

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

Факультет **Фундаментальной Медицины**

Лаборатория трансляционной медицины

Московская школа на юго-западе № 1543

Исследование метаболического синдрома у мышей с нокаутом гена Т-кадгерина (CDH13)

А. И. Стрижкова

У. А. Ушакова

Научный руководитель:

к.б.н. В.С. Попов

Москва 2025

Введение

В работе отсутствуют оглавление, нумерация страниц, раздел «Благодарности». Неверно оформлен список литературы (некоторые ссылки). Подписи сделаны над рисунками (нужно под – подрисуночные подписи) и не содержат пояснений (что там за палочки – не ясно).

Метаболический синдром – это комплекс симптомов, характеризующийся сочетанием нарушений углеводного, липидного, пуринового обменов и артериальной гипертензией, влекущий повышенную резистентность тканей к инсулину. Серебренникова, Гузовская и Семинский в своем пособии метаболический синдром определяют как неуклонно прогрессирующий процесс, включающий абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность, гипергликемию, дислипидемию, нарушение системы гемостаза, хроническое субклиническое воспаление, повышение уровня мочевой кислоты (Серебренникова и др., 2017).

Одним из последствий метаболического синдрома является ожирение – увеличение количества жировой ткани ввиду нарушения в обновлении клеток, пролиферации стволовых или прогениторных клеток, дифференцировке и созревании адипоцитов (Sysoeva et al., 2024). Это может привести к сахарному диабету, сердечно-сосудистым болезням, раку толстой кишки и поджелудочной железы, неалкогольной жировой болезни печени, некоторым заболеваниям, связанным с опорно-двигательным аппаратом и психическим здоровьем. Согласно данным на 2019 год, около трети населения земли имеет проблемы в этой области: избыточный вес или ожирение (Chooi et al., 2019). ВОЗ признала ожирение неинфекционной эпидемией XXI века. В настоящее время изучение ожирения представляет особый интерес в связи с повышенным риском образования многих заболеваний у людей с избыточным весом, что снижает продолжительность жизни в среднем на 8–10 лет (Кляритская и др., 2009).

Патологии, смоделированные на мышах, отличаются от человеческих заболеваний во многих аспектах. Наличие гипертонии у мышей с ожирением тоже неоднозначно. Таким образом, ни одна модель на мышах не может в точности воспроизвести все аспекты метаболического синдрома у людей. Но мыши все же имеют некоторые симптомы метаболического синдрома, схожие с человеческими: например, окружность талии, инсулинорезистентность, рост веса. Несмотря на то что одним из наиболее удобных объектов для моделирования метаболического синдрома остаются эти животные. Во-первых, мыши на диете с повышенным содержанием жиров и углеводов приобретают симптомы метаболического синдрома быстрее всех остальных потенциальных подопытных: всего за несколько месяцев. Во-вторых, относительно просто изучать эффекты отдельных генов, выводя трансгенные или нокаутные линии для определения влияния определенного гена на метаболический синдром. (Kennedy et al., 2010).

T-кадгерин – белок семейства кадгеринов, отвечающих за межклеточные взаимодействия. Они связываются с актиновыми филаментами

через адаптерные белки – катенины, которые могут в зависимости от состояния кадгерина запускать определенные гены. Кадгерины могут представлять собой трансмембранные белки заякоривающих контактов: например, адгезионных, отвечающих за механическое сопряжение клеток и их совместное сокращение, передачу сигналов.

Классические кадгерины обеспечивают межклеточное взаимодействие, образуя олигомеры за счет связывания домена EC1 одной молекулы, отвечающего за межклеточное взаимодействие между клетками, на поверхности которых экспрессируется Т-кадгерин, с доменом EC2 другой молекулы при взаимодействии в цис-конформации (обе молекулы находятся на мембране одной клетки) и за счет EC1-EC1 взаимодействия в транс-конформации (молекулы – на разных клетках) (Harrison et al., 2011). У Т-кадгерина есть внеклеточные кадгериновые домены (extracellular cadherin, EC1-EC5), гомологичные классическим кадгеринам, но отсутствуют трансмембранный и внутриклеточный домены. На мембране он заякорен при помощи гликозилфосфатидилинозитного (ГФИ) остатка (рис. 1) (Ranscht et al., 1991). Т-кадгерин отличается тем, что его EC1 стабилен в мономерной форме (не образует EC1-EC1), а EC1-EC2 образуют X-димер (рис.1, В), который для классических кадгеринов является лишь переходной формой при образовании структурно иного димера (Ciatto et al., 2010). При гиперэкспрессии Т-кадгерина *in vitro* он также может обеспечивать адгезию клеток, но ЛПНП ее подавляет (Resink et al., 1999), благодаря образованию более стабильного комплекса Т-кадгерин-ЛПНП (KD dimer = 41мкМ (Ciatto et al., 2010), KD LDL =0,1 мкМ (Tkachuk et al., 1994)).

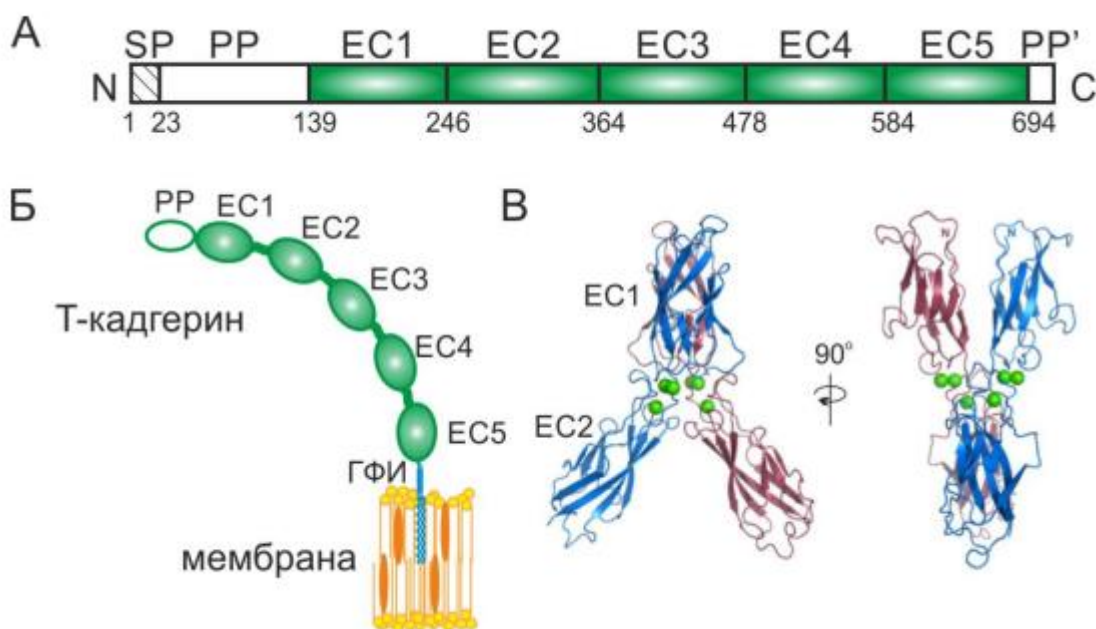


Рисунок 1. Структурные особенности Т-кадгерина.

А. Доменная организация препробелка Т-кадгерина. SP – сигнальный пептид, PP – пропептид, EC1-EC5 – внеклеточные кадгериновые домены (зеленые), PP' – пропептид, который заменяется на ГФИ-якорь. Числами обозначены первые аминокислотные остатки доменов.

Б. Схематическое изображение структуры Т-кадгерина на поверхности мембраны. Обозначения те же, ГФИ – ГФИ-якорь (синий) на мембране (желто-оранжевая). В. Структура X-димера (из (Ciatto et al., 2010)) первых двух доменов (EC1 и EC2) со связанными ионами кальция (зеленые).

Увеличение концентрации липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в крови может повлечь развитие атеросклероза (Matsuda et al., 2014) с последующей ишемической болезнью сердца или инфарктом миокарда и обострить их последствия (Denzel et al., 2010). ЛПНП действуют на клетки сосудов как за счет запуска внутриклеточной сигнализации, так и за счет его накопления эндоцитозом (Goldstein et al., 1977). ЛПНП в гладкомышечных, эндотелиальных клетках и фибробластах запускает быструю гормоноподобную внутриклеточную сигнализацию, что приводит к пролиферации и миграции (Kirmen-Korgun et al., 2005). Доказано, что сигнальные эффекты запускаются через Т-кадгерин (Рубина, 2005). Т-кадгерин способен связываться с липопротеинами низкой плотности, участвующими в атерогенных процессах. Связавшись с ЛПНП, рецептор запускает внутриклеточный каскад, содержащий в себе кальциевый сигналинг, который приводит к пролиферации гладкомышечных клеток. Это может повлечь за собой образование атеросклеротических бляшек.

У Т-кадгерина есть еще один лиганд, имеющий большую аффинность по сравнению с предыдущим, – высокомолекулярная форма адипонектина. Адипонектин – это гормон жировой ткани, который, в отличие от ЛПНП, в свободной форме защищает от патологий сердечно-сосудистую систему (Nug et al., 2004). Т-кадгерин связывается с адипонектином на поверхности клеток сердца, аорты и скелетных мышц. Взаимодействие Т-кадгерина с адипонектином необходимо для реализации защитных механизмов различных сердечно-сосудистых патологий (Denzel et al., 2010). Повышенный уровень адипонектина, связанного с Т-кадгерином, может вызывать стеатоз печени (Nicolas et al., 2017).

В своей работе мы решили смоделировать у мышей с нокаутом по гену Т-кадгерина метаболический синдром с помощью высококалорийной диеты и выявить влияние этой молекулы на его образование и развитие, а также на весь организм. Как было сказано ранее, синдром повышает резистентность тканей к инсулину, а значит, одним из наиболее простых методов выявления зависимости может служить измерение скорости поглощения глюкозы из крови после ее туда введения. Скорость поглощения глюкозы из крови регулируется инсулином – гормоном поджелудочной железы, ответственным за активацию внутриклеточного каскада, приводящего к встраиванию в мембраны клеток белков-переносчиков глюкозы (Cheatham et al., 1995).

Для диагностирования метаболического синдрома у мышей используют разные критерии, среди которых можно выделить инсулинорезистентность и рост веса. Именно на них мы опирались в нашей работе.

Известный состав корма, использованного в качестве стимула для развития метаболического синдрома, важен для большего удобства контроля эксперимента. Он состоит из человеческих продуктов и имитирует нездоровое питание, которое, как известно, у человека приводит к развитию метаболического синдрома. Доля жиров при приготовлении Cafeteria diet может составлять до 60%, в то время как нормальная их доля в рационе

грызунов составляет около 11% (Gajda et al., 2007). Поэтому мы использовали именно cafeteria diet (Zeeni et al., 2015).

Цель нашей работы:
Выявить влияние нокаута гена Т-кадгерина (CDH13) на развитие метаболического синдрома у мышей.

- Задачи:
- Сравнить мышей дикого типа с мышами, нокаутными по Т-кадгерину, относительно изменения веса, выяснив влияние количества потребленных корма и воды на его рост.
 - Сравнить мышей дикого типа с мышами, нокаутными по Т-кадгерину, относительно изменения концентрации глюкозы в крови.
 - Сравнить мышей дикого типа с мышами, нокаутными по Т-кадгерину, относительно изменения скорости поглощения глюкозы из крови
 - Сравнить мышей дикого типа с мышами, нокаутными по Т-кадгерину, относительно изменения артериального давления и частоты сердечных сокращений.

Материалы и методы.

Животные.
Для исследований мы использовали самцов мышей линий C57Bl/6 и TCADko (мыши, нокаутные по гену Т-кадгерина). Мыши в каждой из групп содержались на двух типах диет: стандартной (Standart diet) и высоколипидной (Cafeteria diet). В эксперименте участвовали 46 мышей, их распределение по группам представлено в таблице ниже (табл.1).

Таблица 1. Количество животных в каждой группе, участвовавшей в эксперименте. Standart diet – мыши, питавшиеся стандартным кормом для грызунов, Cafeteria diet – мыши, питавшиеся кормом с повышенным содержанием жиров, C57Bl/6 – мыши с нормальным генотипом, T-CADko – мыши с нокаутом по гену Т-кадгерина.

	C57Bl/6	T-CADko
Standart diet	10	11
Cafeteria diet	14	11

Мыши с нокаутом Т-кадгерина (TCADko) были получены путем скрещивания мышей Cdh13loxP/loxP, имеющих 2 loxP-сайта, фланкирующих экзон 3 гена Cdh13, и мышей, конститутивно экспрессирующих Cre-рекомбиназу (рис. 2) (Porov et al., 2023).

Поскольку нокаут гена Т-кадгерина поддерживается в гомозиготном состоянии и при его разведении не образуется мышей дикого типа, мы использовали мышей линии C57Bl/6, которые были предоставлены Питомником лабораторных животных «Пушино» и после этого разводились в виварии лаборатории Трансляционной медицины ФФМ МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова. Так как нокаут был сделан на основе C57Bl/6, нами был выбран подходящий контроль.

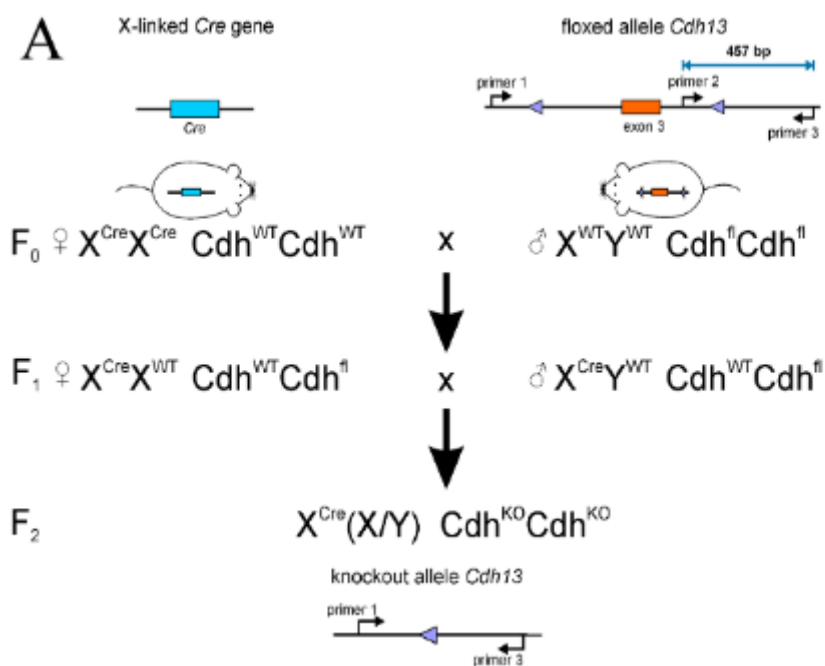


Рисунок 2. Получение мышей *Cdh13ΔExon3*(T-CADko).

Мыши *Cdh13loxP/loxP* были подарены профессором Джерардом Карсенти, (Kajimura D. et al., 2013) Columbia University, New York, NY 10027, USA, в то время как мыши с X-сцепленной конститутивной экспрессией Cre-рекомбиназы были получены из лаборатории Джексона (The Jackson laboratory).

Взрослых мышей T-CADko и мышей дикого типа (WT) C57BL/6J содержали в стандартных полипропиленовых клетках в контролируемых условиях вивария (температура: 20°C-24°C, влажность: 35%-65%, цикл свет/темнота 12 ч) при свободном доступе к пище и воде. Уход за животными и обращение с ними соответствовали Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS №123). Все процедуры проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях. Манипуляции с животными получили этическое одобрение местного этического комитета в соответствии с внутренними требованиями Комиссии по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (заявка № 3.4 от 19.05.2024).

Дизайн эксперимента.

Мыши входили в эксперимент в возрасте 7 недель и выходили в возрасте 18 недель. Каждую неделю мы взвешивали съеденный мышами корм и выпитую воду, а раз в две недели проводили измерения артериального давления, частоты сердечных сокращений и глюкозотолерантный тест (рис. 3).

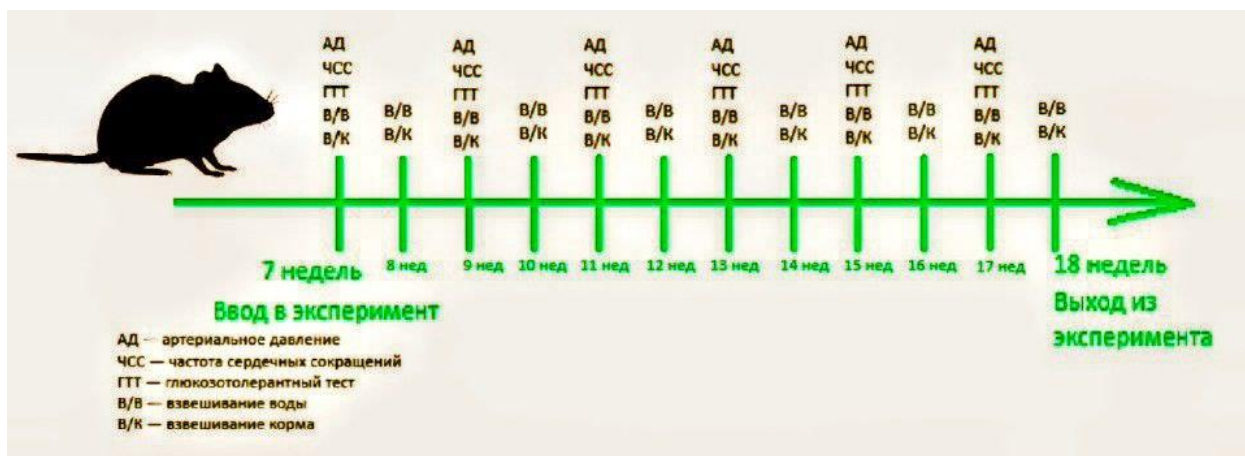


Рисунок 3. Дизайн исследования. АД — артериальное давление, ЧСС — частота сердечных сокращений, ГТТ — глюкозотолерантный тест, В/В — взвешивание воды, В/К — взвешивание корма.

Контрольная группа мышей питалась стандартным кормом для содержания лабораторных животных ПК-120-1, приготовленным по ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» (standard diet), экспериментальная — пищей с повышенным содержанием жиров и углеводов (cafeteria diet) (Zeeni et al., 2015). Для получения корма, предназначенного для животных второй группы, смешивали 100 г печенья изготовителя „Коломенское поле” классического, 50 г молочного шоколада марки „Аленка”, 100 г арахисовой пасты, измельчали и скатывали в шарики для удобства дозировки.

Полученный корм содержал 35 г белков, 77 г жиров, 104 г углеводов и 1540 ккал на порцию величиной в 250 г корма.

Глюкозотолерантный тест.

Глюкозотолерантный тест мышам проводили по методике, описанной в статье Анисимовой (Anisimova et al., 2020) с изменениями.

За 6 часов до глюкозотолерантного теста мышей лишали еды. Мышам из каждой клетки поочередно измеряли первоначальный уровень глюкозы в крови с помощью глюкометра ContorPlus®. Сразу же после этого мышам вводили по 0.1 мл водного раствора глюкозы концентрацией 40% в нижнюю треть брюшной полости шприцом объемом 1 мл с иглой калибра 29G 0,45мм в диаметре. С промежутками в 15, 30 и 60 минут с момента введения измеряли концентрацию глюкозы в крови в хвостовой вене у каждой мыши и результаты заносили в таблицу. Для этого в хвостовой вене животного иглой делали прокол, подносили глюкометр с вставленной тест-полоской, и он автоматически отбирал каплю крови. После теста измеряли вес мышей и возвращали корм. Из полученных данных высчитывали AUC, выраженный в площади под графиком зависимости уровня глюкозы в крови от времени. Чем выше этот показатель, тем больше средние значения глюкозы в точках времени и тем выше темпы роста в его промежутках, что свидетельствует о снижении чувствительности клеток к глюкозе (Anisimova et al., 2020).

Измерение давления и ЧСС.

Следующий метод был нами освоен, но измерения, использованные в работе, проводились другим сотрудником. Измерения проводились неинвазивно. Мышей помещали в пластиковые рестрейнеры и клали на коврик с подогревом. Затем, когда в течение 10 минут животные подогревались до температуры около 28°C, на хвост мышей надевали специальную манжету, а потом инфракрасный датчик пульса. На основе данных с датчика определяли частоту сердечных сокращений, а с помощью манжеты – артериальное давление. Эти данные были получены с помощью прибора «Систола», присоединенного к компьютеру с одноименным приложением для интерпретации полученных данных. Измерения проводятся на основании плетизмографа, а значит, это непрямой способ, не дающий хороших абсолютных значений, но позволяющий оценить динамику. Поэтому мы и смогли использовать в нашей работе такой способ измерения давления.

Взвешивание воды и корма.

Раз в неделю мы взвешивали поилку до и после наполнения ее новой порцией воды и то же самое проделывали с кормом. Потребление пищи и воды измеряли на целую клетку и полученные данные делили на количество мышей в ней.

Статистическая обработка данных

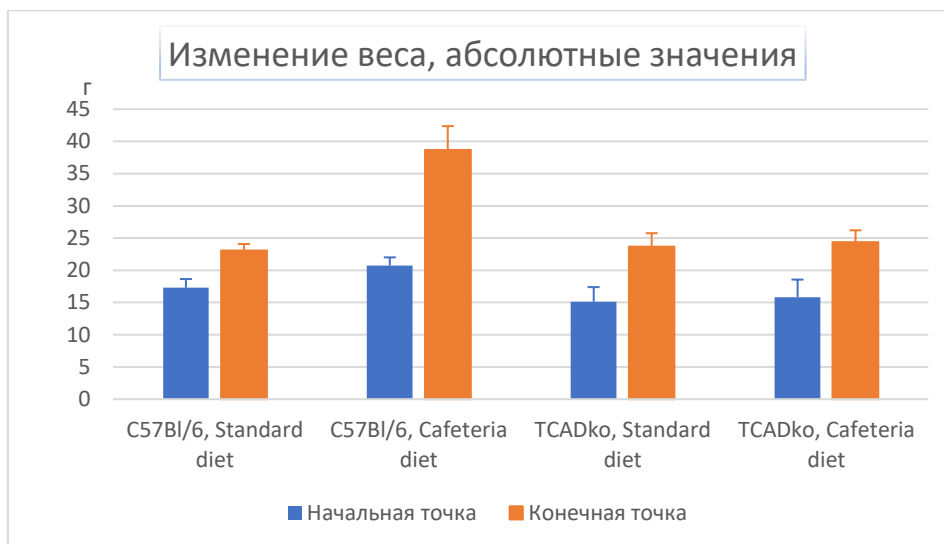
Все полученные данные заносили в гугл таблицы и обрабатывали с помощью функций этого ресурса, таблиц Excel и сайта, где проводился тест Mann-Whitney(<https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/>). Этот тест мы использовали для проверки достоверности всех наших результатов

Результаты

Динамика веса

Ниже представлена гистограмма абсолютных значений веса животных, участвующих в эксперименте (рис. 4). Синими столбцами отражены начальные показатели веса, оранжевыми – конечные. Поэтапные значения хода набора веса, как и промежуточные значения в экспериментах с остальными критериями, можно рассмотреть на графиках, представленных в приложении 1. Для графиков использовались средние арифметические по каждой группе, для разбросов – стандартное отклонение.

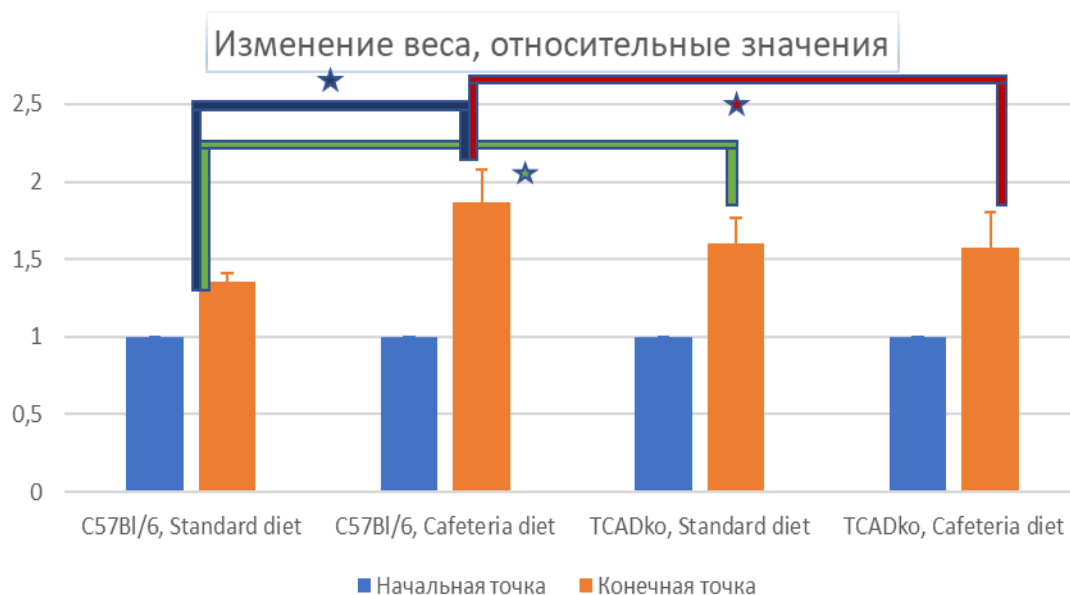
Рисунок 4. Гистограмма изменения веса, абсолютные значения.



Из-за разного начального веса мышей нельзя с уверенностью интерпретировать эти результаты. Поэтому ниже приведена гистограмма относительных значений, отображающая отношение веса в определенный момент времени к значению веса в начале опыта (рис. 5). Для соответствующих им графиков также использовались средние арифметические по каждой группе, а для разбросов – стандартное отклонение.

На гистограмме видно, что мыши линии C57Bl/6 на высококалорийной диете набрали вес значительно сильнее, чем на стандартной, что подтвердилось статистически ($p\text{-value}=0.00012$). Мыши линии T-CADko, в отличие от них, независимо от диеты толстели почти одинаково. Между двумя группами мышей этой группы не была выявлена статистическая разница ($p\text{-value}=0.41794$). Между группами двух линий, сидящих на стандартной диете, как и между теми же на высококалорийной, с помощью статистического теста была обнаружена разница ($p\text{-value}=0.00038$ и $p\text{-value}=0.01242$ соответственно).

Рисунок 5. Гистограмма изменения веса, относительные значения.



Потребление корма и воды

Мы считаем важным проверить, нельзя ли объяснить разницу в привесе между разными группами мышей количеством потребленных ими корма и воды.

Следующие графики построены на основе средних значений веса съеденного корма (рис. 6) и выпитой воды (рис. 7) соответственно каждой мышью. Значения эти, в свою очередь, были получены путем усреднения, то есть деления показателя, отражающего вес потребленной пищи или воды целой клеткой, на количество мышей в ней. Таким образом, на каждую группу исследуемых животных пришлось ровно столько независимых измерений, в скольких клетках они находились, что, конечно, перекрыло возможность оценить наши результаты статистически. Тем не менее мы используем эти показатели, дабы хотя бы визуальное их проконтролировать. По графику потребления корма, представленному ниже и воспроизведенному путем нахождения среднего арифметического и стандартного отклонения, видно, что в течение эксперимента различия между четырьмя группами были крайне малы. Однако мы можем заметить, что в финальной точке потребление корма мышами линии TCADko превосходит в своем показателе потребление пищи мышами дикого типа, хотя эта разность не слишком значительна и не может влиять на динамику веса животных. То же заключение можно сделать и касаясь графика потребления воды: в конце исследования нокаутные мыши визуально пили больше.

Как было сказано ранее, мы не можем рассчитывать на статистический анализ, чтобы выявить между набором веса грызунов и количеством ими съеденного и выпитого достоверную закономерность. Но из общего вида построенных графиков мы можем сделать вывод, что рассмотренные нами показатели не играют в эксперименте весомой роли.

Рисунок 6. График потребления корма мышами.

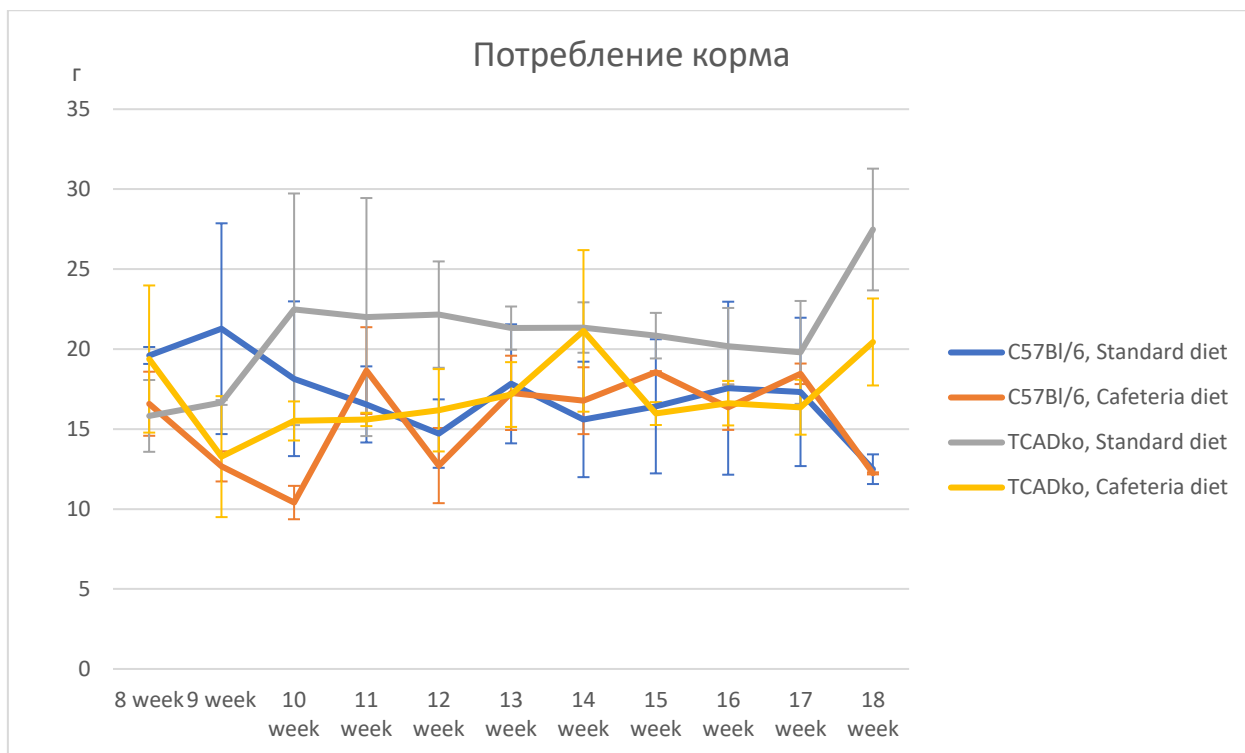
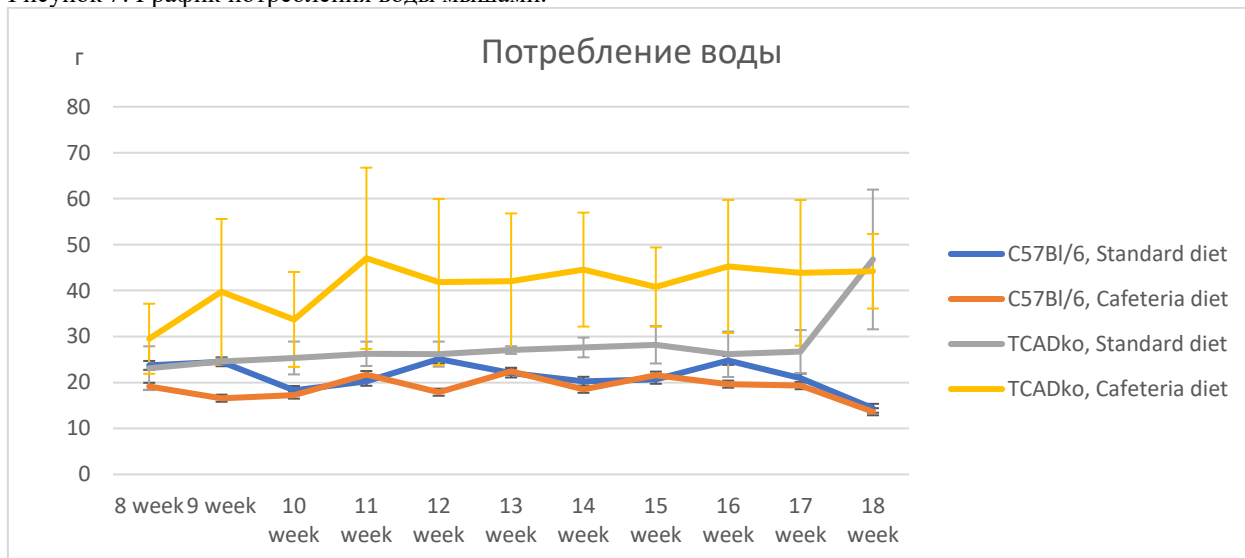


Рисунок 7. График потребления воды мышами.



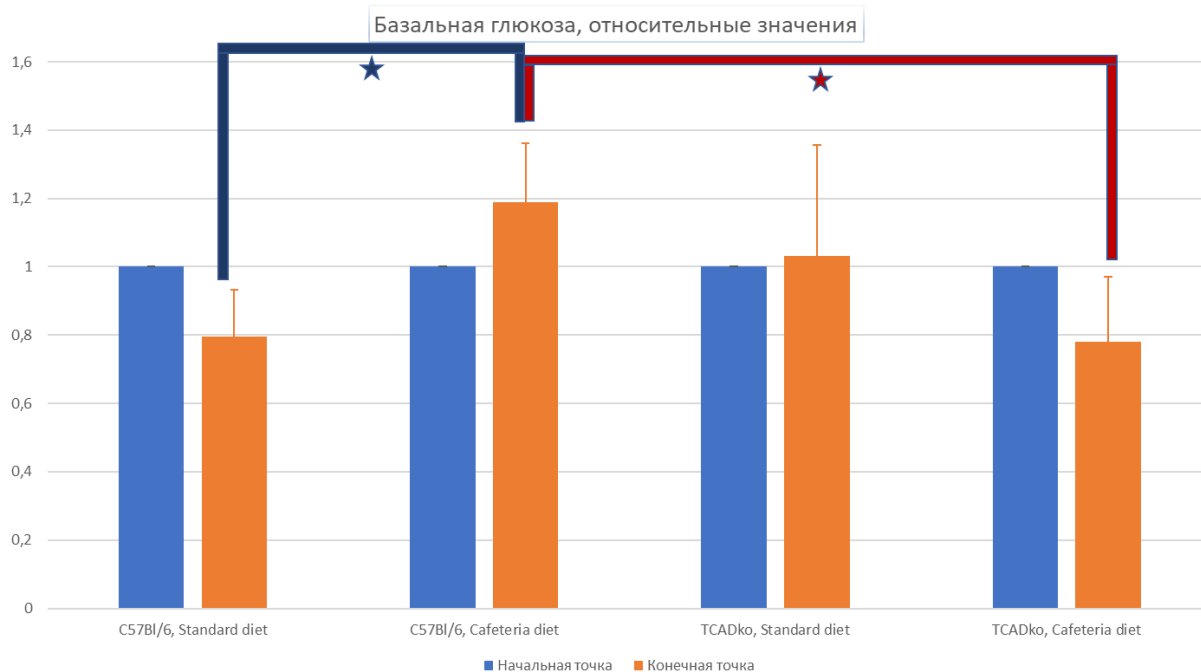
Динамика концентрации глюкозы в крови.

На гистограмме относительных значений базальной глюкозы (рис. 8) отражены уровни базальной глюкозы в крови в начале и в конце эксперимента у разных мышей в ммоль/л. Для построения графиков снова использовались средние арифметические по каждой группе, а для разбросов – стандартное отклонение. По гистограмме отчетливо заметно, что у группы линии C57Bl/6 на Cafeteria diet в итоге был повышен базальный уровень глюкозы по

сравнению с тремя остальными группами, значения измерений уровня глюкозы которых близятся к равным. Как и в разделе, посвященном приросту мышинного веса, между мышами линии TCADko, сидящих на разных диетах, итоговой разницы в показателях базальной глюкозы почти не прослеживается, что подтвердилось статистически ($p\text{-value}=0.08364$), в отличие от ситуации с мышами дикого типа, среди которых представители группы на высококалорийной пище представляют вниманию сильно более высокие значения. Последнее также подтвердилось тестом ($p\text{-value}=0.00048$). Как и можно было заключить из гистограмм, между конечными результатами двух линий грызунов на стандартной диете достоверных различий найдено не было ($p\text{-value}=0.07186$), в то время как между мышами на высококалорийной диете выявлена достоверная разница ($p\text{-value}=0.00062$).

Стоит учитывать, что большие разбросы в начальных точках графика и гистограммы, способствующие большей усредненности показателей, могут нести стрессовую природу участвующих в эксперименте мышей, еще не привыкших к нам в начале процедур и, следовательно, имеющих большую вероятность получить много дополнительной глюкозы в кровь в результате действия адреналинового каскада. Поэтому эти значения могут иметь артефактный характер. Нормальный уровень базальной глюкозы у взрослых самцов мышей натошак примерно равен $6,79 \pm 0,23$ ммоль/л (Залаева, 2017), а по нашим результатам средний уровень стабильно повышен, что, вероятно, подтверждает эту теорию.

Рисунок 8. Гистограмма изменения уровня базальной глюкозы в крови, относительные значения.



Динамика метаболизма глюкозы.

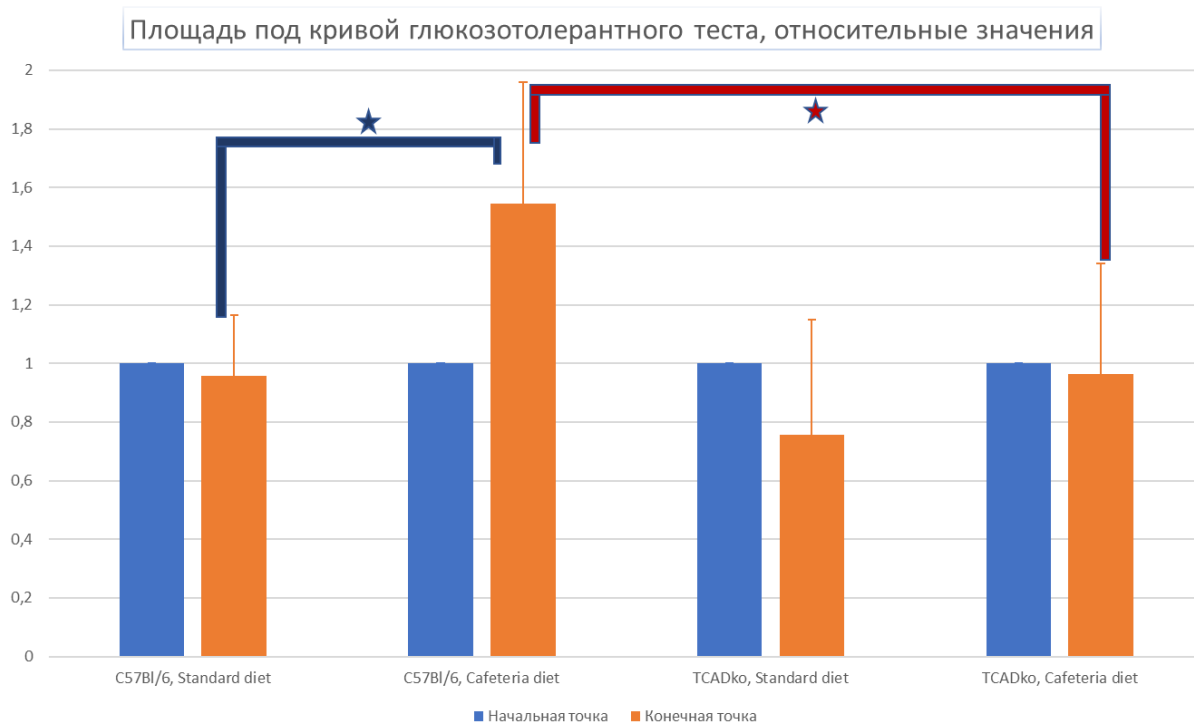
По гистограмме AUC, в отличие от гистограмм, отражающих предыдущие результаты, заметна разница между мышами линии TCADko, питающимися разными типами корма, как и внутри группы дикой линии.

Оценив AUC двух групп мышей дикого типа, мы увидели расхождение ($p\text{-value}=0.0035$), но в случае с мышами с нокаутом достоверная разница найдена не была ($p\text{-value}=0.08364$).

Однако заметно сильное расхождение групп на высококалорийной и стандартной диетах на последней неделе исследования (рис. 9). Изначально AUC мышей дикого типа и нокаутных мышей на Cafeteria diet значительно различался (приложение 1, рис. 4а), но на последней неделе исследования его значения стали близки, образовав разницу с группами на стандартной диете. Из этого мы можем сделать вывод, что cafeteria diet одинаково влияет на нарушение работы регуляции уровня глюкозы у обеих линий мышей. Между группами на Cafeteria diet обнаружилось различие ($p\text{-value}=0.00278$), а на нормальной диете – нет ($p\text{-value}=0.08364$).

Так же, как и в предыдущем измерении, важно иметь в виду, что большие разбросы в начальных точках графика могут объясняться высоким уровнем испуга животных.

Рисунок 9. Гистограмма изменения AUC у мышей, абсолютные значения.



Давление.

У мышей дикого типа на высококалорийной диете в течение всего эксперимента относительные значения систолического давления (рис. 10) значительно ниже, чем у остальных групп, практически не различающихся между собой относительно этого показателя. На графике относительных значений диастолического давления (рис. 11) можно наблюдать то же самое, но с менее заметной разницей. Между двумя группами мышей дикого типа статистически выявлена разница относительно систолического давления ($p\text{-value}=0.01242$) и диастолического ($p\text{-value}=0.04444$).

Рисунок 10. Гистограмма изменения систолического артериального давления у мышей, относительные значения.

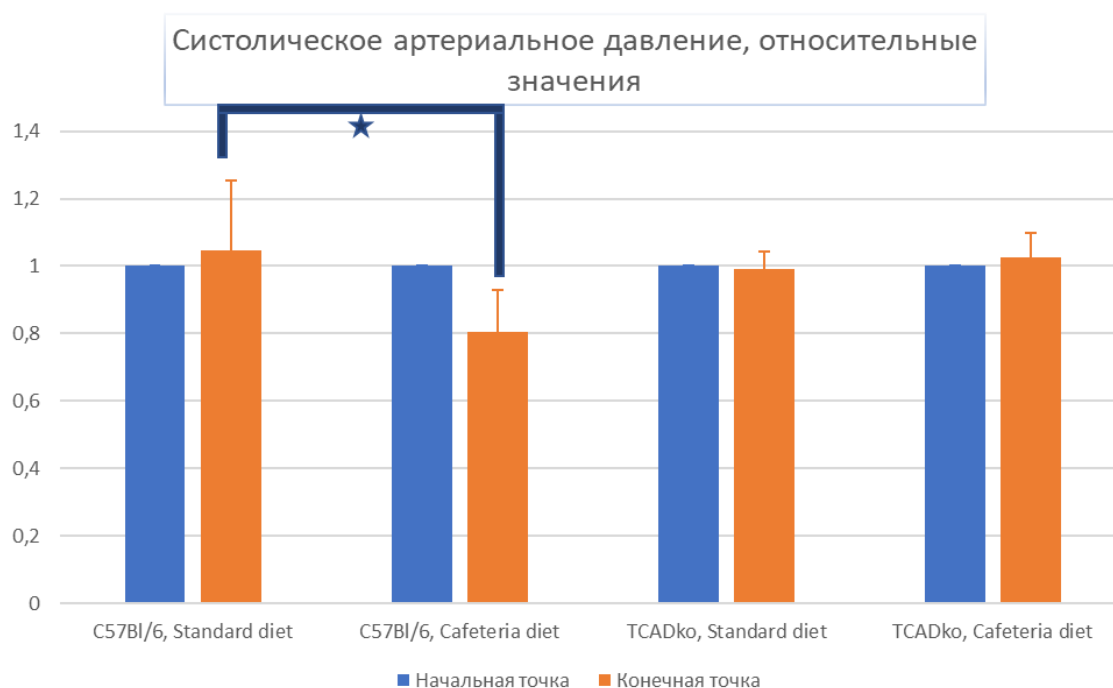
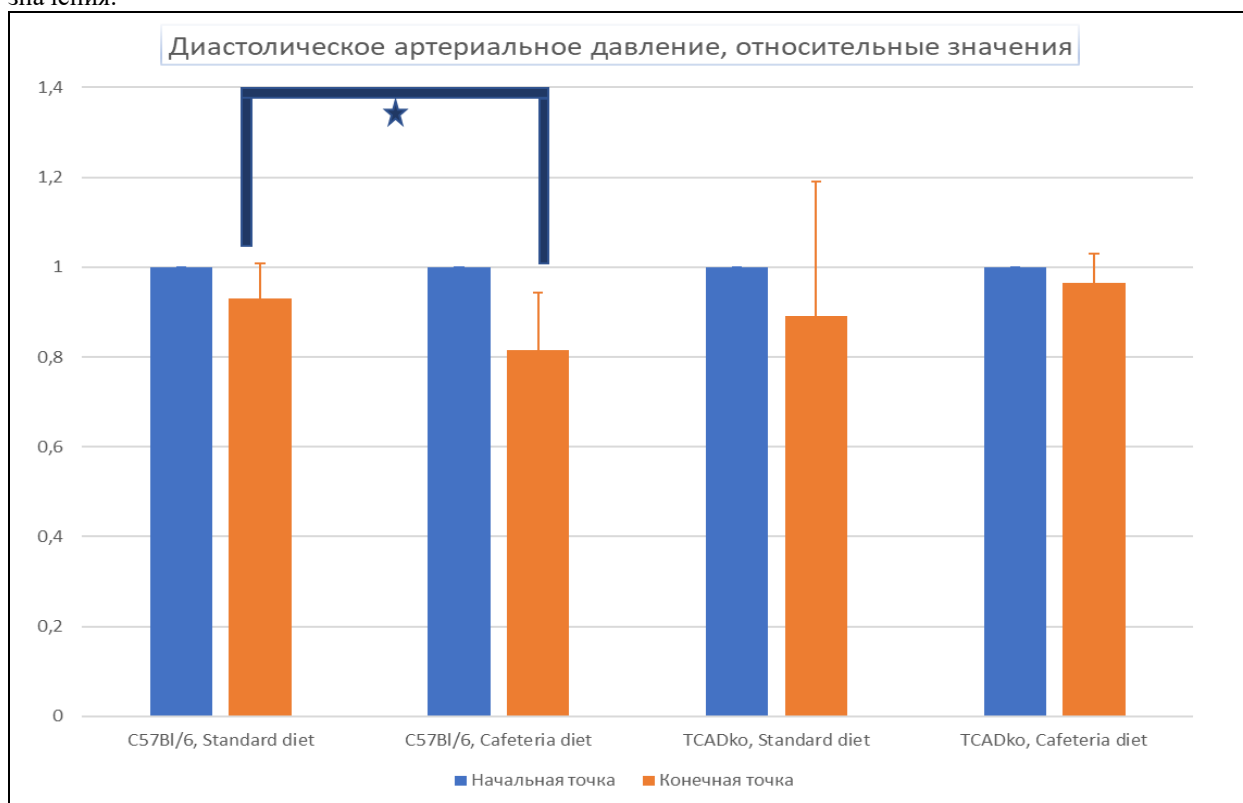


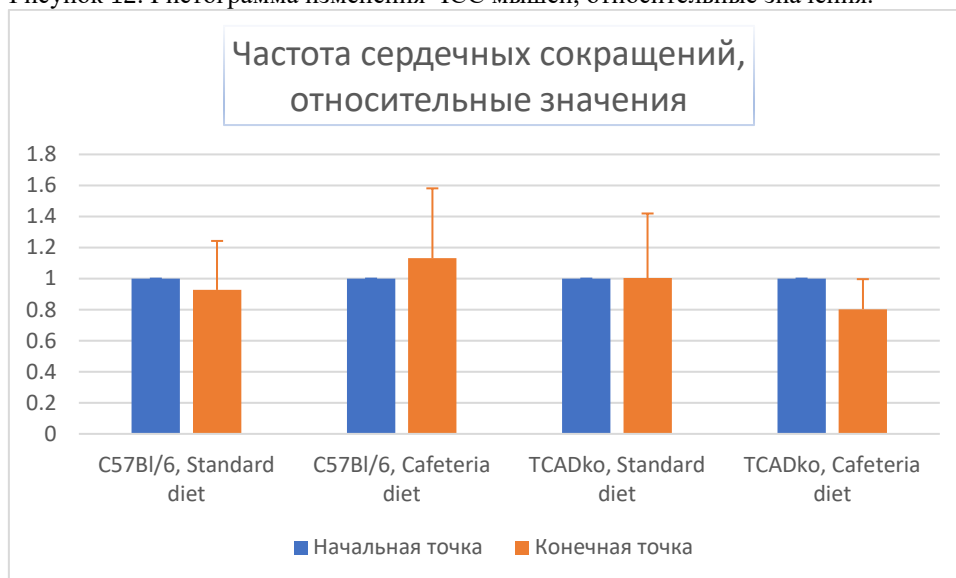
Рисунок 11. Гистограмма изменения диастолического артериального давления у мышей, относительные значения.



ЧСС.

На графике частоты сердечных сокращений (рис. 12) нет различий между разными группами, что подтвердилось статистическим сравнением.

Рисунок 12. Гистограмма изменения ЧСС мышей, относительные значения.



Обсуждение

Одним из наиболее важных показателей для нашего исследования было измерение динамики веса грызунов. В начальной точке вес наших мышей имел разные значения: часть мышей дикого типа весила примерно столько же, сколько весят в среднем мыши этой линии (около 21г, по данным питомника Пушино, откуда были получены мыши C57Bl/6), а часть весила меньше нормы. Мыши же нокаутные весили меньше, чем дикого типа. Это может объясняться повышенной концентрацией свободного адипонектина в крови с рождения, из-за чего они набирают вес медленнее.

Из результатов мы увидели, что внутри группы мышей с нормально работающим Т-кадгерином особи на высококалорийной диете толстели быстрее, чем на стандартной, и быстрее, чем все остальные группы нашего эксперимента, чего и следовало, конечно, ожидать. Связавшись с адипонектином, Т-кадгерин способствует потере главного предназначения гормона, заключающегося в расщеплении белого жира. В случае с высококалорийным питанием связывание белка-рецептора с ЛПНП, содержащимися в такой пище в огромном количестве, и запуск сигнального пути, который в итоге приводит к разрастанию жировой ткани, тоже дает свой эффект. Не столь очевидным на первый взгляд нам представляется факт того, что мыши с нокаутом по гену рецептора независимо от диеты набирали вес почти в одинаковой мере. Отсутствие различия подтвердилось статистически. Можно было бы предположить, что по случайности мыши этой линии на стандартной диете съедали и выпивали сильно больше своих оппонентов на высококалорийной, компенсировав тем самым эту разницу. Но это было бы неправдоподобно хотя бы потому, что недостатку необходимых организму питательных веществ, который опосредован постоянными приемами пищи с повышенным содержанием жиров, было бы логичнее проявляться в

обостренном чувстве голода, нежели, напротив, сытости. Во всяком случае, отдельный анализ количества потребленных мышами корма и воды продемонстрировал достоверное доказательство, что разницы в этих показателях нет. Возможно, значения разницы веса внутри нокаутной линии неразличимы потому, что адипонектин, лишенный возможности выступить в роли лиганда, а потому находящийся в крови в свободной форме в больших количествах, сам является продуктом жировой ткани и, соответственно, пропорционален ее количеству. Чем более калорийная пища поступает в организм, тем большее количество ткани, продуцирующей гормон, в нем копится. Нельзя забывать, что не все действие ЛПНП опосредуется Т-кадгерином, поэтому, даже несмотря на отсутствие рецептора, метаболический синдром будет следствием «неправильной» диеты, и в этом случае адипонектин сравнивает показатели веса. Сравнив привесы мышей разных линий, по обеим типам диет мы получили достоверные различия: в группе мышей, сидящих на нормальном корме, сильнее толстели представители линии TCADko, однако среди тех, кто получал в рационе больше жиров и углеводов, напротив, больше веса набрали мыши с работающим Т-кадгерином. Первый из двух результатов кажется не вполне логичным. Объясняется это тем, что мыши дикого типа весят больше, чем нокаутные мыши, в сопоставимом возрасте, но в группу линии C57Bl/6 на стандартном корме нечаянно попали сильно недоразвитые мыши. Интересно, что в результате исследований мы также обнаружили неожиданный факт того, что под конец эксперимента мыши нокаутной группы стали потреблять больше пищи и воды. Итак, на основе полученных результатов можно сделать вывод, что влияние рациона на развитие метаболического синдрома у мышей, нокаутных по Т-кадгерину, и мышей с работающим белком различаются. При отсутствии рецептора жир накапливается без достоверной разницы в скорости и объеме независимо от диеты.

В качестве еще одного показателя мы взяли уровни базальной глюкозы у мышей разных групп. Результаты измерений свидетельствуют о том, что у мышей дикого типа на Cafeteria diet по окончании исследования был повышен базальный уровень глюкозы по сравнению с тремя остальными группами. Как было упомянуто в предыдущем абзаце, Т-кадгерин, связывающийся с ЛПНП, запускает клеточный каскад, приводящий к образованию атеросклеротических бляшек и способствующий повышению клеточной резистентности к инсулину, вследствие чего глюкоза поглощается клетками менее эффективно, задерживаясь в крови. У мышей линии TCADko вне зависимости от диеты в итоге получился практически равный уровень базальной глюкозы, как и в случае с весом. Это снова говорит о способности свободного от рецептора адипонектина контролировать разрастание жировой ткани, играющей большую роль в инсулиновом привыкании, в соответствии со скоростью ее образования. Сравнив две линии мышей на стандартной диете, а потом и на высококалорийной, мы не увидели ничего отличительного, в то время как уровень базальной глюкозы внутри группы мышей, сидевших на Cafeteria diet, был выше у дикой линии. Итак, основываясь на факте, что в

связи с метаболическим синдромом базальный уровень **глюкозы** поднимается выше нормального, мы можем предположить, что Т-кадгерин способствует развитию метаболического синдрома в совокупности с высококалорийной диетой.

Для определения скорости метаболизма глюкозы в крови животных мы использовали площадь под кривой глюкозотолерантного теста. Хотя на графике была заметна разница между АUC нокаутных мышей, находящихся на разных диетах, статистически она не подтвердилась, оставшись, как и в предыдущих измерениях, незначительной. Возможно, фактором чуть более заметного «скачка» группы на высококалорийной диете послужил стресс. Внутри группы дикой линии, как и было ожидаемо, различие подтвердилось. Инсулиновая резистентность этой группы особей повышена в сравнении со всеми остальными. Между двумя линиями на нормальной диете разница выявлена не была, в отличие от них же на высококалорийной. Этот результат логически соответствует предшествующему, однако они оба могут вызвать некоторые сомнения, поскольку они противоположны результатам очень схожего с нашим экспериментом исследования, описанного в недавно вышедшей статье (Okita T. et al., 2022) В ней авторы указывают на наличие такой формы Т-кадгерина, которая может способствовать пролиферации бета-клеток поджелудочной железы и, как следствие, улучшению эффективности их функций. У нокаутных в связи с этим наблюдались проблемы с метаболизмом глюкозы. У нас же получилось наоборот. Объяснить такое расхождение можно тем, что в нашем случае ген рецептора был «сломан» несколько иначе: у нас был убран третий экзон, в то время как в статье говорится о втором. Возможно, остаток белка в нашем случае отчасти имеет сродство с рецепторами, опосредующими пролиферацию бета-клеток, в отличие от случая, описанного в статье. То есть наши мыши производили растворимый неполноценно функционирующий Т-кадгерин, который мог вызывать пролиферацию бета-клеток, хоть и с меньшей эффективностью, чем это происходило у мышей дикого типа.

В своей работе мы также взяли во внимание некоторые сердечно-сосудистые показатели, среди которых были систолическое и диастолическое артериальное давления и частота сердечных сокращений. Единственное путное замечание, которое можно сделать относительно этих измерений, касается группы мышей дикой линии на высококалорийной диете. Их показатели и того, и другого давления заметно снижены по сравнению с остальными животными. Казалось бы, что это полностью противоречит действию метаболического синдрома на организм. Мы предполагаем, что это связано со слишком быстрым набором веса (со всеми вытекающими) этой группы животных: настолько резким, что ответная реакция на повышенное артериальное давление опережает его рост. Дополнительно между двумя группами мышей дикой линии мы выявили разницу относительно систолического давления ($p\text{-value}=0.01242$) и диастолического ($p\text{-value}=0.04444$). Стоит учитывать возможную неточность данных по причине повышенного уровня стресса животных в течение процедуры измерений.

Так как не выявилось достоверной разницы между привесами в нокаутной группе, в дальнейшем можно провести исследование внутри линии TCADko, используя более разнообразные типы питания. Таким образом можно будет выяснить, какую долю влияния оказывает на развитие метаболического синдрома именно корм, и, возможно, найти другие механизмы регуляции накопления жира. Можно проверить влияние гормонов грелина и лептина на количество съеденного и на развитие метаболического синдрома. Также будет интересно продлить эксперимент еще на несколько недель и выяснить причину повышения аппетита у животных, нокаутных по Т-кадгерину, с течением времени.

Выводы

1. Мыши с нокаутом по Т-кадгерину на двух разных диетах набирают вес одинаково и независимо от количества потребленных еды и воды.
2. Мыши с нокаутом по Т-кадгерину вне зависимости от питания имеют равный уровень базальной глюкозы в крови и близкий к уровню глюкозы мышей контрольной группы.
3. В совокупности с Cafeteria diet действие Т-кадгерина способствует увеличению инсулиновой резистентности подопытных.
4. Артериальное давление у мышей линии TCADko и представителей C57Bl/6, сидящих на стандартной диете, практически равно, в то время как у особей C57Bl/6 на высококалорийной диете оно сильно понижено в сравнении с остальными.

Обнаружено, что такие признаки метаболического синдрома, как набор веса, повышение резистентности к инсулину и замедление метаболизма глюкозы у нокаутных по Т-кадгерину мышей развиваются слабее по сравнению с мышами дикого типа. Это добавляет новые данные к уже имеющимся знаниям о роли Т-кадгерина в метаболических процессах и открывает путь к исследованию физиологических механизмов наблюдаемых явлений.

Список литературы

1. Залаева А. Б. Влияние глюкокортикоидов на уровень глюкозы в крови у мышей //Международный студенческий научный вестник. – 2017. – №. 6. – С. 15-15.
2. Кляритская И. Л., Максимова Е. В. Ожирение //Крымский терапевтический журнал. – 2009. – №. 2 (13). – С. 9-19.
3. Рубина К. А. Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии: дис. – Моск. гос. ун-т им. МВ Ломоносова, 2015.

4. Серебренникова С.Н., Гузовская Е.В., Семинский И.Ж. Патология метаболического синдрома. Учебное пособие. Иркутск, ИГМУ, 2016. – 54 с.
5. Anisimova M. V., Gong, Y., Yudin, N. S., Moshkin, Y., Gerlinskaya, L. A. Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2020. – V. 24. – №. 7. – P. 761.
6. Cheatham B., Kahn C. R. Insulin action and the insulin signaling network //Endocrine reviews. – 1995. – V. 16. – №. 2. – P. 117-142.
7. Chooi Y.C., Ding C., Magkos F. The epidemiology of obesity //Metabolism. – 2019. – V. 92. – P. 6-10.
8. Ciatto C. Bahna F., Zampieri N., VanSteenhouse H. C., Katsamba P. S., Ahlsen G., Harrison O. J., Brasch J., Jin X., Posy S., Vendome J., Ranscht B., Jessell T. M., Honig B., Shapiro L. T-cadherin structures reveal a novel adhesive binding mechanism //Nature structural & molecular biology. – 2010. – V. 17. – №. 3. – P. 339-347.
9. Denzel M. S. Scimia M-C, Zumstein P.M., Walsh K., Ruiz-Lozano P., Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice //The Journal of clinical investigation. – 2010. – V. 120. – №. 12. – P. 4342-4352.
10. Gajda M., Pellizzon M. A., Ricci M. R., Ulman E. A. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models //Animal Lab News. – 2007. – V. 74. – P. 775-793.
11. Goldstein L. J., Brown S. M. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis //Annual review of biochemistry. – 1977. – V. 46. – №. 1. – P. 897-930.
12. Harrison O. J., Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, Wu Y, Vendome J, Felsovalyi K, Hampton C. M, Troyanovsky R. B, Ben-Shaul A, Frank J, Troyanovsky S. M, Shapiro L, Honig B. The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins //Structure. – 2011. – V. 19. – №. 2. – P. 244-256.
13. Hug C., Wang J., Ahmad N.S., Bogan J.S., Tsao T., Lodish H.F. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101. – №. 28. – P. 10308-10313
14. Kajimura D., Lee H. W., Riley K. J., Arteaga-Solis E., Ferron M., Zhou B., Clarke C. J, Hannun Yu. A., DePinho R. A., Guo X E., Mann J J., Karsenty G. Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1 //Cell metabolism. – 2013. – V. 17. – №. 6. – P. 901-915.
15. Kennedy A.J., Ellacott K.L.J., King V.L., Hasty A.H. Mouse models of the metabolic syndrome //Disease models & mechanisms. – 2010. – V. 3. – №. 3-4. – P. 156-166.

- 16.Kipmen-Korgun D, Osibow K., Zoratti C., Schraml E., Greilberger J., Kostner G. M., Jürgens G., Graier, W. F., T-cadherin mediates low-density lipoprotein-initiated cell proliferation via the Ca²⁺-tyrosine kinase-Erk1/2 pathway //Journal of cardiovascular pharmacology. – 2005. – V. 45. – №. 5. – P. 418-430.
- 17.Matsuda K., Fujishima Y., Maeda N., Mori T., Hirata A., Sekimoto R., Tsushima Y., Masuda S., Yamaoka M., Inoue K., Nishizawa H., Kita S., Ranscht B., Funahashi T., Shimomura I. Positive feedback regulation between adiponectin and T-cadherin impacts adiponectin levels in tissue and plasma of male mice //Endocrinology. – 2015. – V. 156. – №. 3. – P. 934-946.
- 18.Nicolas A, Aubert R., Bellili-Muñoz N., Balkau B., Bonnet F., Tichet J., Velho G., Marre M., Roussel R., Fumeron F. T-cadherin gene variants are associated with type 2 diabetes and the fatty liver index in the French population //Diabetes & Metabolism. – 2017. – V. 43. – №. 1. – P. 33-39.
- 19.Okita T, Kita S, Fukuda S, Fukuoka K, Kawada-Horitani E, Iioka M, Nakamura Y, Fujishima Y, Nishizawa H, Kawamori D, Matsuoka TA, Norikazu M, Shimomura I. Soluble T-cadherin promotes pancreatic β -cell proliferation by upregulating Notch signaling //Iscience. – 2022. – **T**. 25. – №. 11.
- 20.Popov VS, Brodsky IB, Balatskaya MN, Balatskiy AV, Ozhimalov ID, Kulebyakina MA, Semina EV, Arbatskiy MS, Isakova VS, Klimovich PS, Sysoeva VY, Kalinina NI, Tkachuk VA, Rubina KA. T-cadherin deficiency is associated with increased blood pressure after physical activity //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 18. – P. 14204.
- 21.Ranscht B., Dours-Zimmermann M. T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region //Neuron. – 1991. – V. 7. – №. 3. – P. 391-402.
- 22.Resink T. J., Kuzmenko YS, Kern F, Stambolsky D, Bochkov VN, Tkachuk VA, Erne P, Niermann T. LDL binds to surface-expressed human T-cadherin in transfected HEK293 cells and influences homophilic adhesive interactions //FEBS letters. – 1999. – V. 463. – №. 1-2. – P. 29-34.
- 23.Sysoeva V., Semina, E., Klimovich, P., Kulebyakin, K., Dzreyan, V., Sotskaya, E., Shchipova A., Popov V., Shilova A., Brodsky I., Khabibullin N., Voloshin N., Tkachuk V., Rubina, K. T-cadherin modulates adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells: insights into ligand interactions //Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2024. – V. 12. – P. 1446363.
- 24.Tkachuk V. A., Kuzmenko, Y. S., Resink, T. J., Stambolsky, D. V., Bochkov, V. N. Atypical low density lipoprotein binding site that may mediate lipoprotein-induced signal transduction //Molecular pharmacology. – 1994. – V. 46. – №. 6. – P. 1129-1137.
- 25.Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role

Приложение 1

Рисунок 1а. График изменения веса мышей, абсолютные значения

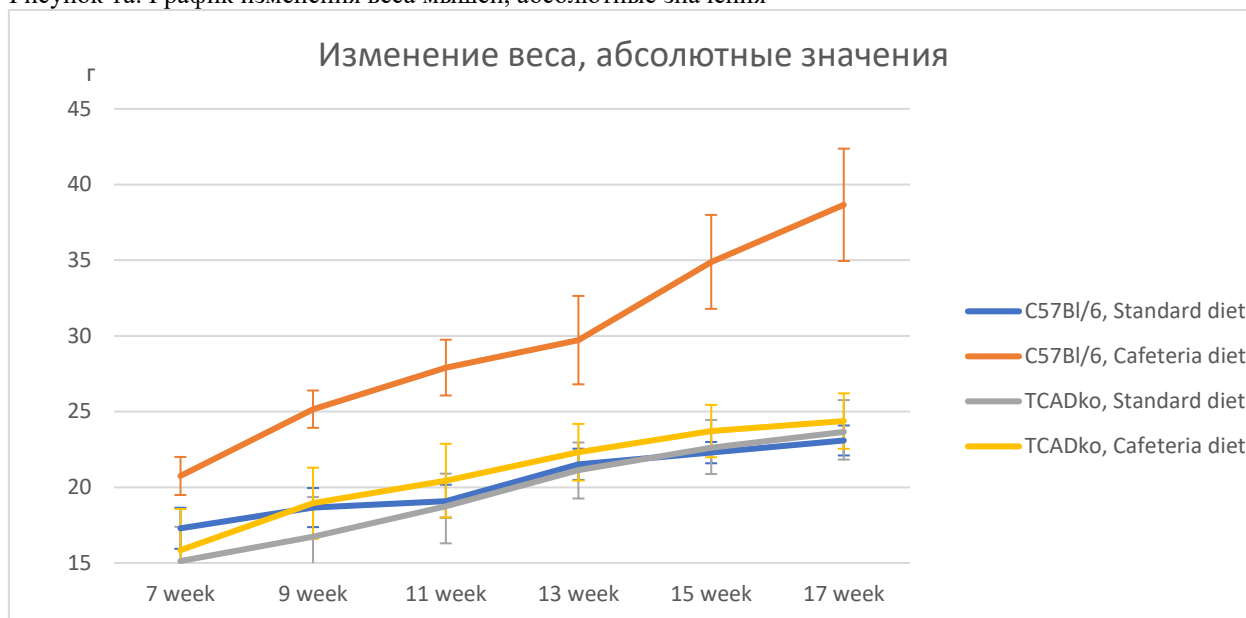


Рисунок 2а. График изменения веса мышей, относительные значения

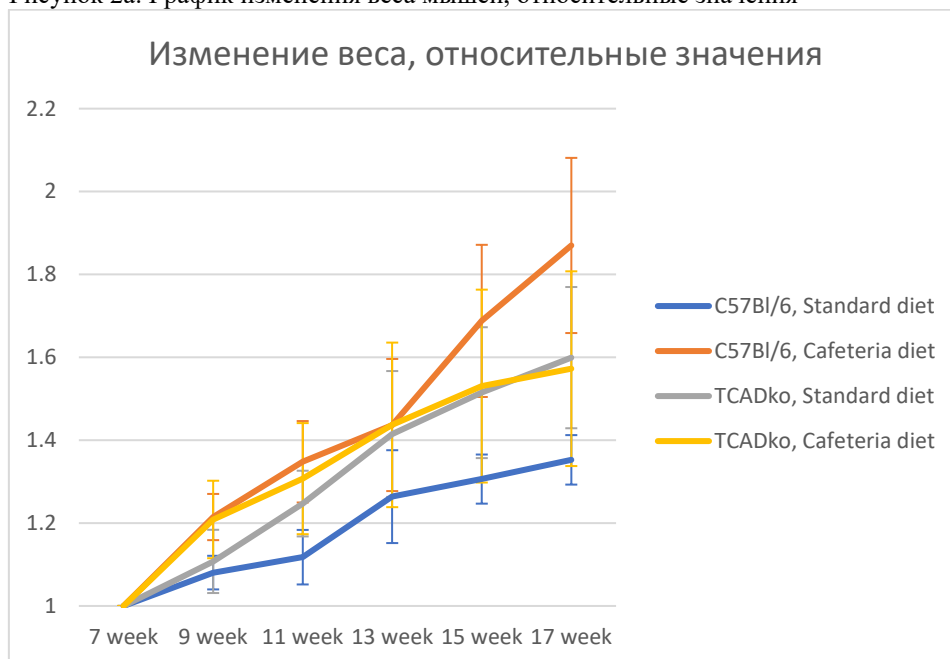


Рисунок 3а. График изменения базальной глюкозы в крови у мышей, абсолютные значения

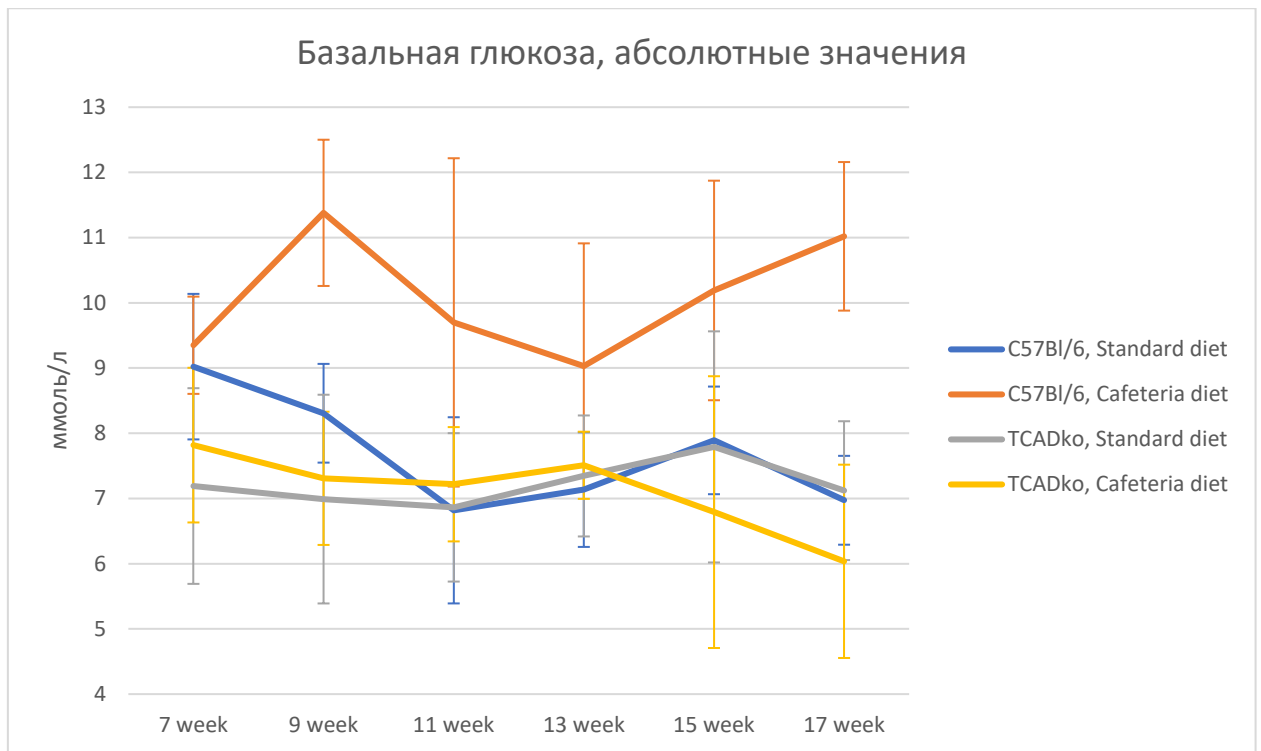


Рисунок 4а. График изменения AUC у мышей, абсолютные значения

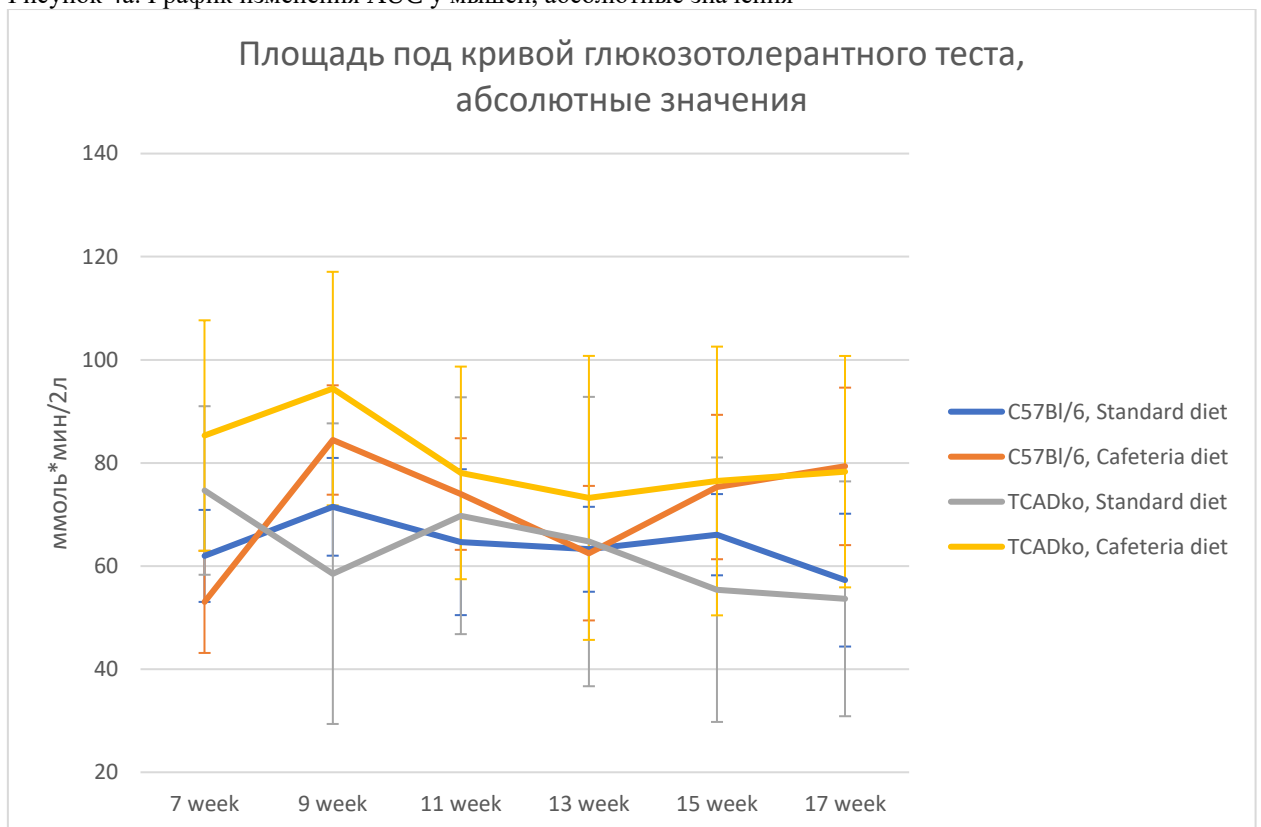


Рисунок 5а. График изменения систолического артериального давления мышей, относительные значения

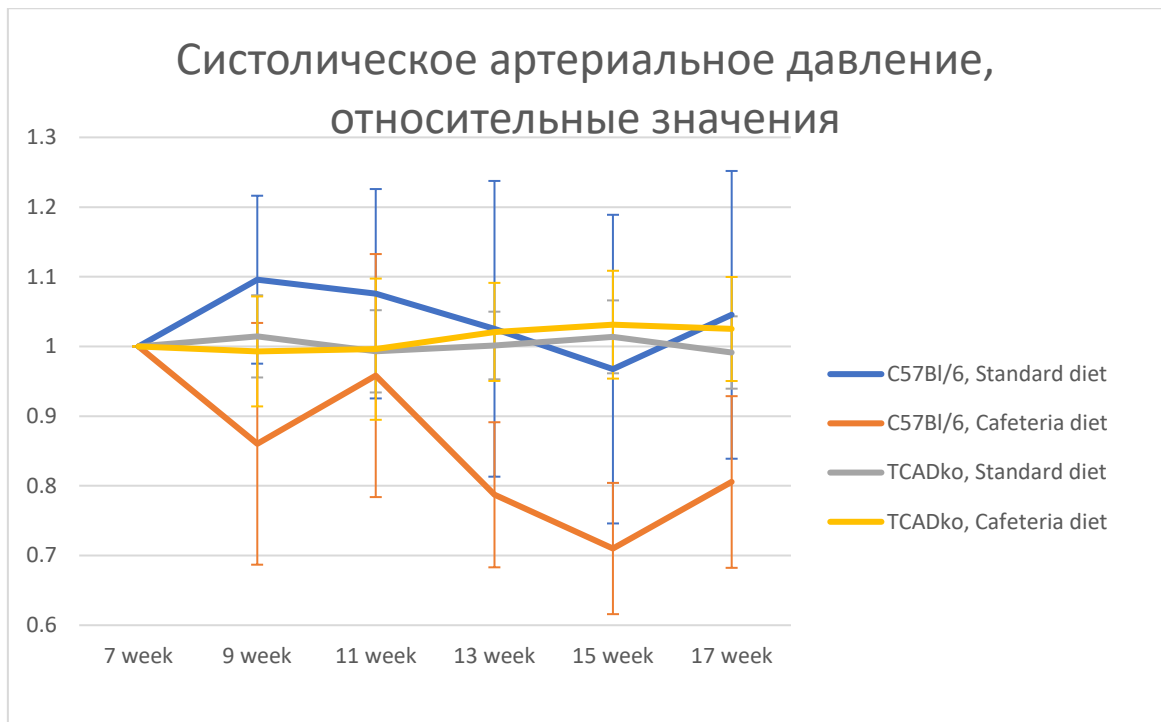


Рисунок 6а. График изменения диастолического артериального давления мышей, относительные значения

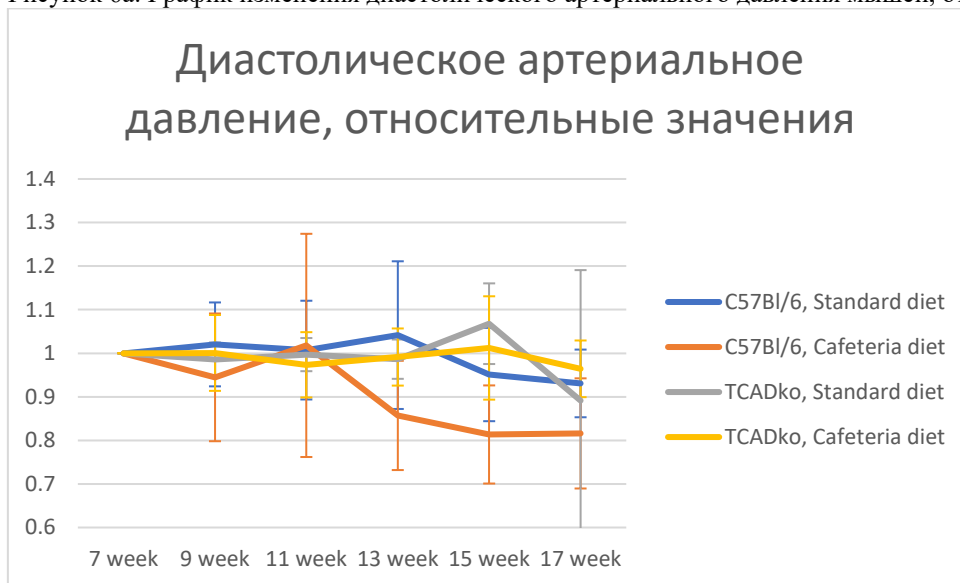


Рисунок 7а. График изменения частоты сердечных сокращений мышей, относительные значения

Частота сердечных сокращений, относительные значения

