metabolic effects following short-term exposure of different high-fat diets in male and female mice. *Endocr. J.* 2014;61(5):457-470.
- Shelley P., Martin-Gronert M.S., Rowleson A., Poston L., Heales S.J., Hargreaves I.P., McConnell J.M., Ozanne S.E., Fernandez-Twinn D.S. Altered skeletal muscle insulin signaling and mitochondrial complex II-III linked activity in adult offspring of obese mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;297(3):R675-R681. DOI 10.1152/ajpregu.00146.2009.
- Spruss A., Henkel J., Kanuri G., Blank D., Püschel G.P., Bischoff S.C., Bergheim I. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol. Med.* 2012;18(1):1346-1355. DOI 10.2119/molmed.2012.00223.
- Tripathy D., Carlsson A.L., Lehto M., Isomaa B., Tuomi T., Groop L. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic subgroups: studies in the prediabetic and diabetic state. *Diabetologia*. 2000;43(12):1476-1483. DOI 10.1007/s0012500515508.