

Гендер-специфическое влияние мутации A^y у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах

Е.Н. Макарова , Е.И. Денисова, В.В. Кожевникова, А.Е. Кулешова

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

Ожирение матерей в период беременности повышает риск возникновения ожирения у потомства. Для разработки методов коррекции развития потомства у матерей, страдающих метаболическими расстройствами, необходимо изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние материнской среды на онтогенез потомства. Уровень лептина повышается при ожирении. У мышей линии C57Bl мутация A^y вызывает повышение уровня лептина в крови самок во время беременности и оказывает гендер-специфическое влияние на метаболический фенотип потомства в зрелости. Целью работы было изучить влияние мутации A^y на склонность к развитию диетарного ожирения у мужского и женского потомства, на массу плодов и плацент и экспрессию генов в плацентах плодов разного пола. Оценивали массу тела и потребление пищи у мужского и женского потомства A^y/a и a/a (контроль) самок при содержании на стандартной диете и диете, индуцирующей ожирение, массу плодов и плацент на 13-й и 18-й дни беременности и экспрессию генов транспортеров глюкозы (GLUT1, GLUT3), нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2, SNAT4), инсулиноподобного фактора роста 2 IGF2 и его рецептора IGF2R в плацентах плодов мужского и женского пола. Мутация A^y влияла на массу тела только у мужского потомства при содержании на стандартной диете и не оказывала влияния на развитие ожирения у потомства обоего пола. Масса плодов и плацент у A^y/a по сравнению с a/a самками была снижена на 13-й день беременности и не различалась на 18-й день. На 13-й день беременности уровень мРНК исследованных генов в плацентах мужских и женских плодов не различался у a/a самок. У A^y/a самок экспрессия генов, кодирующих GLUT1, GLUT3, SNAT1 и SNAT4, была снижена в плацентах плодов женского пола по сравнению с плацентами плодов мужского пола. Полученные результаты позволяют предполагать, что зависящий от пола плодов транскрипционный ответ плацент на повышенный уровень лептина у беременных A^y/a самок может опосредовать гендер-специфическое влияние мутации A^y на метаболизм потомства в постнатальной жизни.

Ключевые слова: мутация A^y ; лептин; плацента; плод; мыши; экспрессия генов.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Макарова Е.Н., Денисова Е.И., Кожевникова В.В., Кулешова А.Е. Гендер-специфическое влияние мутации A^y у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):406-414. DOI 10.18699/VJ18.376

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Makarova E.N., Denisova E.I., Kozhevnikova V.V., Kuleshova A.E. Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):406-414. DOI 10.18699/VJ18.376 (in Russian)

Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice

E.N. Makarova , E.I. Denisova, V.V. Kozhevnikova, A.E. Kuleshova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Obesity during pregnancy increases the risk of obesity in offspring. To correct the offspring development in obese mothers, it is necessary to reveal the molecular mechanisms that mediate the influence of the maternal environment on the offspring ontogenesis. Leptin levels increase with obesity. In C57Bl mice, the A^y mutation is associated with elevated blood levels of leptin in pregnant females and exerts a gender-specific effect on the metabolic phenotype of mature offspring. Aim: to study the influence of A^y mutation on sensitivity to diet-induced obesity in male and female offspring, on fetal and placental weight and on the expression of genes in the placentas of the fetuses of different sexes. Body weight and food intake on a standard and an obesogenic diet, fetal and placental weights on pregnancy days 13 and 18, and gene expression of glucose transporters (GLUT1, GLUT3), neutral amino acid transporters (SNAT1, SNAT2, SNAT4), insulin-like growth factor 2 IGF2 and its receptor IGF2R were measured in male and female offspring of a/a (control) and A^y/a mothers. A^y mutation influenced the body weight only in male offspring, which consumed a standard diet, and did not influence obesity development in both male and female offspring. The weight of fetuses and placentas in A^y/a as compared to a/a females was reduced on day 13 of pregnancy and was not different on day 18. On day 13 of pregnancy, the mRNA levels of the examined genes did not differ in placentas of male and female fetuses in a/a females. In A^y/a females, the gene expression of GLUT1, GLUT3, SNAT1 and SNAT4 was reduced in female placentas compared to male placentas. The results suggest that the sex-specific transcription response of placentas to elevated leptin levels in pregnant A^y/a females can mediate the gender-specific impact of A^y mutation on the offspring metabolism in postnatal life.

Key words: A^y mutation; leptin; placenta; fetus; mice; gene expression.

Согласно гипотезе DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), причины, определяющие склонность к развитию хронических заболеваний, лежат в условиях пренатального и раннего постнатального периода жизни особей (Wadhwa et al., 2009; Hoffman et al., 2017). Показано, что недостаточное и избыточное питание, ожирение, диабет в период беременности ассоциированы с повышенным риском возникновения ожирения и связанного с ним диабета 2-го типа у потомства (Vickers, 2014). Это диктует необходимость коррекции развития потомства на ранних этапах жизни у матерей, страдающих метаболическими расстройствами. Для разработки подходов к такой коррекции необходимо изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние материнской среды на метаболический фенотип потомства.

Основную роль в формировании материнской внутриутробной среды играет плацента (Sferruzzi-Perri, Camm, 2016). Онаставляет питательные вещества и факторы роста развивающимся плодам, а транспортная и сигнальная функции плацент определяют скорость роста плодов и массу тела у новорожденных (Grillo et al., 2008; Coan et al., 2010; Sferruzzi-Perri, Camm, 2016). В свою очередь масса новорожденных является маркером их дальнейшего здоровья, поскольку как слишком низкая, так и слишком большая масса при рождении ассоциированы с повышенным риском развития кардиометаболических заболеваний в зрелости (Vickers, 2014). Предполагается, что метаболические нарушения у матерей сопровождаются изменениями в биохимическом составе крови, а также в структуре и функции плацент, что приводит к эпигенетическим модификациям у плода, влияющим на экспрессию генов и дальнейшее развитие (McKay, Mathers, 2011; Vickers, 2014; Bale, 2015; Desai et al., 2015). Однако молекулярные механизмы программирования развития мало исследованы (Bale, 2015) и требуют дальнейшего изучения как у людей, так и на лабораторных моделях.

Как правило, изменения в составе крови, сопровождающие ожирение, включают в себя повышение уровней гормона жировой ткани лептина, инсулина и глюкозы, изменение липидного профиля (Бажан и др., 2005). Вклад каждого из этих факторов в программирующее влияние материнского ожирения на метаболизм потомства мало изучен. На лабораторных моделях показано, что повышенный уровень лептина у матерей во время беременности оказывает влияние на углеводно-жировой обмен у потомства в зрелости, и это влияние может по-разному проявляться у особей разного пола (Pennington et al., 2012; Makarova et al., 2013). Механизмы, посредством которых материнский лептин влияет на развитие плодов, не исследованы. Возможно, он действует на функциональную активность плацент, поскольку в плацентах обнаружена высокая плотность рецепторов к лептину (Hoggard et al., 1997). У мышей мутация *yellow* в локусе агути (*A^y*) вызывает эктопическую экспрессию белка агути, что приводит к формированию желтой окраски, повышенному потреблению пищи и развитию ожирения с возрастом (Bultman et al., 1992). Ранее мы показали, что самки мышей линии C57Bl с мутацией *A^y* (генотип *A^y/a*), которые вступают в размножение на начальных стадиях развития

ожирения, отличаются от самок этой линии (генотип *a/a*) повышенным потреблением пищи в первую неделю беременности, немного большей массой тела и примерно вдвое более высоким уровнем лептина в крови в период беременности и ничем не отличаются по метаболическим показателям в период лактации (Makarova et al., 2010). Это позволяет рассматривать *A^y* мышей как модель для изучения программирующего влияния гиперлептинемии матерей, характерной для особей с избыточной массой жира (Frederich et al., 1995), на метаболические признаки у потомства при отсутствии у беременных самок выраженного ожирения. В этой модели мы обнаружили, что при содержании на стандартной диете мужское потомство *A^y/a* самок отличается по некоторым метаболическим признакам (массе тела, чувствительности к лептину) от мужского потомства *a/a* самок, тогда как на женское потомство генотип матери не оказывает влияния (Makarova et al., 2013). Полученные данные позволяют предполагать, что гиперлептинемия у беременных самок может по-разному влиять на развитие мужского и женского потомства, и использовать эту модель для изучения механизмов гендер-специфического программирования развития в пренатальный период жизни.

Гендер-специфическое влияние материнской среды может быть опосредовано тем, что плаценты плодов разного пола по-разному реагируют на изменения в составе материнской крови (Gallou-Kabani et al., 2010; Mao et al., 2010; Gabory et al., 2012). Возможно, повышенный во время беременности уровень лептина у *A^y* самок влияет на функциональную активность плацент, и это влияние зависит от пола плодов.

Целью данной работы было изучение влияния мутации *A^y*, вызывающей повышение уровня лептина в период беременности, на склонность к развитию диетарного ожирения у потомства разного пола, а также на массу плодов и плацент и экспрессию генов транспортеров глюкозы (GLUT1, GLUT3), нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2 и SNAT4) и ростовых факторов (инсулиноподобный фактор роста 2 IGF2 и его рецептор IGF2R) в плацентах плодов мужского и женского пола.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились в соответствии с международными Европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) и Российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными.

В экспериментах использовали мышей линии C57Bl/6J стандартного агути генотипа (*a/a*) и мышей этой линии, несущих мутацию *yellow* в локусе агути (*A^y/a* генотип), из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Мышей содержали при световом режиме 12 ч свет : 12 ч темнота и свободном доступе к воде и гранулированному корму для конвенционального содержания и разведения (ЗАО «Ассортимент-Агро», Сергиев Посад, Россия).

В возрасте 8–9 недель самок спаривали с самцами в реципрокных скрещиваниях *a/a* × *A^y/a* и *A^y/a* × *a/a*, дающих *a/a* и *A^y/a* потомство в отношении 1:1. Покрытие регистрировали по вагинальной пробке, день обнаружения пробки

считали нулевым днем беременности. После покрытия самок переводили на индивидуальное содержание.

Для измерения массы плацент и плодов *a/a* и *A^y/a* самок умерщвляли смещением шейных позвонков на 13-й либо на 18-й день беременности, извлекали матку с плодами, помещали ее на охлажденную платформу, высвобождали плоды и плаценты и взвешивали плаценты и плоды на 13-й день беременности на торсионных весах (размерность шкалы до 0.5 мг), а плоды на 18-й день беременности на электрических весах (размерность шкалы до 10 мг). Пол плодов на 18-й день беременности определяли визуально по наличию семенников или матки, на 13-й день беременности у плодов забирали образцы ткани печени и помещали их в жидкий азот для дальнейшего определения пола методом ПЦР. На 13-й день беременности забирали образцы тканей плацент для определения экспрессии генов и помещали их в жидкий азот. Массу плодов и плацент подсчитывали для самок с количеством плодов шесть или семь (12 *a/a* и 13 *A^y/a* самок на 13-й день беременности и 13 *a/a* и 18 *A^y/a* самок на 18-й день беременности).

Для оценки влияния агутти-генотипа самок на метаболический фенотип потомства регистрировали дату родов и размер помета. День родов считали первым днем постнатальной жизни, у самок с пометом из шести или семи детенышей (всего 12 самок *a/a* и 15 самок *A^y/a* генотипов) взвешивали мышат в день 1, 7, 14, 21, 28 постнатальной жизни, генотип детенышей определяли на 7-й день, пол – на 14-й. На 28-й день после рождения детенышей отсаживали, по одной самке и одному самцу *a/a* генотипа из каждого помета содержали индивидуально в течение 12 недель (с 4 по 16 неделю постнатальной жизни) на стандартном корме, еженедельно измеряли массу тела и количество потребленного корма. Начиная с 16-й недели половину животных содержали на стандартной диете, другую половину переводили на сладко-жирную диету, для чего к стандартному корму добавляли семя подсолнечника в кожуре, сдобное сладкое печенье и свиное сало, продолжая еженедельно измерять массу и количество потребленного стандартного корма. Через 8 недель содержания на диете (с 16 по 24 неделю жизни) животных подвергали декапитации, собирали образцы крови в пробирки с ЭДТА, оценивали количество внутрибрюшинного жира. В образцах плазмы крови измеряли концентрации лептина и глюкозы.

Концентрацию лептина в плазме крови измеряли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора (R&D Systems, Миннеаполис, США), концентрацию глюкозы – коммерческим набором Fluitest GLU (Analyticon Biotechnologies AG, Лихтенфельс, Германия), следуя инструкциям производителя.

Определение пола плодов на 13-й день беременности. Пол плодов определяли с помощью ПЦР с геномной ДНК с детекцией продукта в агарозном геле с использованием праймеров SX_F, 5'-GATGATTTGAGTGGAAATGTGAG GTA-3'; SX_R, 5'-CTTATGTTTATAGGCATGCACCATG TA-3' (McFarlane et al., 2013). В ходе реакции амплифицировались фрагменты псевдоаутосомных генов *Sly* (сцеплен с Y-хромосомой, дает один фрагмент размером 280 п. н.) и *Xlr* (сцеплен с X-хромосомой, дает два фрагмента длиной 685 и 480 п. н.) (рис. 1). ДНК выделяли из печени

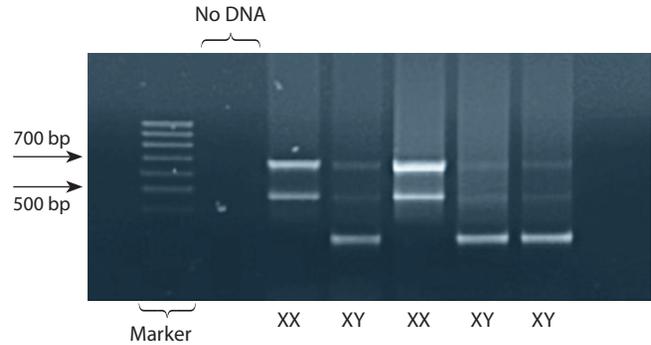


Fig. 1. Electrophoresis of amplification products of *Sly* and *Xlr* gene fragments.

плодов солевым методом по протоколу, предложенному в (Aljanabi, Martinez, 1997).

Для оценки экспрессии генов в плацентах выбрали по шесть самок каждого генотипа с примерно равным представительством плодов мужского и женского пола. Для каждой из отобранных самок формировали две пробы РНК, объединенные по полу плодов, для чего объединяли по отдельности РНК из плацент плодов мужского и женского пола так, чтобы представительство РНК из каждого образца было одинаковым.

Уровень мРНК генов в плацентах определяли методом относительной оценки с помощью обратной транскрипции и полимеразно-цепной реакции в реальном времени (Relative quantitation real-time PCR). Из образцов плацент выделяли РНК с использованием реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA («Евроген», Москва, Россия), согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV обратной транскриптазы («Евроген») и олиго-dT праймера по протоколу производителя.

ПЦР проводили на приборе Applied Biosystems®, ViiA™ 7 согласно инструкции с помощью готовой реакционной смеси qPCRmix-HS LowROX («Евроген») и реагентов фирмы Applied Biosystems: TaqMan Gene Expression Assay для генов мыши (*Igf2*, Mm00439564_m1; *Igf2R*, Mm00439576_m1; *Slc2a1* (*Glut1*), Mm00441480_m1; *Slc2a3* (*Glut3*), Mm00441483_m1; *Slc38a1* (*SNAT1*), Mm00506391_m1; *Slc38a2* (*SNAT2*), Mm00628416_m1; *Slc38a4* (*SNAT4*), Mm00459056_m1; *ObRb-LepR*, Mm00440181_m1) с использованием β-актина в качестве эндогенного контроля (TaqMan endogenous controls with FAM dye label and MGB mouse β-actin (*ACTB*)). Относительную экспрессию подсчитывали по пороговому циклу амплификации (относительный СТ-метод).

Статистическая обработка. Для оценки влияния генотипа самок мышей на потребление пищи и изменения массы тела у потомства с возрастом использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с градациями факторов: «генотип матери» (*a/a*, *A^y/a*), «пол» потомства, «возраст» (5–16 недель), с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью post-hoc критерия Дункана. Далее использовали двухфакторный дисперсионный анализ отдельно для самцов и самок мышей с градациями факторов «генотип матери» и «возраст». Влияние генотипа самок

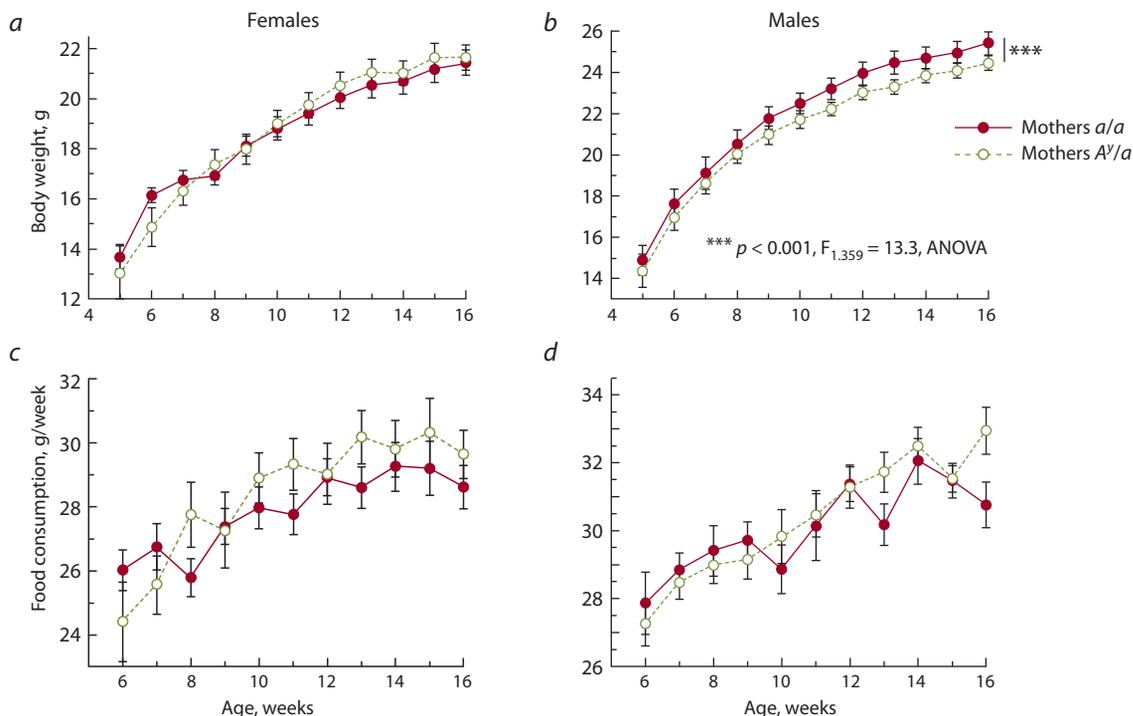


Fig. 2. Effect of the agouti phenotype on body weight and food consumption in the male and female progeny after weaning. Hereafter data are shown as $M \pm SEM$.

мышей на развитие ожирения у потомства оценивали с помощью дисперсионного анализа с градациями факторов «генотип матери», «пол», «диета» для параметров крови и доли жира; «генотип матери», «время содержания на диете» (16–24 недели) и «диета» по отдельности у мужского и женского потомства для массы тела. Массу плодов и плацент и экспрессию генов в плацентах анализировали с помощью ANOVA с градациями факторов «генотип матери» и «пол». Для выявления межгрупповых различий по необходимости использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты на графиках представлены в виде значений среднего \pm ошибка среднего.

Результаты

Влияние агутти генотипа самок на рост детенышей в период материнской опеки, массу тела и потребление пищи после отъема от матерей с 4 по 16 неделю жизни и развитие диет-индуцированного ожирения

Генотип самок не оказывал влияния на рост потомства в период материнской опеки. Детеныши, рожденные самками a/a и A^y/a генотипов, не различались по массе тела с 1-го по 28-й день жизни.

Генотип самок не оказывал влияния на потребление пищи ни у мужского, ни у женского потомства (рис. 2, в, г), но оказывал отсроченное, зависящее от пола влияние на массу тела после отъема от матерей. У женского потомства, полученного от a/a и A^y/a самок, масса тела не различалась (см. рис. 2, а). У мужского потомства генотип матери оказывал достоверное влияние на массу тела с 5 по 16 недели жизни ($p < 0.001$, $F_{1,359} = 13.3$, 2-way ANOVA)

(см. рис. 2, б): потомство A^y/a матерей обладало меньшей массой тела, чем потомство a/a матерей. Отношение потребления пищи к массе тела было повышенным у мужского потомства A^y/a матерей по сравнению с мужским потомством a/a матерей ($p < 0.01$, $F_{1,305} = 9.97$, 2-way ANOVA).

Сладко-жирная пища вызывала развитие ожирения как у самцов ($p < 0.000^*$, $F_{1,234} = 55.85$), так и у самок ($p < 0.000^*$, $F_{1,445} = 53.5$, 3-way ANOVA) (рис. 3). Кроме того, у самцов выявлено достоверное взаимодействие факторов материнского генотипа и диеты ($p < 0.05$, $F_{1,234} = 4.25$), что свидетельствует о различном влиянии материнского генотипа на массу тела самцов при содержании на разных диетах: генотип матери оказывал достоверное влияние на массу тела только при содержании на стандартной диете ($p < 0.05$, $F_{1,116} = 4.7$) (см. рис. 3) и не оказывал влияния при содержании на сладко-жирной пище. У женского потомства генотип матери не оказывал достоверного влияния на массу тела ни на стандартной диете, ни на сладко-жирной пище.

Содержание внутрибрюшинного жира, концентрации лептина и глюкозы в крови возрастали при ожирении ($p < 0.01$ для всех, $F_{1,52} = 16.7$, $F_{1,42} = 7.7$, $F_{1,43} = 22.8$ для жира, лептина и глюкозы соответственно). Эти показатели не зависели от генотипа матери и пола (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у мышей мутация A^y , вызывающая хроническую гиперлептемию при беременности, оказывает зависящее от пола программирующее влияние на метаболический фенотип потомства и не предрасполагает потомство к развитию алиментарного ожирения.

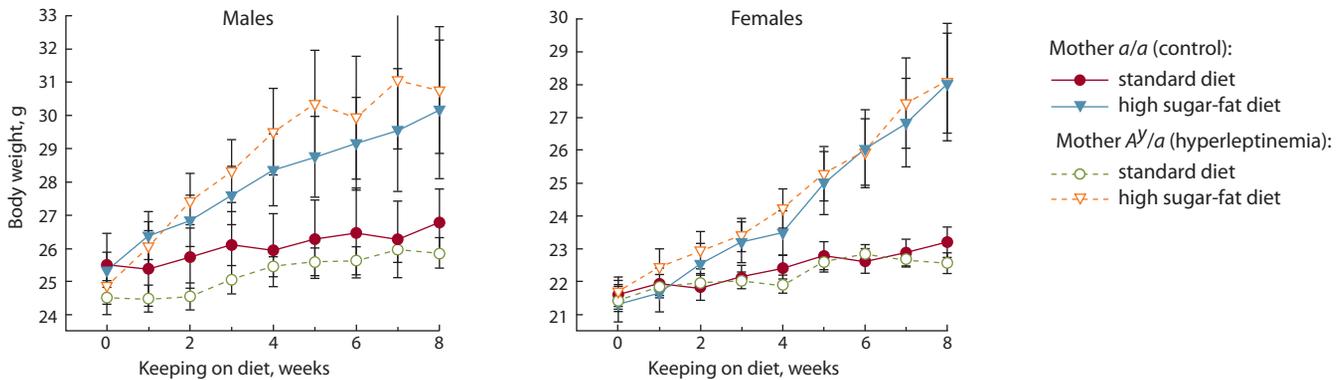


Fig 3. Effect of the agouti phenotype on the development of diet-induced obesity in the male and female progeny in maturity.

Table 1. Effect of sugar-fat diet on the amount of visceral fat and concentrations of leptin and glucose in blood plasma of the male and female progeny of *a/a* and *A^y/a* female mice

Parameter	Female progeny				Male progeny			
	Standard diet		High sugar-fat diet		Standard diet		High sugar-fat diet	
	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>
Fat, g	0.3±0.0 (7)	0.3±0.1 (5)	1.1±0.2 (8)	1.8±0.8 (6)	0.4±0.1 (7)	0.3±0.1 (5)	1.2±0.5 (6)	1.1±0.4 (8)
Fat, %	1.4±0.1 (7)	1.5±0.3 (5)	4.2±0.8 (8)	5.3±2.0 (6)	1.6±0.4 (7)	1.3±0.2 (5)	3.7±1.2 (6)	3.5±0.6 (8)
Leptin, ng/mL	2.9±0.7 (6)	1.8±0.3 (5)	7.4±2.3 (8)	15.2±6.3 (6)	2.9±0.9 (6)	2.0±0.7 (5)	4.6±1.8 (5)	5.8±0.7 (7)
Glucose, mM	8.9±0.2 (7)	8.5±0.9 (5)	11.8±0.7 (8)	10.5±0.8 (6)	8.5±0.7 (6)	9.9±0.8 (5)	12.0±1.7 (5)	12.8±0.9 (7)

The results are shown as M ± SEM, numbers of cases are shown in parentheses.

Table 2. Effect of the *A^y* mutation of the weights of female mice, fetuses, and placentas of days 13 and 18 of gestation

Weight	<i>a/a</i>		<i>A^y/a</i>	
	Day 13	Day 18	Day 13	Day 18
Body, g	27.0±0.65 (11)	31.1±1.1 (13)	26.7±0.53 (13)	32.8±1.0 (18)
Male fetuses, mg	140.4±4.7 (22)	1081±20 (37)	127.0±2.4 (31)*	1100±20 (54)
Female fetuses, mg	132.6±2.9 (36)	1067±16 (46)	124.7±2.8 (41)	1097±16 (60)
Male placentas, mg	96.7±3.9 (24) [^]	116.6±6.4 (37)	87.0±4.2 (31) ^{^*}	120.0±4.3 (54) [^]
Female placentas, mg	84.7±2.5 (37)	104.0±3.7 (46)	80.8±2.8 (41)*	104.2±3.0 (60)

* $p < 0.05$ (post-hoc Duncan test), *A^y/a* as compared to *a/a*; [^] $p < 0.05$ (post-hoc Duncan test), males compared to females.

The results are shown as M ± SEM, numbers of cases are shown in parentheses.

Влияние мутации *A^y* на массу плодов и плацент

Самки *a/a* и *A^y/a* генотипов не различались по массе тела ни на 13-й, ни на 18-й день беременности. Они не отличались также друг от друга по массе плодов и плацент на 18-й день беременности. На 13-й день беременности масса плодов обоих полов и их плацент у *A^y/a* самок была ниже, чем у контрольных самок ($p = 0.001$, $F_{1,126} = 11.2$ для плодов; $p < 0.05$, $F_{1,129} = 4.2$ для плацент) (табл. 2). У *A^y/a* по сравнению с *a/a* самками масса мужских плодов была снижена на 9.6 %, масса их плацент – на 10 %, масса женских плодов – на 6 %, масса их плацент – на 4.6 %. Плоды мужского и женского пола не различались по массе, тогда как плаценты плодов мужского пола весили больше плацент плодов женского пола и на 13-й, и на 18-й день бе-

ременности ($p < 0.01$, $F_{1,129} = 7.4$ на 13-й день; $F_{1,193} = 10.8$ на 18-й день беременности) (см. табл. 2).

Экспрессия генов в плацентах

Поскольку генотип самки оказывал выраженное влияние на массу плодов только на 13-й день беременности, мы решили оценить экспрессию генов в плацентах именно на этом сроке. Рост плодов зависит от интенсивности транспорта питательных веществ через плаценту и от сигнальных факторов, секретируемых плацентами в кровь плодов. Поэтому в плацентах мы оценивали уровни мРНК генов, кодирующих переносчики глюкозы (GLUT1, GLUT3), переносчики нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2, SNAT4), а также уровни мРНК генов, кодирующих IGF2,

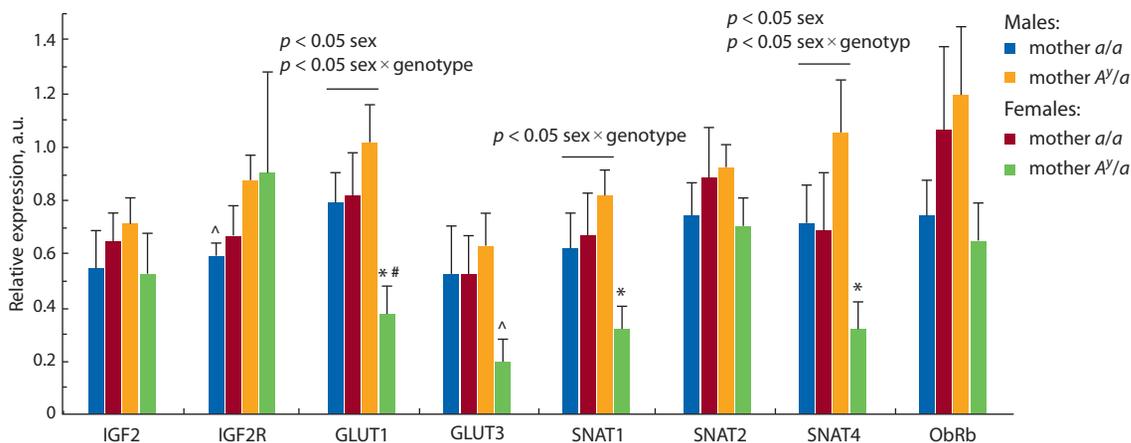


Fig. 4. Effect of the A^y mutation in mice on the expression of genes for transport and signaling proteins in placentas of male and female embryos on day 13 of gestation.

* $p < 0.05$ between male and female placentas in A^y/a mothers (post-hoc Duncan test); # $p < 0.05$ between female placentas in A^y/a and a/a mothers (post-hoc Duncan test); ^ $p < 0.05$ (Student's t test) between male and female placentas in A^y/a mothers for GLUT3 and between male placentas in A^y/a and a/a mothers for IGF2R.

который усиливает процессы роста в плаценте и у плода, и IGF2R – рецептора к IGF2, при связывании с которым комплекс лиганд-рецептор интернализуется и разрушается внутри клетки, вследствие чего снижается активность IGF2. Результаты представлены на рис. 4.

Дисперсионный анализ выявил достоверное взаимодействие факторов материнского генотипа и пола плодов на экспрессию генов, кодирующих GLUT1, SNAT1 и SNAT4 ($p < 0.05$ для всех, $F_{1,20} = 6.56$ для GLUT1, $F_{1,20} = 4.9$ для SNAT1, $F_{1,20} = 4.36$ для SNAT4). Если у контрольных самок уровень мРНК этих генов не различался в плацентах плодов мужского и женского пола, то у A^y/a самок экспрессия этих генов была достоверно ниже в плацентах плодов женского пола по сравнению с плацентами плодов мужского пола. Кроме того, сравнение межгрупповых средних по критерию Стьюдента показало, что у A^y/a самок экспрессия GLUT3 в плацентах плодов женского пола была ниже, чем в плацентах плодов мужского пола, а экспрессия гена рецептора к IGF2 в плацентах плодов мужского пола была выше у A^y/a самок по сравнению с a/a самками. Полученные результаты показывают, что мутация A^y оказывает влияние на экспрессию плацентарных генов, регулирующих рост плодов, и это влияние зависит от пола плодов.

Обсуждение

Данное исследование было предпринято для того, чтобы оценить влияние мутации A^y у мышей на склонность к развитию ожирения у потомства разного пола и для проверки предположения, что гендер-специфическое влияние мутации на метаболический фенотип потомства может быть связано с различающейся в зависимости от пола плодов реакцией плацент на изменения материнской среды, вызванные этой мутацией.

Результаты подтвердили полученные ранее данные о том, что мутация оказывает гендер-специфическое отсроченное влияние на метаболизм потомства: снижает массу тела только у мужского потомства при содержании в

стандартных условиях (Makarova et al., 2013). Поскольку в период беременности A^y/a самки отличаются от a/a самок повышенным уровнем лептина и не различаются по другим биохимическим показателям крови (кортикостерон, глюкоза, инсулин) (Makarova et al., 2010), мы предполагаем, что отсроченные материнские воздействия связаны с влиянием именно лептина на развивающееся потомство. Ранее нами установлено, что однократное введение лептина в конце беременности снижает массу тела у потомства на стандартной диете (Makarova et al., 2013). В исследованиях других авторов тоже обнаружено, и в генетической модели, и при введении лептина, что гиперлептинемия при беременности сопровождается меньшей массой у потомства, причем у крыс масса была снижена только у женского потомства (Nilsson et al., 2003), а у мышей – вне зависимости от пола (Pollock et al., 2015). Меньшая масса тела у мужского потомства A^y/a самок по сравнению с потомством a/a самок наблюдалась при одинаковом потреблении пищи, что предполагает более интенсивный расход энергии у этих животных. В работе на мышах показано (Pollock et al., 2015), что гиперлептинемия беременности ассоциирована с повышенной двигательной активностью у потомства. Возможно, у мужского потомства A^y/a самок тоже повышена двигательная активность, этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Гиперлептинемия у самок с мутацией A^y не повлияла на исследованные нами метаболические характеристики у потомства при развитии ожирения на сладко-жирной диете. Эти результаты отличаются от данных, полученных другими авторами в экспериментах на мышах и крысах. У крыс введение лептина в конце беременности и в период лактации подавляло развитие ожирения, индуцированного диетой, у потомства обоих полов (Stocker et al., 2007). У мышей повышенный уровень лептина у беременных $db/+$ самок мышей и введение лептина в течение всей беременности и первых дней после родов снижали массу тела у потомства на диете, индуцирующей ожирение (Pollock et al., 2015), не изменяя при этом

процентного содержания жира (Talton et al., 2016), что говорит о влиянии материнского лептина на линейный рост потомства, а не на развитие ожирения как такового. Несовпадение результатов по реакции потомства на диету, индуцирующую ожирение, в нашей модели и в моделях, использованных другими авторами (Pollock et al., 2015), может быть обусловлено особенностями проведения экспериментов, такими как состав диеты или концентрации лептина в крови самок на разных сроках беременности и лактации. В целом результаты подтверждают положение о том, что повышенный уровень лептина в крови у беременных самок не предрасполагает потомство к развитию ожирения, индуцированного диетой, и указывают на то, что материнский лептин может по-разному воздействовать на развитие мужского и женского потомства.

Механизмы программирующего действия лептина практически не изучены. Поскольку скорость роста плодов отражает множественные влияния материнской среды, мы оценили массу плодов у *a/a* и *A^y/a* самок на разных стадиях беременности. Оказалось, что мутация меняет динамику роста плодов: замедляет скорость роста плодов в первые две трети беременности (на 13-й день масса плодов была снижена), а затем, по-видимому, плоды демонстрируют догоняющий рост (в конце беременности масса плодов уже не различалась). По немногочисленным литературным данным, материнский лептин может снижать массу плодов: введение лептина во второй половине беременности снижало массу плодов у мышей (Yamashita et al., 2001) и массу новорожденных крысят (Stocker et al., 2007).

Пропорциональное снижение массы плацент и плодов указывает на то, что уменьшение физических размеров плацент может быть основной причиной замедления роста плодов. К 13-му дню беременности у мышей зона лабиринта, где осуществляется транспорт питательных веществ из крови матери в кровь плода, составляет уже значительную часть плаценты (примерно треть) (Coan et al., 2004), и уменьшение этой зоны может существенным образом сказаться на поставке нутриентов развивающимся плодам. Механизмы влияния лептина на физическое состояние плацент требуют дальнейшего изучения. Возможно, лептин подавляет ангиогенез в плацентах, поскольку в экспериментах *in vitro* было показано, что лептин снижает секрецию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) клетками цитотрофобласта (Islami et al., 2003).

Ответ со стороны плодов на изменение уровня лептина в материнской крови может зависеть от чувствительности плацент к действию лептина. В работе (Yamashita et al., 2001) показано, что введение лептина снижает массу плодов и плацент только у мышей дикого типа и не влияет на гетерозигот по мутации *db*, несущих одну дозу гена рецептора к лептину. На 13-й день беременности масса плацент у *A^y/a* самок была снижена, а на 18-й день – не различалась, хотя повышенный уровень лептина у *A^y/a* самок наблюдается на обоих сроках беременности. Можно предположить, что с ростом уровня лептина в крови у *A^y/a* самок развивается резистентность к его действию в плацентах. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

Кроме влияния на физические размеры плацент, повышение уровня лептина у *A^y/a* самок сопровождалось

изменением экспрессии генов транспортеров питательных веществ и сигнальных факторов в плацентах. Введение лептина в первой половине беременности самкам мышей, ограниченным в потреблении белков, вызывало изменения транскриптома в плацентах (Schulz et al., 2012), что указывает на возможность непосредственного влияния материнского лептина на транскрипционные процессы в плацентах. Гендер-специфическое воздействие мутации *A^y* на метаболические признаки у потомства может быть связано с разным транскрипционным ответом плацент у плодов мужского и женского пола на изменения уровня лептина в материнской крови.

Нами обнаружены яркие проявления полового диморфизма по массе плацент у самок обоих генотипов и по экспрессии генов в плацентах у *A^y/a* самок. Мутация *A^y* дифференцирует плаценты плодов разного пола по экспрессии некоторых генов, в основном за счет снижения экспрессии в плацентах плодов женского пола. Снижение экспрессии генов, кодирующих переносчики глюкозы и аминокислот, может быть одной из причин уменьшения массы плодов женского пола. Однако масса плодов мужского пола также была снижена. При этом в плацентах плодов мужского пола у *A^y/a* самок была повышена экспрессия гена, кодирующего IGF2R. Этот рецептор связывается с IGF2 и транспортирует его в лизосомы, таким образом снижая уровень IGF2 во внеклеточном пространстве (Wutz et al., 2001). Повышение экспрессии IGF2R может приводить к снижению уровня IGF2 в плацентах мужских плодов, что может быть причиной снижения массы мужских плодов, поскольку IGF2 стимулирует рост плодов (DeChiara et al., 1990). Кроме того, отсутствие различий в массе плодов разного пола, возможно, связано с развитием компенсаторных механизмов. Наличие таких механизмов продемонстрировано в работах, в которых исследовалось изменение экспрессии IGF2 и транспортеров глюкозы и аминокислот в плацентах. Показано, что в ответ на снижение уровня экспрессии гена IGF2 в плацентах происходит компенсаторное усиление вторичного транспорта аминокислот, опосредованного белками-переносчиками системы А (Constância et al., 2005), и наоборот – в ответ на усиление экспрессии IGF2 происходит снижение экспрессии транспортера глюкозы GLUT3 и транспортера нейтральных аминокислот SNAT4 (Angiolini et al., 2011).

Гендер-специфический ответ со стороны плацент на материнские воздействия является хорошо установленным феноменом. У мышей плаценты плодов разного пола по-разному отвечали на материнское ожирение (Kim et al., 2014), диету матерей (Gallou-Kabani et al., 2010; Mao et al., 2010; Gabory et al., 2012), гипоксию (Cuffe et al., 2014), изменение гормонального фона (Cuffe et al., 2011, 2012). Однако вопрос о молекулярных механизмах, лежащих в основе этого явления, до настоящего времени не исследован и ждет своего разрешения.

Несмотря на то что масса плацент и плодов у *A^y/a* самок была снижена независимо от пола плодов и экспрессия генов была изменена также в плацентах плодов обоего пола, отсроченные влияния генотипа матери на метаболические признаки были обнаружены только у мужского потомства. Скорее всего, это связано с выбором изученных признаков. Для самок наиболее значимым признаком с эволюционной

точки зрения является плодовитость. Возможно, агути генотип самок влияет на параметры плодовитости у женского потомства, но этот вопрос до сих пор не изучался.

Закключение

У мышей мутация *A^y*, вызывающая гиперлептинемии в период беременности, оказывает зависящее от пола влияние на метаболический фенотип потомства в зрелости, влияет на массу плацент и динамику роста плодов, а также вызывает различия по экспрессии генов сигнальных и транспортных белков в плацентах плодов мужского и женского пола в середине беременности. Можно предположить, что гендер-специфическое влияние *A^{y/a}* генотипа самок мышей на метаболические признаки у потомства связано с тем, что развивающаяся у таких самок гиперлептинемия по-разному влияет на экспрессию генов сигнальных и транспортных белков в плацентах плодов разного пола.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 14-04-00694a and 17-04-01357a, and State Budgeted Project 0324-2018-0016. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals was supported by project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:4692-4693.
- Angiolini E., Coan P.M., Sandovici I., Iwajomo O.H., Peck G., Burton G.J., Sibley C.P., Reik W., Fowden A.L., Constância M. Developmental adaptations to increased fetal nutrient demand in mouse genetic models of *Igf2*-mediated overgrowth. *FASEB J.* 2011;25:1737-1745.
- Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16(6):332-344. DOI 10.1038/nrn3818.
- Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Baginskaia N.V., Shevchenko A.Iu., Makarova E.N. Changes of lipid-carbohydrate metabolism during development of melanocortin obesity in the mice with the Agouti yellow mutation. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal.* 2005;91(12):1445-1453. (in Russian)
- Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 1992;71:1195-1204.
- Coan P.M., Ferguson-Smith A.C., Burton G.J. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol. Reprod.* 2004;70(6):1806-1813.
- Coan P.M., Vaughan O.R., Sekita Y., Finn S.L., Burton G.J., Constancia M., Fowden A.L. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J. Physiol.* 2010;588:527-538.
- Constância M., Angiolini E., Sandovici I., Smith P., Smith R., Kelsey G., Dean W., Ferguson-Smith A., Sibley C.P., Reik W., Fowden A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(52):19219-19224.
- Cuffe J.S., Dickinson H., Simmons D.G., Moritz K.M. Sex specific changes in placental growth and MAPK following short term maternal dexamethasone exposure in the mouse. *Placenta.* 2011;32(12):981-989. DOI 10.1016/j.placenta.2011.09.009.
- Cuffe J.S., O'Sullivan L., Simmons D.G., Anderson S.T., Moritz K.M. Maternal corticosterone exposure in the mouse has sex-specific effects on placental growth and mRNA expression. *Endocrinology.* 2012;153(11):5500-5511. DOI 10.1210/en.2012-1479.
- Cuffe J.S., Walton S.L., Singh R.R., Spiers J.G., Bielefeldt-Ohmann H., Wilkinson L., Little M.H., Moritz K.M. Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. *J. Physiol.* 2014;592(14):3127-3141. DOI 10.1113/jphysiol.2014.272856.
- DeChiara T.M., Efstratiadis A., Robertson E.J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990;45:78-80.
- Desai M., Jellyman J.K., Ross M.G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int. J. Obes. (Lond).* 2015;39(4):633-641. DOI 10.1038/ijo.2015.13.
- Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Löllmann B., Lowell B.B., Flier J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* 1995;1:1311-1314.
- Gabory A., Ferry L., Fajardy I., Jouneau L., Gothié J.D., Vigé A., Fleur C., Mayeur S., Gallou-Kabani C., Gross M.S., Attig L., Vambergue A., Lesage J., Reusens B., Vieau D., Remacle C., Jais J.P., Junien C. Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One.* 2012;7(11):e47986. DOI 10.1371/journal.pone.0047986.
- Gallou-Kabani C., Gabory A., Tost J., Karimi M., Mayeur S., Lesage J., Boudadi E., Gross M.S., Taurelle J., Vigé A., Breton C., Reusens B., Remacle C., Vieau D., Ekström T.J., Jais J.P., Junien C. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One.* 2010;5(12):e14398. DOI 10.1371/journal.pone.0014398.
- Grillo M.A., Lanza A., Colombatto S. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids.* 2008;34:517-523.
- Hoffman D.J., Reynolds R.M., Hardy D.B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr. Rev.* 2017;75(12):951-970. DOI 10.1093/nutrit/nux053.
- Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., Mercer J.G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94(20):11073-11078.
- Islami D., Bischof P., Chardonnes D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol. Hum. Reprod.* 2003;9(7):395-398. DOI 10.1093/molehr/gag053.
- Kim D.W., Young S.L., Grattan D.R., Jasoni C.L. Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol. Reprod.* 2014;90:130. DOI 10.1095/biolreprod.113.117259.
- Makarova E.N., Chepeleva E.V., Panchenko P.E., Bazhan N.M. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;305:R1268-R1280.
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Shevchenko A.Y., Bazhan N.M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in *A^{y/a}* mice. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2010;198(2):169-177. DOI 10.1111/j.1748-1716.2009.02046.x.
- Mao J., Zhang X., Sieli P.T., Falduto M.T., Torres K.E., Rosenfeld C.S. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(12):5557-5562.
- McFarlane L., Truong V., Palmer J.S., Wilhelm D. Novel PCR assay for determining the genetic sex of mice. *Sex. Dev.* 2013;7:207-211. DOI 10.1159/000348677.
- McKay J.A., Mathers J.C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2011;202(2):103-118. DOI 10.1111/j.1748-1716.2011.02278.x.
- Nilsson C., Swolin-Eide D., Ohlsson C., Eriksson E., Ho H.P., Björntorp P., Holmäng A. Reductions in adipose tissue and skeletal growth

- in rat adult offspring after prenatal leptin exposure. *J. Endocrinol.* 2003;176:13-21.
- Pennington K.A., Harper J.L., Sigafos A.N., Belfa L.M., Carleton S.M., Phillips C.L., Schulz L.C. Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice. *Endocrinology.* 2012;153:4556-4567.
- Pollock K.E., Stevens D., Pennington K.A., Thaisrivongs R., Kaiser J., Ellersieck M.R., Miller D.K., Schulz L.C. Hyperleptinemia during pregnancy decreases adult weight of offspring and is associated with increased offspring locomotor activity in mice. *Endocrinology.* 2015;156:3777-3790.
- Schulz L.C., Schlitt J.M., Caesar G., Pennington K.A. Leptin and the placental response to maternal food restriction during early pregnancy in mice. *Biol. Reprod.* 2012;87(5):120. DOI 10.1095/biolreprod.112.103218.
- Sferruzzi-Perri A.N., Camm E.J. The programming power of the placenta. *Front. Physiol.* 2016;7:33. DOI 10.3389/fphys.2016.00033.
- Stocker C.J., Wargent E., O'Dowd J., Cornick C., Speakman J.R., Arch J.R., Cawthorne M.A. Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292:R1810-R1818.
- Talton O.O., Pennington K.A., Pollock K.E., Bates K., Ma L., Ellersieck M.R., Schulz L.C. Maternal hyperleptinemia improves offspring insulin sensitivity in mice. *Endocrinology.* 2016;157:2636-2648.
- Vickers M.H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients.* 2014;6(6):2165-2178. DOI 10.3390/nu6062165.
- Wadhwa P.D., Buss C., Entringer S., Swanson J.M. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 2009;27(5):358-368. DOI 10.1055/s-0029-1237424.
- Wutz A., Theussl H.C., Dausman J., Jaenisch R., Barlow D.P., Wagner E.F. Non-imprinted *Igf2r* expression decreases growth and rescues the *Tme* mutation in mice. *Development.* 2001;128(10):1881-1887.
- Yamashita H., Shao J., Ishizuka T., Klepcyk P.J., Muhlenkamp P., Qiao L., Hoggard N., Friedman J.E. Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous *Lepr^{db/+}* mice: effects on placental leptin and fetal growth. *Endocrinology.* 2001;142:2888-2897.