

Г. Г. Ковшик<sup>1</sup>, М. В. Храпова<sup>2</sup>, М. И. Душкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт физиологии СО РАМН  
ул. Акад. Тимакова, 4, Новосибирск, 630117, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН  
ул. Бориса Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089, Россия

E-mail: livelogos@mail.ru

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ: ПОИСК ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К МЕТАБОЛИЧЕСКОМУ СИНДРОМУ

Изучено генетически детерминированное разнообразие проявлений признаков метаболического синдрома (МС) у мышей инбредных линий. Работа проведена на мышцах-самцах 9 инбредных линий в возрасте 3–4 мес. Базальный уровень глюкозы крови определяли электрохимическим способом с помощью глюкометра. Уровень систолического и диастолического артериального давления устанавливали неинвазивным методом с помощью прибора CODA Monitor фирмы Kent Scientific (США). Уровень общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности и триглицеридов определяли энзиматическим фотоколориметрическим методом с помощью стандартных наборов. Определить одну линию мышей, проявляющую все признаки МС, не удалось. Выявлены 4 линии мышей, каждая из которых демонстрировала отдельные признаки МС: Agouti Yellow – нарушение толерантности к глюкозе, повышенная масса тела и гипертриглицеридемия; C57BL/6 – нарушение толерантности к глюкозе и гиперхолестеринемия; линия DD – повышенная масса тела и артериальная гипертензия; линия DBA/2 – предрасположенность к развитию атеросклероза.

*Ключевые слова:* инбредные линии мышей, липидный спектр крови, толерантность к глюкозе, артериальное давление.

Метаболический синдром (МС) представляет собой широко распространенный в индустриально развитых странах симптомокомплекс, который включает в себя так называемый «смертельный квартет»: инсулинорезистентность и нарушение толерантности к глюкозе, ожирение, высокое артериальное давление и дислипидемию (повышенный уровень триглицеридов (ТГ) и низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛВП)). Эта патология носит пандемический характер. По различным данным, МС встречается в США приблизительно у 30 % населения, а в Российской Федерации этим заболеванием страдает около 20 % лиц [1]. МС у человека рассматривается как следствие нарушения питания, а не как генетическая предрасположенность.

Широкое распространение МС в современном обществе делает необходимым изучение патофизиологических механизмов его

развития и эффектов воздействия фармакологических агентов для рассмотрения последующих перспектив в терапии больных с этим заболеванием. Данные исследования требуют создания животных моделей, имитирующих развитие МС у человека [2; 3]. Подобного рода модели существуют и представлены животными различных видов и генетических вариаций. Одной из них является модель генетической предрасположенности крыс к ожирению (WNIN / Ob) с повышенной активностью в подкожной жировой ткани 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 1-го типа – фермента, трансформирующего глюкокортикоиды из неактивной формы в физиологически активную. Вследствие гиперактивности фермента происходит нарушение жирового и углеводного обменов, что в итоге приводит к развитию ожирения и других признаков МС [4]. К широко распространенным моделям с ге-

нетически детерминированными признаками МС относятся мыши с дефицитом лептина [5]. Дефицит гормона, воздействующего на центр голода (ob / ob мыши, мутация в промоторной области obese-гена), связан с нарушением физиологического процесса насыщения. Мыши db / db характеризуются дефицитом рецептора к лептину (мутация LEPR-гена) [6]. Однако мутантные линии животных представляют собой частный случай развития сложного симптомокомплекса МС, связанного с мутацией в конкретном гене. В то же время известно, что патогенез МС у человека обусловлен большим количеством разнообразных механизмов, а не мутацией в единичном гене.

**Цель** исследования – изучить генетически детерминированное разнообразие проявлений признаков МС у мышей инбредных линий.

### Материал и методы

Работа проведена на самцах мышей 9 инбредных линий (DD, GR, BALB/c, C57BL/6, DBA/2, CC57Br, CBA, A/Sn, Agouty yellow) в возрасте 3–4 мес., полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Животные содержались группами по 8–10 особей на стандартной диете «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия). Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977, и с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС).

Уровень систолического и диастолического артериального давлений (АД) определяли неинвазивным методом с помощью прибора CODA-Monitor («Kent-Scientific», США).

Базальный уровень глюкозы крови определяли утром натощак (лишение корма на протяжении 18–20 ч) электрохимическим способом с помощью глюкометра «One Touch Horizon» («LifeScan», США). При проведении теста толерантности к глюкозе мышам внутрибрюшинно вводили 10 % раствор глюкозы из расчета 250 мкл на 10 г массы тела. Измерение уровня глюкозы крови проводили через 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы.

Содержание липидов сыворотки крови определяли утром натощак. Для этого животных умерщвляли путем быстрой декапитации с последующим забором крови и получением сыворотки крови путем ее центрифугирования (3 000 г, 30 мин). Образцы замораживали при температуре  $-64^{\circ}\text{C}$  и хранили не более 7 дней.

Уровень общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности и триглицеридов определяли энзиматическим фотокolorиметрическим методом с помощью стандартных наборов «Ольвекс-диагностикум» (Россия) в 96-луночных планшетах на планшетном ридере «ELx808» при длине волны 450 нм.

Для проведения анализа всех полученных результатов использовались программы Origin 7.5 и Statistica 6.0. Для статистической обработки результатов применялся однофакторный дисперсионный анализ (One way ANOVA).

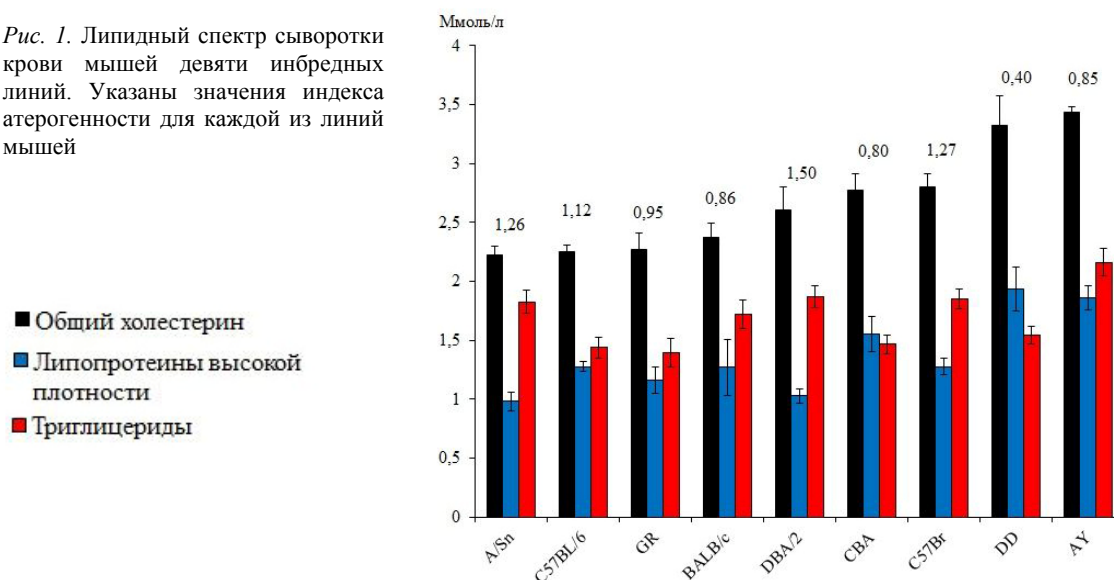
### Результаты исследования и обсуждение

Базальный уровень глюкозы крови достоверно различался у мышей девяти исследованных линий ( $F_{8,65} = 16,23966$ ,  $p < 0,001$ ) (см. таблицу). Самый высокий уровень глюкозы крови натощак был у мышей линии AY, наиболее низкий наблюдался у мышей линий DBA/2 и C57BL/6. При этом у мышей AY уровень глюкозы был в 2,2 раза выше, чем у мышей DBA/2 и C57BL/6. У животных остальных линий базальный уровень глюкозы был в пределах нормы (3,1–4,2 ммоль/л). Тест толерантности к глюкозе выявил следующее: через 30 мин после введения глюкозы наибольшие значения уровня данного углевода в крови показали линии CC57Br, BALB/c, C57BL/6 и CBA. У мышей линии CBA глюкоза крови достигла максимального значения только через 60 мин и в 6,5 раз превышала базальный уровень. У мышей линий CC57Br, C57BL/6 и BALB/c через 60 мин глюкоза в крови начала снижаться. Через 120 мин после введения раствора у линии CBA выявлено наивысшее значение показателя, которое превышало базальное в 2,8 раза. Также высокое содержание глюкозы в крови через 120 мин после введения наблюдалось у линий AY, A/Sn и C57BL/6, а наименьшее значение – у грызунов линий GR, CC57Br и DD.

## Результаты теста толерантности к глюкозе у мышей исследованных линий, ммоль/л

Линия мышей	n	Уровень глюкозы			
		базальный	через 30 мин	через 60 мин	через 120 мин
DBA/2	9	2,78 ± 0,16	12,53 ± 0,98	11,13 ± 0,82	7,47 ± 0,27
C57BL/6	8	2,81 ± 0,09	22,41 ± 1,93	16,20 ± 1,70	8,3 ± 0,97
A/Sn	4	3,05 ± 0,08	11,45 ± 0,98	13,57 ± 0,99	8,32 ± 1,13
CC57Br	12	3,16 ± 0,17	24,39 ± 0,94	17,41 ± 0,94	5,86 ± 0,46
BALB/c	8	3,32 ± 0,39	22,63 ± 1,48	15,8 ± 1,65	6,46 ± 0,43
DD	8	3,58 ± 0,10	10,13 ± 0,44	10,01 ± 0,52	6,16 ± 0,38
CBA	10	3,76 ± 0,17	19,30 ± 1,13	24,33 ± 2,24	10,74 ± 0,87
GR	7	4,02 ± 0,26	12,61 ± 1,30	10,57 ± 1,1	5,02 ± 0,25
Agouti Yellow	8	6,01 ± 2,98	16,01 ± 0,83	15,68 ± 1,52	8,85 ± 0,74

Рис. 1. Липидный спектр сыворотки крови мышей девяти инбредных линий. Указаны значения индекса атерогенности для каждой из линий мышей



Исследованные линии мышей также различались по показателям липидного спектра крови: по общему уровню холестерина ( $F_{8,61} = 8,34977$ ,  $p < 0,001$ ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) ( $F_{8,61} = 7,66372$ ,  $p < 0,001$ ), триглицеридов ( $F_{8,61} = 6,59566$ ,  $p < 0,001$ ). Наибольшее содержание общего холестерина и холестерина ЛПВП в крови было у мышей AY (3,43 и 1,85 ммоль/л соответственно) и DD (3,32 и 1,93 ммоль/л соответственно). Наименьшее значение обоих показателей выявлено у мышей A/Sn: 2,22 и 0,98 ммоль/л соответственно. Показатели индекса атерогенности установлены: максимальные значения показали мыши линий DBA/2, CC57Br, A/Sn и C57BL/6, низкие значения – у мышей DD,

CBA и AY. Содержание триглицеридов в крови было максимальным у мышей AY (2,16 ммоль/л), DBA/2 (1,87 ммоль/л), CC57Br (1,85 ммоль/л), A/Sn (1,82 ммоль/л) и минимальным у мышей GR (1,39 ммоль/л), C57BL/6 (1,43 ммоль/л). Полученные данные представлены на рис. 1.

Артериальное давление, как систолическое, так и диастолическое, достоверно различалось у мышей исследованных линий ( $F_{8,68} = 3,54069$ ,  $p < 0,01$  и  $F_{8,68} = 3,13211$ ,  $p < 0,01$  соответственно); данные продемонстрированы на рис. 2. Наибольшие значения систолического АД показали следующие линии: DD (151 мм рт. ст.), C57BL/6 (149 мм рт. ст.), CC57Br (138 мм рт. ст.), BALB/c (136 мм рт. ст.). Наибольшие значения диа-

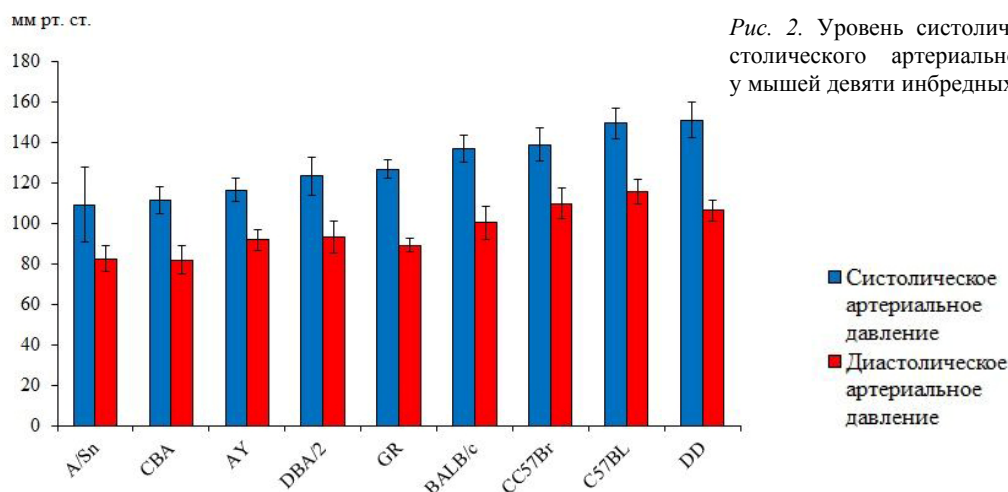


Рис. 2. Уровень систолического и диастолического артериального давления у мышей девяти инбредных линий

столического АД выявлены у грызунов линий C57BL/6 (115 мм рт. ст.), CC57Br (109 мм рт. ст.), DD (106 мм рт. ст.), BALB/c (100 мм рт. ст.). Более низкие величины АД показали следующие линии: систолическое – A/Sn (109 мм рт. ст.), CBA (111 мм рт. ст.); диастолическое – A/Sn (82 мм рт. ст.), CBA (82 мм рт. ст.), AY (91 мм рт. ст.).

Итак, полученные результаты свидетельствуют о том, что у исследуемых линий мышей сочетание всех четырех признаков МС не наблюдалось. Более того, повышенное АД не проявлялось одновременно с остальными признаками МС. Наиболее близкой к модели МС линией является Agouti Yellow, у которой выявлена гипертриглицеридемия, повышенная масса тела и инсулинорезистентность. Однако АД у мышей этой линии было в пределах нормы: систолическое АД 116 мм рт. ст. Полученные сведения соответствуют данным литературы [7] об использовании линии Agouti Yellow как модели ожирения, гиперинсулинемии, инсулинорезистентности, гипергликоземии, гиперлептинемии. Механизмы ожирения у этой линии связаны со стимуляцией синтеза жирных кислот и триглицеридов путем кальций-зависимого механизма. Считается, что повышение уровня инсулина является фактором, стимулирующим липогенез. Кроме того, недавно показано, что линия AY характеризуется лептиновой резистентностью, которая развивается в результате нарушения проникновения лептина в мозг через гематоэнцефалический барьер [8].

Из девяти исследованных линий мышей выделена линия DBA/2 с высоким индексом атерогенности как линия, предрасположенная к развитию атеросклероза. Наши данные также соответствуют данным литературы, которые показали, что апоЕ-дефицитная линия на генетической основе DBA/2 в 16 раз более чувствительна к образованию атеросклеротических бляшек по сравнению с апоЕ-дефицитными мышами на генетической основе линии AKR [9]. Эта чувствительность, вероятно, обусловлена низким уровнем ЛПВП и относительно высоким уровнем триглицеридов в крови. Однако нарушения толерантности к глюкозе, повышенного АД и ожирения у мышей этой линии не наблюдалось.

C57BL/6 является родительской линией мышей AY и проявляется нарушением толерантности к глюкозе, повышением АД и относительно высоким уровнем индекса атерогенности. Известно, что содержание животных этой линии на жировой диете приводит к гипергликемии (7,7 ммоль/л для стандартной диеты и 10,2 ммоль/л для жировой диеты), повышению массы тела, дислипидемии (гиперхолестеринемии). Кроме того, мыши этой линии более подвержены атеросклерозу при жировой диете [10; 11]. В дополнение, мутация рецептора Vcam1 на эндотелии сосудов у этой линии делала ее более подверженной атеросклерозу [12].

Линия мышей DD демонстрировала самые высокие показатели систолического АД среди всех животных и оказалась третьей по

величине установленного диастолического АД. Однако эта линия характеризуется высоким уровнем ЛПВП, отсутствием нарушения толерантности к глюкозе. С другой стороны, обнаружена резистентная к метаболическим нарушениям линия BALB/c. При длительном кормлении мышей этой линии жировой диетой они оказались резистентными к развитию ожирения, демонстрировали относительно низкий уровень глюкозы крови (9,6 ммоль/л) и высокие уровни мРНК PPAR-alpha в печени и В-окисления жирных кислот [13].

На основании полученных результатов мы предположили возможность разделить линии мышей по характерным для них признакам МС. Для линии Agouti Yellow характерно нарушение толерантности к глюкозе, повышенная масса тела и гипертриглицеридемия. Линия мышей C57BL/6 характеризуется нарушением толерантности к глюкозе и гиперхолестеринемией. Линия DD демонстрировала признаки артериальной гипертензии и повышения массы тела. Линия мышей DBA/2 оказалась склонной к развитию атеросклероза.

### Заключение

На основании проведенных исследований выделить единственную универсальную линию мышей, наиболее полно проявляющую все признаки МС, не удалось. Тем не менее эти признаки могут быть по отдельности смоделированы на описанных четырех линиях мышей, которые могут применяться в исследовании в зависимости от направления действия изучаемого фармакологического агента. Инбредные линии животных, по всей видимости, отражают целостный механизм развития МС на уровне всего организма, а не одной конкретной генетической мутации. Такой механизм развития МС может включать сложный комплекс метаболических нарушений и компенсаторных реакций.

### Список литературы

1. Колопкова Т. А., Блинова В. В., Скворцов Ю. И. Метаболический синдром X-пан-демия XXI века // Саратов. науч.-мед. журн. 2008. № 3. С. 130–134.

2. Bertram C. E., Hanson M. A. Animal Models and Programming of the Metabolic Syndrome // Br. Med. Bul. 2001. Vol. 60. P. 103–121.

3. Panchal S. K., Brown L. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research // J. Biomed. Biotechnol. 2011. Vol. 1. P. 1–14.

4. Sakamuri S. S. Vara P., Anamthathmakula P., Chodavarapu P. K., Sirisha J. R., Nappan V. G., Ayyalasomayajula V. A Novel Genetically-Obese Rat Model with Elevated 11beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity in Subcutaneous Adipose Tissue // Lip. Health Dis. 2010. Vol. 9. P. 132–137.

5. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M. Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue // Nature. 1994. Vol. 372. P. 425–432.

6. Lee G. H., Proenca R., Montez J. M., Carroll K. M., Darvishzadeh J. G., Lee J. I., Friedman J. M. Abnormal Splicing of the Leptin Receptor in Diabetic Mice // Nature. 1996. Vol. 379. P. 632–635.

7. Miltenberger R. J., Mynatt R. L., Wilkinson J. E., Woychik R. P. The Role of The Agouti Gene in the Yellow Obese Syndrome // J. Nutr. 1997. Vol. 127, № 9. P. 1902–1907.

8. Pan W., Hsueh H., He Y., Sakharakar A., Cain C., Yu C., Kastin A. J. Astrocyte Leptin Receptor (ObR) and Leptin Transport in Adult-Onset Obese Mice // Endocrinol. 2008. Vol. 149, № 6. P. 2798–2806.

9. Smith J. D., Peng D. Q., Dansky H. M., Settle M., Baglione J., Goff W. L., Chakrabarti E., Xu Y., Peng X. Transcriptome Profile of Macrophages From atherosclerosis-Sensitive and Atherosclerosis-Resistant Mice // Mammalian Genome. 2006. Vol. 17, № 3. P. 220–229.

10. Schreyer S. A., Wilson D. L., LeBoeuf R. C. C57BL/6 Mice Fed High Fat Diets as Models for Diabetes-Accelerated Atherosclerosis // Atherosclerosis. 1998. Vol. 1, № 136. P. 17–24.

11. Kabani C. G., Vige A., Gross M. S., Rabe's J. P., Boileau C., Larue-Achagiotis C., Tome D., Jais J. P., Junien C. C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat Diet Delineate Components of Metabolic Syndrome // Obesity. 2007. Vol. 15, № 8. P. 1996–2005.

12. Miyoshi T., Yuan Z., Shi W. Association of a Vcam1 Mutation with Atherosclerosis Susceptibility in Diet-Induced Models of Athe-

rosclerosis // *Atherosclerosis*. 2008. Vol. 1, № 196. P. 234–239.

13. *Haramizu S., Nagasawa A., Ota N., Hase T., Tokimitsu I.* Different Contribution of Muscle and Liver Lipid Metabolism to Endur-

ance Capacity and Obesity Susceptibility of Mice // *J. Appl. Physiol.* 2009. Vol. 106. P. 871–879.

*Материал поступил в редколлегию 02.06.2011*

**G. G. Kovshik, M. V. Khrapova, M. I. Dushkin**

**METABOLIC PHENOTYPES OF INBRED MOUSE STRAINS:  
SEARCHING FOR METABOLIC SYNDROME SUSCEPTIBILITY**

Study was investigation of metabolic syndrome symptoms genetically caused diversity in inbred mouse strains. Male mice of nine inbred strains were the object of the study. Fasting blood glucose level was measured after 18–20 hour food deprivation electrochemically with One Touch Horizon glucometer. Systolic and diastolic arterial blood pressure level was measured noninvasively by CODA Monitor device (Kent Scientific Inc., USA). Total cholesterol, high density cholesterol and triglycerides levels were measured by «Olvex Diagnosticum» standard kits (Russia) in the way of enzymatic method in 96-well plate. The only one mouse strain which could show all of the metabolic syndrome profiles have not been detected. However, we determined four inbred mice strains, each of that showed particular metabolic syndrome profiles: Agouti Yellow, C57BL/6, DD and DBA mice.

*Keywords:* inbred mice strains, blood lipid profile, glucose tolerance, blood pressure.