

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *Tas1r3* НА МЕТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ И ЛИПИДОВ У МЕЖЛИНЕЙНЫХ ГИБРИДОВ МЫШЕЙ**

© В. О. Муровец, Е. А. Созонтов, Ю. В. Андреева,  
Р. П. Хропычева, В. А. Золотарев

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: mourovets@mail.ru

Целью исследования была оценка влияния полиморфизма гена *Tas1r3*, кодирующего вкусовой рецептор сладкого T1R3, на метаболизм глюкозы и липидов. Эксперименты были проведены на гибридах первого поколения от скрещивания мышей инбредных линий: самцов 129P3/J (носители рецессивной аллели *Tas1r3*, локуса *SacD*) и самок C57BL/6(By)J (B6, носители локуса *SacB*) либо *Tas1r3* ген нокаутной линии C57BL/6J—*Tas1r3*<sup>tm1Rfm</sup>. Полученные группы гибридов при идентичном фоновом генотипе различались только набором локусов *Sac*. Эффект гемизиготизации *Sac* анализировался путем сравнения реакции гомозиготной линии B6 и гемизиготных гибридов B6 × B6-*Tas1r3*KO. Показано, что наличие доминантной аллели *SacB* предопределяет повышенную толерантность к глюкозе, быструю утилизацию глицерола, увеличение массы тела и, по всей видимости, отложение жира. Гаплонедостаточность *Sac* приводит к снижению постпрандиального уровня инсулина, увеличению массы тела, а также массы окологонадного жира и печени, но не влияет на толерантность к глюкозе и утилизацию глицерола. Полученные результаты подтвердили влияние *Tas1r3* генотипа на энергетический обмен, а также адекватность использованной модели.

*Ключевые слова:* *Tas1r3*, полиморфизм, гаплонедостаточность, толерантность к глюкозе, инсулин, глицерол, ожирение.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 3. С. 338—350. 2018

V. O. Murovets, E. A. Sozontov, Yu. V. Andreeva, R. P. Khropycheva, V. A. Zolotarev. EFFECTS OF *Tas1r3* GENE POLYMORPHISMS ON GLUCOSE AND LIPID METABOLISM IN BETWEEN STRAIN HYBRIDS OF MICE. Pavlov Institute of Physiology of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: mourovets@mail.ru.

The aim of this study was elucidating effects of *Tas1r3* polymorphisms on glucose and lipid metabolism using a novel approach. We used F1 hybrids obtained from crosses between the inbred mouse strains: males from 129P3/J (bearing a recessive allele *SacD*) and females of C57BL/6(By)J (B6), or *Tas1r3* gene knockout strain, C57BL/6J—*Tas1r3*<sup>tm1Rfm</sup>. Having the same background genotype, these hybrids differ by sets of *Sac* locuses. Additionally, we analyzed the effect of *Sac* hemizygoty by comparing responses of parent strain B6 and hemizygous hybrids B6 × B6-*Tas1r3*KO. In fed animals, the dominant allele *SacB* determines higher tolerance to glucose, faster utilization of glycerol, increase of the body weight and probably larger fat depot. Haploinsufficiency of *Sac* caused a decrease of the postprandial level of insulin, increase of body weight, as well as the weight of the liver and epididymal fat, but did not affect glucose tolerance and

glycerol clearance. The obtained results confirmed the influence of *Tas1r3* on catabolism and supported relevance of the applied experimental model.

*Key words:* *Tas1r3*, polymorphisms, haploinsufficiency, glucose tolerance, insulin, glycerol, obesity.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 3. P. 338—350. 2018

Восприятие сладкого вкуса природных сахаров, некоторых аминокислот и искусственных подсластителей вызывает чувство удовольствия и стимулирует эволюционно закрепленный выбор высококалорийной пищи [14], что рассматривается как один из факторов развития ожирения, диабета II типа, неалкогольной жировой болезни печени, сердечно-сосудистых заболеваний и т. д. [11, 25]. Помимо очевидной роли вкусового анализатора в выборе сладких продуктов исследования последнего десятилетия выявили участие белков вкусовой рецепции в гуморальной регуляции обмена веществ. Было установлено, что мембранный рецептор сладкого вкуса, белковый гетеродимер T1R2/T1R3, экспрессируется не только во вкусовых почках на языке, но и в эпителии желудочно-кишечного тракта, в поджелудочной железе, в жировой ткани, костях, почках, сердце, лимфоцитах и т. д. [22]. Получены в целом непротиворечивые данные об участии экстраоральных рецепторов T1R2 и T1R3 в регуляции углеводного и жирового обмена, не зависящей от калорийной ценности продукта [1, 3, 19, 20, 30, 36]. Регуляция такого рода, опосредуемая фосфолипидом C-β2 и инозитол 1,4,5-трифосфатом [22], происходит синергично с основным универсальным механизмом метаболической детекции глюкозы, связанным с активностью глюкокиназы и АТФ-зависимого K<sup>+</sup> канала [7]. В слизистой оболочке тонкого кишечника в отсутствие белка T1R3 или G-белка α-гаструцина уменьшается экспрессия натрий-глюкозного котранспортера-1 [27]. В культуре энтероэндокринных клеток тонкого кишечника мыши блокада T1R2/T1R3 гурмарином прекращает продукцию глюкагоноподобного пептида-1 и глюкозозависимого инсулиноподобного пептида [35]. Кроме того, блокада рецептора сладкого вкуса либо делеция T1R2 приводит к ослаблению секреции инсулина в культуре MIN6 клеток поджелудочной железы мыши и в изолированных островках Лангерганса [21, 31]. Функциональная активность T1R2/T1R3 также выявлена в немногочисленных исследованиях *in vivo*. Показано, что висцеральная T1R3-зависимая рецепция сахаров способствует утилизации глюкозы и, вероятно, усилению липолиза [3, 30].

Уровень предпочтения и потребления сладких веществ у млекопитающих во многом связан с генетически обусловленными индивидуальными различиями. Среди людей выделяют так называемых «любителей» («sweet-likers»), у которых предпочтение растет с концентрацией подсластителя, либо «нелюбителей» («sweet-dislikers»), не выказывающих заметного предпочтения высоких концентраций по сравнению с умеренными [26]. У лабораторных мышей также четко выявляются линии с высокой чувствительностью и повышенным потреблением сладкого, несущие так называемую чувствительную аллель («taster allele»), и линии со сравнительно низкой чувствительностью, имеющие «nontaster allele» [6, 9]. Достаточно давно установлено, что различия в предпочтении растворов сахараина между инбредными линиями мышей в значительной мере связаны с аллельными вариантами одного аутосомного локуса *Sac*. Его доминантная аллель *Sac<sup>b</sup>*, первоначально обнаруженная у мышей линии C57BL/6, определяет повышенное предпочтение сахараина, а рецессивная аллель *Sac<sup>d</sup>*, имеющаяся у линий DBA/2, 129P3/J и др., ассоциируется с меньшим потреблением [6, 10, 32]. Позиционное клонирование показало, что локусу *Sac* идентичен ген *Tas1r3* (4-я хромосома мыши), кодирующий рецепторный белок T1R3 [6, 24]. У человека ортолог этого гена *TAS1R3* находится в коротком плече хромосомы 1 [4].

Ощущение сладкого вкуса запускается при контакте лиганда с рецептором T1R2/T1R3, субъединицы которого кодируются генами *Tas1r2* и *Tas1r3* соот-

ветственно. Случаи нарушения транскрипции одного или нескольких вкусовых генов известны в естественных условиях у некоторых видов млекопитающих и птиц [17], а также могут провоцироваться искусственно, что приводит к резкому уменьшению чувствительности к сладкому и его потребления [8, 38]. По известным расчетам межлинейные различия в предпочтении сахарина у лабораторных мышей на 78 % связаны с полиморфными проявлениями гена *Tas1r3*. Сами же аллельные варианты гена *Tas1r3* у мышей определяются тремя несинонимичными единичными нуклеотидными заменами (SNP), среди которых замена T179C, приводящая к замещению изолейцина треонином в положении 60 в экстраклеточном N домене T1R3, вероятно, является основной причиной описанных выше различий между фенотипами *Sac<sup>b</sup>* и *Sac<sup>d</sup>* [34]. Данная замена сказывается *in vitro* на связывании T1R3 с сахарозой, глюкозой или сукралозой, ограничивая конформационные изменения и снижая аффинность экстраклеточного домена рецептора, что существенно (до 1000 % для сахарозы) увеличивает эффективную дозу тестируемых веществ [33]. В *TAS1R* генах человека также выявлены синонимичные и несинонимичные SNP, равно как и гаплотипы, характерные для отдельных популяций [18].

По сравнению с наследственными факторами, влияющими на вкусовое восприятие сладких веществ, генетическая архитектура висцеральной чувствительности к глюкозе и, возможно, к сахарозаменителям представляется гораздо более сложной. При этом влияние полиморфизма T1R2/T1R3, скорее всего, маскируется вариациями остального генотипа. В частности, потребление сладких веществ гибридами F2, полученными от скрещивания линий мышей C57BL/6 × 129P3/J, связано с вариациями *Tas1r3* в значительно меньшей степени (10—35 %), чем предпочтение (64—96 %) [5, 16].

Известные на сегодняшний день данные о влиянии полиморфизма *Tas1r3* на предпочтение и потребление сахаров и некалорийных подсластителей получены на лабораторных мышах. Хорошо отработанной моделью является конгенная линия 129P3/J. C57BL/6—*Tas1r3*, выведенная в серии обратных скрещиваний гибридов F1 C57BL/6 (B6) × 129P3/J (129) с родительской линией 129, что сопровождалось селекцией особей, несущих фрагмент хромосомы 4 с геном B6-*Tas1r3* [15]. Другой метод, применявшийся для изучения роли полиморфизма гена *Tas1r3*, — это секвенирование содержащих данный ген участков ДНК у различных линий мышей и последующее сопоставление выявленных SNP с уровнем предпочтения сладких веществ [34]. Оба метода являются трудоемкими и дорогостоящими.

Недавно мы предложили сравнительно простой способ изучения влияния полиморфизма *Tas1r3* на предпочтение сладких веществ, основанный на сравнении реакций гибридов F1, полученных от скрещивания линии 129 с линией B6, либо от скрещивания линии 129 с линией, нокаутной по гену *Tas1r3*, B6-*Tas1r3*KO. Эти гибриды, имея идентичный фоновый генотип, различаются лишь набором локусов *Sac*: одни несут как доминантную, так и рецессивную аллель *Sac<sup>d</sup>* и *Sac<sup>b</sup>* (гибриды *SacD/B*), другие — только одну рецессивную аллель *Sac<sup>d</sup>* (*SacD/0*). Между этими гибридами нами были выявлены отчетливые фенотипические различия. Носители доминантной аллели (*SacD/B*) демонстрировали повышенное по сравнению с *SacD/0* предпочтение низких концентраций сахарозы (1—4 %) либо относительно высоких концентраций неметаболизируемых подсластителей. Кроме того, было замечено слабое влияние гемизиготности *Sac* на предпочтение низких концентраций сахарозы и сахарина, если животные имели длительный (48 ч) доступ к растворам этих веществ, и отсутствие эффекта гемизиготности при краткой экспозиции тестовых веществ [2].

Влияние полиморфизма *Tas1r3* на обмен веществ до настоящего времени не было исследовано ни в одной из упомянутых экспериментальных моделей. В связи с этим в данной работе была поставлена задача оценить различия в метаболизме глюкозы и липидов у гибридов F1 *SacD/B* и *SacD/0*. Дополнительно ана-

лизировались возможные проявления гаплонедостаточности у гемизигот *Sac* путем сравнения реакций родительской линии В6 (В6-*SacB/B*) и гибридов В6 × В6-*Tas1r3KO* (В6-*SacB/0*).

Ранее было показано, что Т1R3-зависимое усиление секреции инсулина β-клетками островковой ткани поджелудочной железы *in vitro* происходит при оптимальной концентрации глюкозы в среде, соответствующей постпрандиальному уровню в крови [21, 31]. В связи с этим наши эксперименты проведены на сытых животных, имевших в светлое время суток неограниченный доступ к нормокалорийной лабораторной диете.

## МЕТОДИКА

Протокол экспериментов одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии им. И. П. Павлова (ИФ РАН). Работа выполнена на 3—7-месячных самцах лабораторных мышей из вивария ЦКП «Биоколлекции ИФ РАН». Использовались мыши инбредных линий 129P3/J (129), C57BL/6(By)J (B6), происходящие от племенных групп, приобретенных в Джексонской лаборатории (Bar Harbor, ME), а также линия с делецией гена *Tas1r3* C57BL/6J-*Tas1r3<sup>tm1Rfm</sup>* (В6-*Tas1r3KO*) [8], племенная группа которых была безвозмездно предоставлена д-р. R. F. Margolskee (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, PA, США). От перечисленных родительских линий были получены гибриды F1, носители разных аллельных вариантов локуса *Sac*: ♂ 129 × ♀ В6 (обозначенные здесь *SacD/B*) либо ♂ 129 × ♀ В6-*Tas1r3KO* (*SacD/0*). Для оценки гаплоидной недостаточности, связанной с отсутствием одной аллели *Sac*, сравнивались реакции родительской линии В6 (В6-*SacB/B*) и F1 гибридов ♂ В6 × ♀ В6-*Tas1r3KO* (В6-*SacB/0*).

Мыши размещались по 4—5 особей в стандартных клетках в условиях 12-часового искусственного освещения (включение света в 8:00) и постоянной температуры (22—24 °С). В течение всего эксперимента они имели свободный доступ к воде и стандартному лабораторному корму ПК-120 (МЭСТ, Москва), содержащему 67 % углеводов, 5 % жиров и 19 % белка, с энергетической ценностью 13 000 кДж/кг.

Тесты толерантности к глюкозе и инсулину проводили на не голодавших животных в светлое время начиная с 13:00. Тест толерантности к глюкозе (ГТТ) проходил в соответствии с рекомендациями Центра метаболического фенотипирования мышей [29]. Водный раствор глюкозы (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 г/кг по 0.1 мл/10 г массы тела вводили внутривенно. Парные пробы крови для каждого измерения брали из надреза на хвосте в период 0—120 мин после введения глюкозы. Для тестирования толерантности к инсулину (ИТТ) животным внутривенно инъецировали 0.75 или 1.25 Ед/кг инсулина (Инсулин аспарт, Ново Нордиск А/О Багсваерд, Дания) и в течение 0—120 мин измеряли концентрации глюкозы аналогично ГТТ. Для определения концентрации глюкозы в пробах использовался глюкометр One Touch Ultra (LifeScan, Inc., США).

Изъятие проб крови для определения гормонов и метаболитов, а также морфометрические измерения проводили после седации газовой смесью CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> (50:50 объемных %). Пробы крови получали из ретроорбитального синуса в пробирки с EDTA и затем центрифугировали для отделения плазмы. Концентрация триглицеридов (ТГ) и глицерола (ГЦ) измерялась в свежей плазме крови, другие образцы сохранялись при температуре –30 °С. Концентрацию ТГ и ГЦ определяли с помощью набора для биохимического анализа (TR0100, Sigma-Aldrich, США). Уровень инсулина и глюкагона в плазме крови измерялся с помощью набора для иммуноферментного анализа (ИФА) (EZRM1-13K, Millipore, США). После эвтаназии производилась диссекция и взвешивание печени и околопочечного жира с точностью ± 0.01 г.

Все данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  ошибка среднего. Площадь под кривой (ППК) изменения концентрации глюкозы во времени рассчитывали методом трапеций. Относительная масса окологонадного жира и печени рассчитывалась нормированием абсолютной массы на массу тела. Для статистических сравнений использовался пакет программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) применялся для сравнения результатов ГТТ и ИТТ, при этом независимым фактором был генотип, а зависимым — время, прошедшее после инъекции глюкозы либо инсулина. Для множественных сравнений использовали критерий Фишера (LSD-тест). Сравнение площадей под кривой концентрации глюкозы, инсулина, ТГ, ГЦ, массы тела, печени и жировой ткани произведено с помощью *t*-теста Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ГТТ родительские линии 129 и В6 существенно различались по скорости утилизации глюкозы после ее внутривенного введения в дозе 2 г/кг (рис. 1, А). При этом у мышей линии В6 в крови выявлена большая концентрация глюкозы, чем у линии 129. Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверный эффект генотипа ( $F_{1, 18} = 138.94, p < 0.0001$ ) и времени ( $F_{7, 126} = 39.10, p < 0.0001$ ), а также взаимодействие этих эффектов ( $F_{7, 126} = 16.68, p < 0.0001$ ). Множественные сравнения (тест Фишера) показали, что у линии В6 повышенный уровень глюкозы в крови сохранялся в течение всего времени тестирования. Сравнение ППК концентрация—время подтвердило этот результат ( $p < 0.0001$ ; рис. 1, А). На рисунке 1, В показано, что измеренная в ходе ГТТ концентрация глюкозы в крови гибридов F1 *SacD/B* и *SacD/0* находилась в промежутке между показателями родительских линий, но заметно ближе к линии 129. При этом у гибридов *SacD/B* уровень глюкозы в крови был достоверно ниже, чем у *SacD/0*: влияние генотипа ( $F_{1, 22} = 7.81, p < 0.01$ ), времени ( $F_{7, 154} = 27.73, p < 0.000001$ ), взаимодействие эффектов генотипа и времени ( $F_{7, 154} = 3.09, p < 0.005$ ). ППК концентрация—время у группы *SacD/0* была почти на 30 % больше, чем у *SacD/B* ( $p < 0.01$ ). В то же время (рис. 1, Д) ГТТ не выявил различий между гемизиготами В6-*SacB/0* и особями гомозиготной линии В6.

Введение инсулина сытым мышам всех групп вызывало быстрое (в течение 15 мин) уменьшение концентрации глюкозы в крови, которая затем постепенно восстанавливалась в течение всего периода наблюдений. Толерантность к инсулину родительских линий заметно различалась при внутривенном введении этого гормона в дозе 0.75 ЕД/кг (рис. 1, Б). Линия 129 оказалась более чувствительной к инсулину: влияние генотипа ( $F_{1, 15} = 9.11, p < 0.01$ ), времени ( $F_{3, 45} = 18.43, p < 0.000001$ ), взаимодействие эффектов генотипа и времени ( $F_{3, 45} = 3.16, p < 0.05$ ). Сравнение между гибридами *SacD/B* и *SacD/0*, а также между группой В6-*SacB/0* и родительской линией В6 не выявило различий в толерантности к инсулину (рис. 1, Г, Е).

Данные о зависимости от генотипа фонового уровня глюкозы в крови сытых животных представлены на рис. 2, А. Сравнение родительских линий показало, что концентрация глюкозы у особой родительской линии В6 была выше, чем у линии 129 ( $p < 0.001$ ;  $n = 24—35$ ). Уровень глюкозы в крови гибридов *SacD/B* превышал таковой у *SacD/0* ( $p < 0.01$ ;  $n = 42—31$ ). Переход аллели *SacB* в гемизиготное состояние (В6-*SacB/0*) сопровождался уменьшением концентрации глюкозы в крови по сравнению с гомозиготными особями родительской линии В6 (В6—*SacB/B*) ( $p < 0.05$ ;  $n = 24—22$ ).

На рис. 2, Б сравнивается концентрация инсулина в плазме крови у экспериментальных групп. У неголодавших особей родительской линии В6 содержание инсулина в плазме было в 1.5 раза выше, чем у линии 129 ( $p < 0.001$ ;  $n = 19$ ).



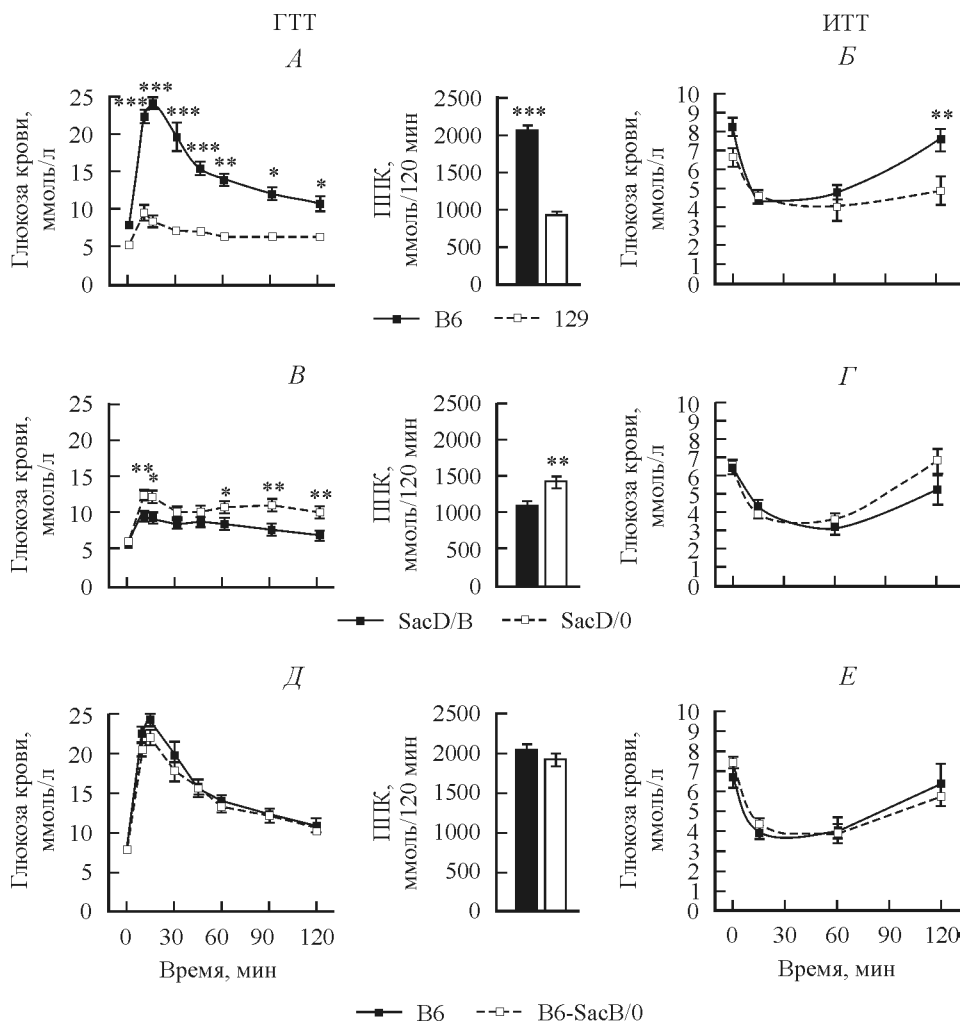


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови у сытых мышей после внутрибрюшинного введения 2 г/кг глюкозы (ГТТ, левая панель) либо после инъекции инсулина (ИТТ, правая панель).

*A* — ГТТ у мышей (3—4 месяца) линий *V6* ( $n = 12$ ) и *129* ( $n = 8$ ) и площадь под кривой (ППК); *Б* — ИТТ у мышей (4—6 месяцев) *V6* ( $n = 10$ ) и *129* ( $n = 7$ ) после внутрибрюшинной инъекции 0.75 ЕД/кг инсулина; *В* — ГТТ у мышей (3—4 месяца) *SacD/B* ( $n = 11$ ) и *SacD/0* ( $n = 13$ ) и ППК; *Г* — ИТТ у мышей (7 месяцев) *SacD/B* ( $n = 11$ ) и *SacD/0* ( $n = 14$ ) после инъекции 0.75 ЕД/кг инсулина; *Д* — ГТТ у мышей (3—4 месяца) *V6* ( $n = 12$ ) и *V6-SacB/0* ( $n = 17$ ) и ППК; *Е* — ИТТ у мышей (3—4 месяца) *V6* ( $n = 10$ ) и *V6-SacB/0* ( $n = 16$ ) после инъекции 1.25 ЕД/кг инсулина. Статистические сравнения концентрации глюкозы в крови проведены с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и теста Фишера. Сравнения между ППК проведены с помощью *t*-теста Стьюдента: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Гибриды *SacD/B* секретируют инсулина в 2.3 раза больше по сравнению с группой *SacD/0* ( $p < 0.01$ ,  $n = 17—18$ ). У гемизигот *V6-SacB/0* отмечено уменьшение концентрации инсулина в 2.6 раза по сравнению с гомозиготными особями *V6-SacB/B* ( $p < 0.001$ ,  $n = 19—18$ ).

Значимых различий в концентрации ТГ в плазме крови не было выявлено как между родительскими линиями *V6* и *129*, так между гибридами *SacD/B* и *SacD/0* и между гемизиготами *V6-SacB/0* и гомозиготной линией *V6-SacB/B* (рис. 2, *В*). В то же время уровень ГЦ у исследуемых групп заметно различался (рис. 2, *Г*).

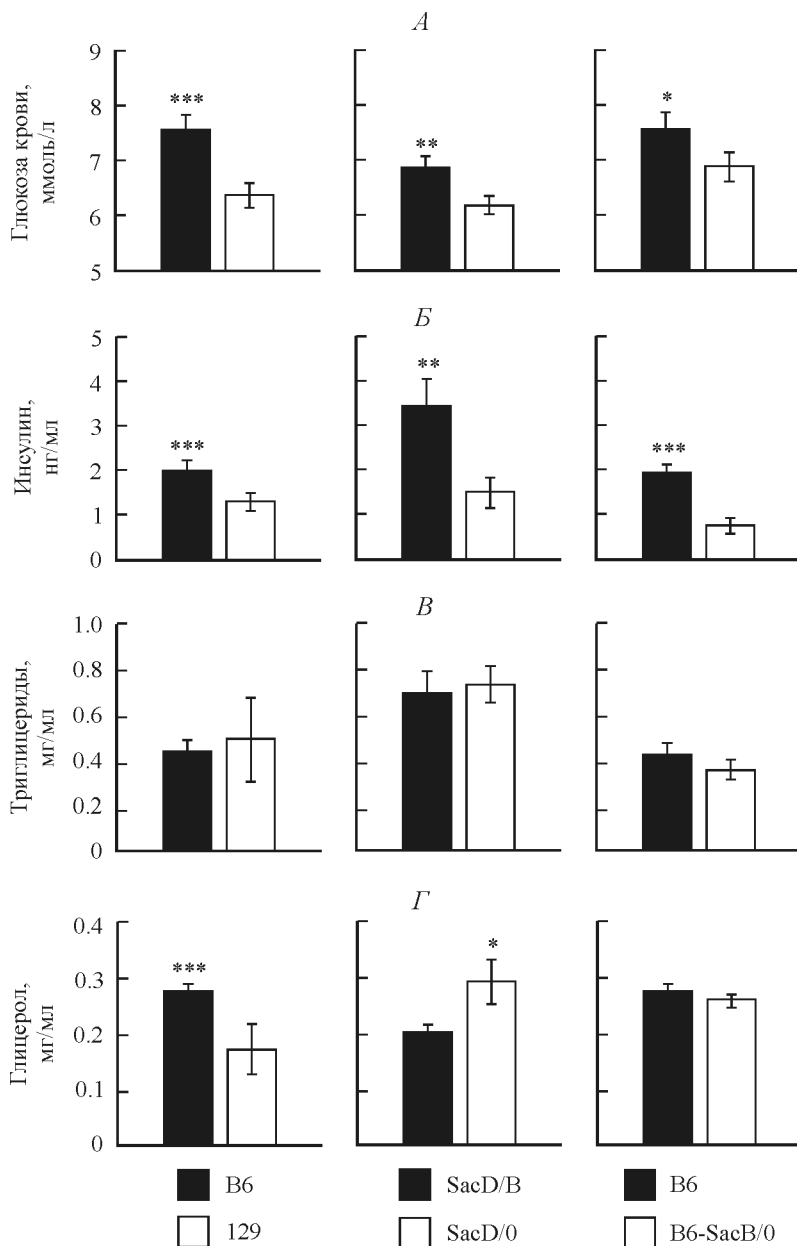


Рис. 2. Влияние генотипа *Sac* на концентрацию в крови глюкозы, инсулина, триглицеридов и глицерола в плазме сытых лабораторных мышей: у инбредных линий В6 и 129 (левая панель), гибридов *SacD/B* и *DacD/0* (центральная панель), а также у линии В6 и гибридов *B6-SacB/0* (правая панель). Возраст животных 5—7 месяцев.

Статистические сравнения проведены с помощью *t*-теста Стьюдента: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Его содержание в плазме крови сытых особей линии 129 было ниже примерно на 60 %, чем у В6 ( $p < 0.001$ ,  $n = 19—10$ ). Концентрация ГЦ была больше в крови гибридов *SacD/0* по сравнению с *SacD/B* ( $p < 0.05$ ,  $n = 12—16$ ). Различий в уровне ГЦ между мышами линии В6 и гемизиготными особями В6-*SacB/0* выявлено не было.

Морфометрические параметры неголодавших самцов сравниваемых групп представлены на рис. 3. Масса тела (рис. 3, А) мышей родительских линий В6 и 129 оказалась практически одинаковой ( $n = 36—35$ ). В то же время гибриды *SacD/B* превосходили по массе тела особей *SacD/0* ( $p < 0.01$ ;  $n = 42—31$ ). Гемизиготные особи В6-*SacB/0* весили больше, чем мыши гомозиготной линии В6 ( $p < 0.05$ ;  $n = 36—22$ ). У мышей линии 129 выявлена меньшая, чем у В6, абсолютная и относительная ( $p < 0.05$ ;  $n = 37—12$ ) масса окологонадного жира в возрасте 4—6 месяцев. В то же время сравнение между гибридами *SacD/B* и *SacD/0* не показало различий в массе окологонадного жира ( $n = 27—25$ , возраст 5—7 месяцев). Отсутствие одной функциональной аллели *SacB* у мышей В6-*SacB/0* привело к увеличению как абсолютной (рис. 3;  $p < 0.01$ ;  $n = 35—23$ ), так и относительной массы ( $p < 0.05$ ;  $n = 35—23$ ) окологонадного жира по сравнению с родительской линией В6 в возрасте 5—7 месяцев (рис. 3, Б, В).

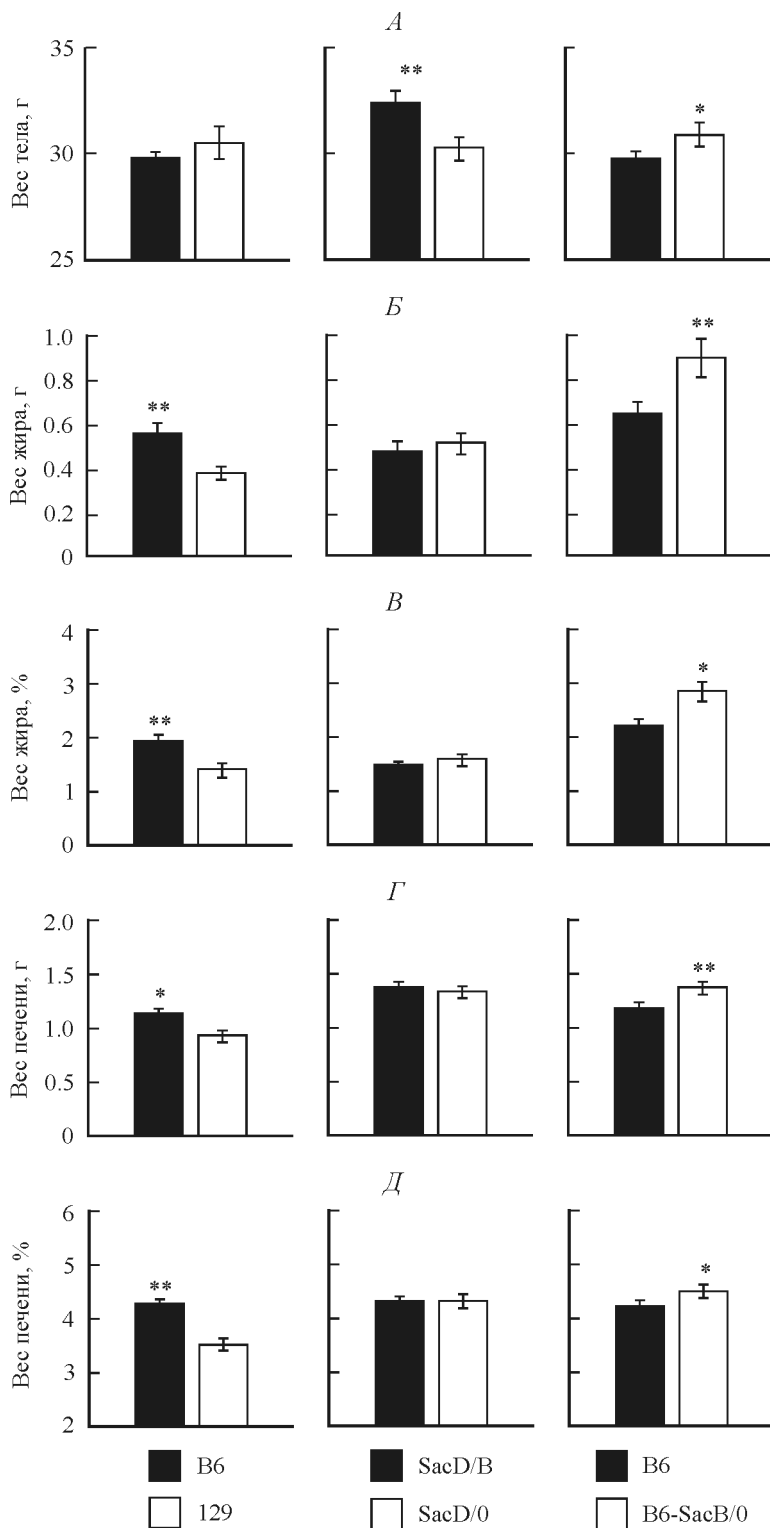
Для мышей родительской линии 129 возраста 3—6 месяцев была характерна меньшая абсолютная ( $p < 0.05$ ;  $n = 36—12$ ) и относительная ( $p < 0.01$ ;  $n = 36—12$ ) масса печени, чем у линии В6. Сравнение между гибридами *SacD/B* и *SacD/0* не показало различий в массе печени ( $n = 27—25$ ). С другой стороны, переход в гемизиготное состояние локуса *Sac* в группе В6-*SacB/0* ( $n = 34—23$ ) привел к увеличению как абсолютной ( $p < 0.01$ ), так и относительной массы печени ( $p < 0.05$ ) по сравнению с *SacB* гомозиготной линией В6 (рис. 3, Г, Д).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существенный прогресс в понимании регуляции углеводного и жирового обмена был вызван появлением новых данных о присутствии вкусовых рецепторных белков T1R2 и T1R3 в слизистой оболочке тонкого кишечника, в поджелудочной железе и жировой ткани [22]. При этом особую роль в висцеральной рецепции сладких веществ играет белок T1R3, экспрессия которого преобладает над T1R2 в поджелудочной железе и в жировой ткани, где T1R3 может образовывать функциональные гомодимеры и, вероятно, более чувствительные к физиологическим концентрациям внеклеточной глюкозы гетеродимеры с кальций-чувствительными рецепторами T1R3/CaSR [13]. Функциональные тесты показали, что делеция гена *Tas1r3*, кодирующего белок T1R3, приводит к заметному ослаблению толерантности к глюкозе [20, 30], а также к инсулинорезистентности [1].

В проведенной работе мы впервые получили сведения об изменениях в углеводном и жировом балансе, связанных с полиморфизмом гена *Tas1r3*, фенотипические проявления которого в пищевом поведении в настоящее время хорошо известны [15]. Прежде всего было установлено, что присутствие доминантной аллели гена *Tas1r3* у гибридов *SacD/B* в сытом состоянии ускоряет утилизацию глюкозы после ее парентерального введения. Носители рецессивной аллели, гибриды *SacD/0*, напротив, демонстрировали пониженную толерантность (рис. 1, В). Интерпретация реакций гибридов *SacD/0* сопряжена с определенными трудностями, поскольку экспериментально полученная гемизигота *SacD/0* может влиять на проявление признака, не только определяя первичную структуру белка T1R3 и, следовательно, его аффинность к сладким веществам, но и провоцируя гаплонедостаточность в результате транскрипции только одной аллели. Для того чтобы отличить полиморфный эффект локуса *Sac* от влияния гемизиготности, мы провели дополнительные опыты на модели гаплонедостаточности *Sac*, в ко-





торых сопоставлялись реакции линии В6 (гомозиготы *SacB/B*) и гемизиготы *B6-SacB/0*. Было показано, что гомозиготы *SacB/B* не отличались от гемизигот *B6-SacB/0* в толерантности к глюкозе (рис. 1, Д). Результаты такого сравнения позволяют считать, что уменьшение толерантности к глюкозе у гибридов *SacD/0* возникает преимущественно из-за экспрессии рецессивной аллели *SacD*.

Потенциация секреции инсулина в островковых клетках поджелудочной железы, а также усиление секреции инкретиннов в тонком кишечнике, происходящие с участием рецепторного белка T1R3, рассматриваются как наиболее вероятные механизмы действия висцеральных рецепторов сладкого вкуса на толерантность к глюкозе [20, 21, 31]. Наши измерения в крови сытых животных показали снижение уровня инсулина у гибридных носителей рецессивной аллели (*SacD/0*) в сравнении с *SacD/B* (рис. 2, Б), что вполне согласуется с ослаблением у этой группы толерантности к глюкозе. Однако выявленная у гибридов *SacD/0* пониженная концентрация инсулина, скорее всего, является следствием обнаруженной в наших опытах гаплонедостаточности *B6-SacB/0*, в то время как толерантность к глюкозе определялась полиморфными проявлениями *Sac* локуса (рис. 1). Возможно, что влияние полиморфизма на секрецию инсулина будет выявлено в дальнейшем при анализе динамики реакции в ответ на нагрузку глюкозой. У гибридов *SacD/0* отмечено уменьшение концентрации «сытой» глюкозы в крови вследствие гаплонедостаточности (рис. 2, А), что отчасти противоречит пониженному уровню инсулина у этих животных. Можно предположить, что это связано с замедлением транспорта глюкозы в кишечнике, на который также влияет генотип *Sac* [27]. Снижение толерантности к инсулину у *Tas1r3* ген нокаутных животных было описано нами ранее [1, 30], однако в примененной здесь экспериментальной модели связь полиморфизма локуса *Sac* с чувствительностью тканей к инсулину не проявилась, равно как не было обнаружено эффекта гаплонедостаточности на толерантность к инсулину (рис. 1, Г, Е).

В ряде исследований показано, что дефицит рецепторного белка T1R3 приводит к нарушению пластического обмена, в частности жирового. Хотя делеция T1R2 или T1R3 не влияла на массу тела у животных, получавших нормокалорийную диету [3, 37], увеличение массы окологонадного жира и заметные проявления дислипидемии, включая повышение уровня триглицеридов в плазме крови как в сытом, так и в голодном состоянии и повышение концентрации глицерола, были выявлены у сытых животных у линии *B6-Tas1r3KO* [3]. При кормлении высококалорийной диетой у мышей с нарушенной рецепцией сладкого отмечалось замедление набора массы и жирового депо, что говорит о стимуляции адипогенеза посредством этих рецепторов [12, 23]. вполне согласуются с этими данными результаты опытов на культуре адипоцитов, которые подтвердили, что белок T1R3 опосредует стимулирующее влияние искусственных подсластителей на адипогенез [28].

Проведенные нами сравнения между гибридами *SacD/B* и *SacD/0* также выявили влияние полиморфизма T1R3 на массу тела животных. Наличие доминантной аллели *SacB* предопределяло увеличение массы тела. Этот параметр не был связан с гемизиготностью, поскольку в контрольном опыте гемизиготность *SacB* приводила к противоположным эффектам, а именно к снижению массы тела (рис. 3, А). Гибриды *SacD/B* и *SacD/0* не различались по запасам окологонадного

Рис. 3. Влияние генотипа *Sac* на морфометрические показатели мышей инбредных линий В6 и 129, гибридов *SacD/B* и *DacD/0*, а также линии В6 и гибридов *B6-SacB/0*.

А — масса тела мышей возраста 5—7 месяцев; Б — абсолютная масса окологонадного жира мышей возраста 3—6 месяцев; В — относительная масса окологонадного жира мышей возраста 3—6 месяцев; Г — абсолютная масса печени мышей возраста 3—6 месяцев; Д — относительная масса печени мышей возраста 3—6 месяцев. Статистические сравнения с помощью *t*-критерия Стьюдента: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

жира. В то же время обнаружилось влияние гаплонедостаточности *SacB* на увеличение массы жира (рис. 3, Б, В). Можно предположить, что у гибридов *SacD/0* влияние рецессивной аллели проявлялось в ослаблении адипогенеза, что в нашей экспериментальной модели маскировалось эффектом гаплонедостаточности. Косвенным подтверждением этого могут быть наши недавние наблюдения, которые показали, что полное выключение рецепции сладких веществ у *Tas1r3*КО также сопровождается накоплением окологонадного жира [3]. В то же время в проведенной работе не было отмечено изменений в уровне триглицеридов, связанных с полиморфизмом *Sac* (рис. 2, В).

Фенотипическим проявлением рецессивной аллели *SacD* было увеличение постпрандиального уровня глицерола, которое в нашей экспериментальной модели не было связано с гемизиготным состоянием этой аллели (рис. 2, Г). Аналогичные изменения наблюдались ранее у *B6-Tas1r3*КО [3]. Можно полагать, что отсутствие рецептора сладкого вкуса или снижение его чувствительности тормозит утилизацию глицерола как основного субстрата глюконеогенеза, хотя явных различий в массе печени (рис. 3, Г, Д) у сравниваемых гибридов не показано.

В целом полученные результаты подтвердили влияние *Tas1r3* генотипа на энергетический обмен. В частности, наличие доминантой аллели *Tas1r3* (локус *SacB*) предопределяет повышенную толерантность к глюкозе, быструю утилизацию глицерола, увеличение массы тела и, возможно, дополнительное отложение жира. При этом гаплонедостаточность *Sac* не влияет на эти параметры, что позволяет считать предложенную экспериментальную модель адекватной для выявления влияния полиморфизма *Tas1r3* на обмен веществ.

Авторы благодарят И. Е. Богатыреву за поддержание колонии инбредных мышей и разведение гибридных животных.

Поддержано грантом РФФИ № 15-04-08671.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Муровец В. О., Бачманов А. А., Травников С. В., Чурикова А. А., Золотарев В. А. Участие рецепторного белка TAS1R3 в регуляции обмена глюкозы у мышей при разных уровнях гликемии. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 50(4) : 296—304. 2014.
- [2] Муровец В. О., Лукина Е. А., Золотарев В. А. Влияние полиморфизма гена *Tas1r3* на предпочтение и потребление сахарозы и низкокалорийных сахарозаменителей у межлинейных гибридов мышей первого поколения. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 54(3) : 2018.
- [3] Муровец В. О., Созонтов Е. А., Андреева Ю. В., Хропычева Р. П., Золотарев В. А. Влияние рецепторного белка T1R3 на глюконеогенез и жировой обмен у мышей. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 102(6) : 668—679. 2016.
- [4] Bachmanov A. A., Bosak N. P., Floriano W. B., Inoue M., Li X., Lin C., Murovets V. O., Reed D. R., Zolotarev V. A., Beauchamp G. K. Genetics of sweet taste preferences. Flavour. Fragr. J. 26(4) : 286—294. 2011.
- [5] Bachmanov A. A., Reed D. R., Ninomiya Y., Inoue M., Tordoff M. G., Price R. A., Beauchamp G. K. Sucrose consumption in mice: major influence of two genetic loci affecting peripheral sensory responses. Mamm. Genome. 8(8) : 545—548. 1997.
- [6] Bachmanov A. A., Li X., Reed D. R., Ohmen J. D., Li S., Chen Z., Tordoff M. G., de Jong P. J., Wu C., West D. B., Chatterjee A., Ross D. A., Beauchamp G. K. Positional cloning of the mouse saccharin preference (*Sac*) locus. Chem. Senses. 26(7) : 925—933. 2001.
- [7] Craig T. J., Ashcroft F. M., Proks P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. J. Gen. Physiol. 132(1) : 131—144. 2008.
- [8] Damak S., Rong M., Yasumatsu K., Kokrashvili Z., Varadarajan V., Zou S., Jiang P., Ninomiya Y., Margolskee R. F. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. Science. 301(5634) : 850—853. 2003.
- [9] Frank M. E., Blizard D. A. Chorda tympani responses in two inbred strains of mice with different taste preferences. Physiol. Behav. 67(2) : 287—297. 1999.

- [10] Fuller J. L. Single-locus control of saccharin preference in mice. *J. Hered.* 65(1) : 33—36. 1974.
- [11] Garcia-Bailo B., Toguri C., Eny M., Sohemy (El-) A. Genetic variation in taste and its influence on food selection. *OMICS J. Integr. Biol.* 13(1) : 69—80. 2009.
- [12] Glendinning J. I., Gillman J., Zamer H., Margolskee R. F., Sclafani A. The role of T1r3 and Trpm5 in carbohydrate-induced obesity in mice. *Physiol. Behav.* 107(1) : 50—58. 2012.
- [13] Hamano K., Nakagawa Y., Ohtsu Y., Li L., Medina J., Tanaka Y., Masuda K., Kojima M., Kojima I. Lactisole inhibits the glucose-sensing receptor T1R3 expressed in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Endocrinol.* 226(1) : 57—66. 2015.
- [14] Hladik C. M., Pasquet P., Simmen B. New perspectives on taste and primate evolution: the dichotomy in gustatory coding for perception of beneficent versus noxious substances as supported by correlations among human thresholds. *Am. J. Phys. Anthropol.* 117(4) : 342—348. 2002.
- [15] Inoue M., Glendinning J. I., Theodorides M. L., Harkness S., Li X., Bosak N., Beauchamp G. K., Bachmanov A. A. Allelic variation of the Tas1r3 taste receptor gene selectively affects taste responses to sweeteners: evidence from 129. B6-Tas1r3 congenic mice. *Physiol. Genomics.* 32(1) : 82—94. 2007.
- [16] Inoue M., Reed D. R., Li X., Tordoff M. G., Beauchamp G. K., Bachmanov A. A. Allelic variation of the Tas1r3 taste receptor gene selectively affects behavioral and neural taste responses to sweeteners in the F2 hybrids between C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *J. Neurosci.* 24(9) : 2296—2303. 2004.
- [17] Jiang P., Josue J., Li X., Glaser D., Li W., Brand J. G., Margolskee R. F., Reed D. R., Beauchamp G. K. Major taste loss in carnivorous mammals. *PNAS.* 103(13) : 4956—4961. 2012.
- [18] Kim U. K., Wooding S., Riaz N., Jorde L. B., Drayna D. Variation in the human TAS1R taste receptor genes. *Chem. Senses.* 31(7) : 599—611. 2006.
- [19] Kojima I., Nakagawa Y. The role of the sweet taste receptor in enteroendocrine cells and pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes. Metab. J.* 35(5) : 451—457. 2011.
- [20] Kokrashvili Z., Mosinger B., Margolskee R. F. Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am. J. Clin. Nutr.* 90(3) : 822—825. 2009.
- [21] Kyriazis G. A., Soundarapandian M. M., Tyrberg B. Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *PNAS.* 109(8) : E524—E532. 2012.
- [22] Laffitte A., Neiers F., Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 17(4) : 379—385. 2014.
- [23] Larsson M. H., Hakansson P., Jansen F. P., Magnell K., Brodin P. Ablation of TRPM5 in mice results in reduced body weight gain and improved glucose tolerance and protects from excessive consumption of sweet palatable food when wed high calorific diets. *PLoS One.* 10(9) : e0138373. 2015.
- [24] Li X., Inoue M., Reed D. R., Huque T., Puchalski R. B., Tordoff M. G., Ninomiya Y., Beauchamp G. K., Bachmanov A. A. High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. *Mamm. Genome.* 12(1) : 13—16. 2001.
- [25] Liu S., Manson J. E. Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the ‘metabolic syndrome’ as predictors of coronary heart disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 12(4) : 395—404. 2001.
- [26] Looy H., Callaghan S., Weingarten H. P. Hedonic response of sucrose likers and dislikers to other gustatory stimuli. *Physiol. Behav.* 52(2) : 219—251. 1992.
- [27] Margolskee R. F., Dyer J., Kokrashvili Z., Salmon K. S., Ilegems E., Daly K., Maillet E. L., Ninomiya Y., Mosinger B., Shirazi-Beechey S. P. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *PNAS.* 104(38) : 15 075—15 080. 2007.
- [28] Masubuchi Y., Nakagawa Y., Ma J., Sasaki T., Kitamura T., Yamamoto Y., Kurose H., Kojima I., Shibata H. A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3—L1 cells. *PLoS One.* 8(1) : e545002013. 2013.
- [29] McGuinness O. P., Ayala J. E., Laughlin M. R., Wasserman D. H. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(4) : E849—E855. 2009.

- [30] Murovets V. O., Bachmanov A. A., Zolotarev V. A. Impaired glucose metabolism in mice lacking the Tas1r3 taste receptor gene. PLoS ONE. 10(6) : e0130997. 2015.
- [31] Nakagawa Y., Nagasawa M., Yamada S., Hara A., Mogami H., Nikolaev V. O., Lohse M. J., Shigemura N., Ninomiya Y., Kojima I. Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. PLoS One. 4(4) : e51062009. 2009.
- [32] Nelson G., Hoon M. A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N. J., Zuker C. S. Mammalian sweet taste receptors. Cell. 106(3) : 381—390. 2001.
- [33] Nie Y., Vignes S., Hobbs J. R., Conn G. L., Munger S. D. Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. Curr. Biol. 15(21) : 1948—1952. 2005.
- [34] Reed D. R., Li S., Li X., Huang L., Tordoff M. G., Starling-Roney R., Taniguchi K., West D. B., Ohmen J. D., Beauchamp G. K., Bachmanov A. A. Polymorphisms in the taste receptor gene (Tas1r3) region are associated with saccharin preference in 30 mouse strains. J. Neurosci. 24(4) : 938—946. 2004.
- [35] Sigoillot M., Brockhoff A., Meyerhof W., Briand L. Sweet-taste-suppressing compounds: current knowledge and perspectives of application. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96(3) : 619—630. 2012.
- [36] Simon B. R., Parlee S. D., Learman B. S., Mori H., Scheller E. L., Cawthorn W. P., Ning X., Gallagher K., Tyrberg B., Assadi-Porter F. M., Evans C. R., Mac Dougald O. A. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. J. Biol. Chem. 288(45) : 32 475—32 489. 2013.
- [37] Treesukosol Y., Smith K. R., Spector A. C. The functional role of the T1R family of receptors in sweet taste and feeding. Physiol. Behav. 105(1) : 14—26. 2011.
- [38] Zhao G. Q., Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Erlenbach I., Ryba N. J., Zuker C. S. The receptors for mammalian sweet and umami taste. Cell. 115(3) : 255—266. 2003.

Поступила 27 XII 2017