ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА
Оригинальное исследование / Original article
УДК 577.175.642:612.349.8

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):427-434
DOI 10.18699/VJ20.635

Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина у самок и самцов мышей

Т.В. Яковлева[1] ✉, Н.Е. Костина[1], Е.Н. Макарова[1], Н.М. Бажан[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
✉ e-mail: jakov@bionet.nsc.ru

Аннотация. В настоящее время показано положительное влияние эстрадиола на чувствительность к инсулину на уровне целого организма у самок и самцов мышей. При этом чувствительность к инсулину в целом у самок выше, чем у самцов, и самцы демонстрируют большую склонность к развитию метаболических нарушений. Предполагают, что данные половые различия объясняются протективным действием эстрадиола у самок, но не у самцов. Эстрадиол является стероидным гормоном, и его действие обусловлено модуляцией экспрессии генов-мишеней, однако влияние эстрадиола на экспрессию генов, кодирующих трансдукцию сигнала инсулина и транспорт глюкозы в клетку, изучено недостаточно. Целью работы было сравнительное исследование молекулярных механизмов влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у мышей обоих полов. Исследовано влияние гонадэктомии и эстрадиола (1 мкг/животное, три дня) на экспрессию генов сигнального каскада инсулина в мышцах, жировой ткани и печени, а также на экспрессию *Fgf21*, рецепторов эстрадиола (*Esr1/2*) и транскрипционного фактора *Stat3* в печени у самок и самцов мышей. Ложно оперированные (ЛО) самцы отличались от ЛО самок сниженным уровнем эстрадиола, повышенным уровнем глюкозы и большей резистентностью к инсулину. В печени у ЛО самцов уровни мРНК *Irs2*, *Pik3cd* и *Esr1/2* были ниже, чем у ЛО самок. У самок гонадэктомия снижала уровень эстрадиола в крови, повышала резистентность к инсулину и уровень глюкозы в крови по сравнению с ЛО самками. Введение эстрадиола гонадэктомированным самкам снижало уровень инсулина в крови и резистентность к инсулину. У самцов гонадэктомия, наоборот, повышала уровень эстрадиола в крови, снижала резистентность к инсулину и уровень инсулина в крови. Введение эстрадиола гонадэктомированным самцам не оказывало влияния на исследованные показатели. Развитие инсулинорезистентности у гонадэктомированных самок было ассоциировано со снижением экспрессии гена *Irs2* в печени, а повышение чувствительности к инсулину у гонадэктомированных самцов – с увеличением уровней мРНК *Irs2* и *Pik3cd* в печени. Можно предположить, что повышение уровня эстрадиола в крови активирует экспрессию гена *Irs2* в печени независимо от пола животного. Также независимо от пола животного эстрадиол, по-видимому, регулирует транспорт глюкозы в жировой ткани: у самок и самцов повышение уровня эстрадиола в крови было ассоциировано со снижением экспрессии гена *Slc2a4* в жировой ткани. Таким образом, эффекты эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада, по-видимому, не зависят от пола животного, но имеют тканевую специфичность. Поскольку молекулярный механизм влияния эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада у самок и самцов не различается, причиной половых различий в чувствительности к инсулину и скорости развития метаболических нарушений может быть сниженный, по сравнению с самками, уровень эстрадиола в крови и сниженная экспрессия рецепторов эстрадиола в печени.
Ключевые слова: гонадэктомия; эстрадиол; тестостерон; чувствительность к инсулину; экспрессия генов; мыши линии C57BL/6J.

Для цитирования: Яковлева Т.В., Костина Н.Е., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина у самок и самцов мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):427-434. DOI 10.18699/VJ20.635

Effect of gonadectomy and estradiol on the expression of insulin signaling cascade genes in female and male mice

T.V. Iakovleva[1] ✉, N.E. Kostina[1], E.N. Makarova[1], N.M. Bazhan[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
✉ e-mail: jakov@bionet.nsc.ru

Abstract. A positive effect of estradiol on insulin sensitivity has been shown for females and males. Insulin sensitivity is higher in females than in males, and males show a greater tendency to develop metabolic disorders. It is believed that these sex differences are due to a protective effect of estradiol in females, but not in males. Estradiol is a steroid hormone, and its effect is due to the modulation of target gene expression, but the effect of estradiol on the expression of genes encoding insulin signal transduction and glucose transport has not been sufficiently studied. The aim

© Яковлева Т.В., Костина Н.Е., Макарова Е.Н., Бажан Н.М., 2020
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

of the study was to compare the molecular mechanisms of the estradiol influence on insulin sensitivity in mice of both sexes. The effect of gonadectomy and estradiol (1 μg/animal, three days) on the expression of insulin signaling cascade genes in muscle, adipose tissue, and liver, as well as on the expression of *Fgf21*, estradiol receptors (*Esr1/2*), and transcription factor *Stat3* in the liver in female and male mice was investigated. Estradiol levels were lower and glucose blood levels and insulin resistance were higher in Sham operated (Sham) males compared to Sham females. *Irs2*, *Pik3cd*, and *Esr1/2* mRNA levels were lower in the liver of Sham males than in Sham females. In females, gonadectomy reduced the level of estradiol in the blood, increased insulin resistance and blood glucose levels compared to Sham females. Administration of estradiol to gonadectomized females decreased blood insulin levels and insulin resistance. In males, gonadectomy, on the contrary, increased the blood estradiol level, decreased blood insulin level and insulin resistance. Estradiol did not affect the parameters studied in males. The development of insulin resistance in gonadectomized females was associated with a decreased expression of the *Irs2* gene in the liver. Increased insulin sensitivity in gonadectomized males was associated with increased levels of *Irs2* and *Pik3cd* mRNA in the liver. It can be assumed that increasing the level of estradiol in the blood activates the expression of the *Irs2* gene in the liver regardless of animal sex. Also, estradiol seems to regulate the transport of glucose in adipose tissue regardless of animal sex: in females and males, an increase in the blood estradiol level was associated with a decrease in the expression of the *Slc2a4* gene in adipose tissue. Thus, the effects of estradiol on the expression of insulin cascade genes do not seem to depend on animal sex, but have tissue specificity. Since the molecular mechanism of estradiol influence on the expression of insulin cascade genes in females and males is the same, the cause of sexual differences in insulin sensitivity and the rate of development of metabolic disorders may be a decrease in the level of estradiol in the blood, as well as a decrease in the expression of estradiol receptors in the liver in males compared to females.
Key words: gonadectomy; estradiol; testosterone; insulin sensitivity; gene expression; C57BL/6J mice.

For citation: Iakovleva T.V., Kostina N.E., Makarova E.N., Bazhan N.M. Effect of gonadectomy and estradiol on the expression of insulin signaling cascade genes in female and male mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):427-434. DOI 10.18699/VJ20.635

Введение

Имеющиеся на сегодняшний день данные предполагают существование тесной взаимосвязи между эстрогенами и чувствительностью к инсулину, а именно: эстрадиол повышает поступление глюкозы в клетки мышечной ткани, подавляет продукцию глюкозы печенью, снижает уровень глюкозы в крови и повышает толерантность к глюкозе у овариэктомированных самок мышей и крыс, у интактных самок мышей с выраженным генетическим или диет-индуцированным ожирением, у самцов мышей и у мужчин (Faustini-Fustini et al., 1999; Bryzgalova et al., 2008; Saengsirisuwan et al., 2009; Zhu et al., 2014).

Молекулярные механизмы влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину активно изучают, и в настоящее время известно, что они обусловлены его влиянием на фосфорилирование субстратов инсулинового рецептора первого и второго типов (IRS1 и 2), а также на уровень и транслокацию в клеточную мембрану транспортера глюкозы четвертого типа (GLUT4) (González et al., 2001; Saengsirisuwan et al., 2009; Gorres et al., 2011; Muthusamy et al., 2011; Narasimhan et al., 2013).

Эффекты эстрадиола как стероидного гормона зависят от его действия на экспрессию генов. Показано влияние эстрадиола на экспрессию транспортера глюкозы четвертого типа (*Slc2a4*) у самок и самцов и на экспрессию рецептора инсулина (*Insr*) у самцов. Овариэктомия повышает, а введение эстрадиола снижает экспрессию *Slc2a4* в жировой ткани у самок мышей (Яковлева и др., 2014). У самцов крыс гонадэктомия снижает экспрессию *Insr* в печени, мышцах и в жировой ткани и *Slc2a4* в мышцах и жировой ткани, но экзогенный эстрадиол не влияет на данные показатели (Muthusamy et al., 2009, 2011). Результаты экспериментов *in vitro* на культурах клеток (CHO, HepG2) позволяют предположить, что эстрадиол не участвует в регуляции экспрессии *Insr* и активирует экспрессию субстрата инсулинового рецептора (*Irs*) первого и второго типов в печени (Xie et al., 2003; Panno et al., 2006; Parthasarathy et al., 2009).

Влияние эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада может быть опосредовано другими факторами. Например, влияние эстрадиола на чувствительность к инсулину у мышей с генетическим ожирением (мыши линии ob/ob) обусловлено активацией экспрессии в печени транскрипционного фактора STAT3 (Gao et al., 2006). Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) повышает чувствительность к инсулину в печени (Gong et al., 2016) и также может опосредовать влияние эстрадиола на метаболизм, поскольку на самках мышей показано, что активация рецептора эстрадиола типа альфа повышает экспрессию *Fgf21* в печени (Allard et al., 2019).

Как известно, эстрогены синтезируются в яичниках, тестикулах и надпочечниках, а также в периферических тканях из андрогенных предшественников под влиянием ароматазного ферментного комплекса, поэтому у самцов мышей уровень эстрадиола в крови сравним с таковым у самок. Однако при потреблении диеты с большим содержанием жиров самцы демонстрируют бóльшую склонность к развитию метаболических нарушений и сниженную чувствительность к инсулину: в отличие от самок, у них снижается чувствительность к инсулину в печени, развивается голодная гипергликемия (Akoum et al., 2011). Предполагают, что связанные с полом различия в чувствительности к инсулину и в скорости развития метаболических нарушений вызваны тем, что у самок, в отличие от самцов, эстрадиол обладает протективным действием и повышает чувствительность к инсулину. Однако молекулярные механизмы влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у самцов остаются малоизученными.

Целью работы было провести сравнительное исследование молекулярных механизмов влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у мышей обоих полов.

Исследовали эффекты гонадэктомии и экзогенного эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина в мышцах, жировой ткани и печени, а также на экспрессию *Fgf21*, рецепторов эстрадиола типа альфа и бета (*Esr1/2*) и транскрипционного фактора Stat3 в печени у самок и самцов мышей.

Материалы и методы

Животные. Исследование выполнено на базе вивария ИЦиГ СО РАН. Мышей C57BL разводили и содержали в условиях постоянного светового режима (12:12) и свободного доступа к воде и пище (Assortiment Agro, Тураково, Россия) при температуре 22±2 °C. Работу проводили с соблюдением биоэтических норм (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe No. 123, Strasbourg 1985) and Russian national instructions for the care and use of laboratory animals).

Эксперимент. Самок и самцов в возрасте 10 недель гонадэктомировали или ложно оперировали и рассаживали по одному. Через три недели после операции начинали эксперимент: животные в течение трех дней в 09:00 получали перорально инъекцию β-эстрадиола (Sigma-Aldrich) в дозе 1 мкг/животное или растворителя (растительное масло промышленного производства, 100 мкл). Для каждого пола были сформированы три экспериментальные группы: ложно оперированные животные, которые получали инъекцию масла и служили контролем (ЛО); гонадэктомированные животные, которые получали инъекцию масла (ГЭ); и гонадэктомированные животные, которые получали инъекцию E2 (E2). Через сутки после последней инъекции животных декапитировали после ночного голодания (18:00–09:00) для взятия образцов крови и тканей (печень, мышцы, висцеральный жир). Кровь собирали в пробирки с 5 мкл ЭДТА, центрифугировали (4000 g, 20 мин), плазму крови хранили при –70 °C. Образцы тканей помещали в жидкий азот до выделения РНК и белка. После определения уровня глюкозы и инсулина рассчитывали физиологический индекс резистентности к инсулину (HOMA-IR) по формуле: [уровень глюкозы в крови после голодания (ммоль/л) × уровень инсулина в крови после голодания (нг/мл)]/22.5.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента ExtraRNA («Евроген Лаб», Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для получения кДНК 1 мкг РНК смешивали с 2.5 мкл праймера oligo-dT («Евроген Лаб», конечная концентрация праймера 2 мкМ) и денатурировали при 70 °C в течение 2 мин на амплификаторе БИС (Россия). Затем добавляли 5 мкл (5×) буфера («СибЭнзим», Новосибирск, Россия), 2.5 мкл dNTP (5 мМ по каждому, «Медиген», Новосибирск, Россия) и 0.5 мкл (100 ед.) M-MuLV («СибЭнзим»). Полученную смесь инкубировали при 42 °C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при –20 °C. ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси Синтол на приборе VIIA 7 для выполнения ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя. В качестве праймеров и зондов применяли коммерческие наборы Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) для мышей (табл. 1). Внутренним контролем служил бета-актин. Анализ относительного количества мРНК генов проводили ΔΔCT-методом.

Вестерн-блот анализ уровня белков. Образцы печени, мышечной и жировой тканей гомогенизировали. Экстракцию белков проводили в лизирующем буфере (Tris-Triton buffer). Концентрацию белка в пробах оценивали по методу Бредфорда с помощью NanoDrop2000 (ThermoScientific). Разделение белков по молекулярной массе выполняли с помощью гель-электрофореза в 10 % полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере (25 мМ трис, 250 мМ глицин, 0.1 % SDS). Электроперенос белков на 0.45 мкм нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере с помощью Trans-Blot system (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 5 % обезжиренным молоком (milk powder, PanReac AppliChem). Использовали первичные поликлональные антитела кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), разведение 1:2000: insulin Rα antibody (sc-710) и GLUT4 antibody (sc-7938). После отмывки фосфатно-солевым буфером (0.1 % Tween-20) мембраны инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:5000) (sc-2004, AT/goat anti-rabbit IgG-

Таблица 1. Коммерческие наборы Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) для мышей, использованные в работе

Название гена	Обозначение	Номер в каталоге
Рецептор инсулина	*Insr*	Mm01211875_m1
Субстрат инсулинового рецептора первого типа	*Irs1*	Mm01278327_m1
Субстрат инсулинового рецептора второго типа	*Irs2*	Mm03038438_m1
Каталитическая субъединица дельта фосфатидилинозитол-3-киназы	*Pik3cd*	Mm00435674_m1
Транспортер глюкозы четвертого типа	*Slc2a4*	Mm01245502_m1
Бета-актин	*Actb*	Mm006007938_s1
Рецептор эстрадиола первого типа	*Esr1*	Mm00433149_m1
Рецептор эстрадиола второго типа	*Esr2*	Mm00599821_m1
Сигнал трансдукции и активации транскрипции 3	*Stat3*	Mm01219775_m1
Фактор роста фибробластов 21	*Fgf21*	Mm00840165_g1

HRP, HRP-conjugated, Santa Cruz Biotechnology). Выявление структурного белка бета-актина (разведение 1:5000) (sc-130656, Santa Cruz Biotechnology) проводили на той же мембране. По окончании иммуноблоттинга мембрану отмывали и инкубировали 1 мин в субстратной смеси (10 мл 100 мМ трис-HCl pH 8.5; 50 мкл 250 мМ люминола; 22 мкл 90 мМ кумаровой кислоты; 3 мкл 33 % H_2O_2), после чего визуализировали хемилюминесценцию на приборе ChemiDocTM XRS (Bio-Rad). Результаты анализировали с применением программы Image Studio Lite Ver 5.2. Сигнал исследуемого белка в пробе относили к сигналу бета-актина в той же пробе. Уровень экспрессии белка в пробе в оцифрованном виде является отношением нормированного сигнала в данной пробе к нормированному сигналу в референсной пробе.

Определение биохимических показателей крови. Концентрацию глюкозы в крови определяли с помощью глюкометра OneTouch Select (Lifescan, Johnson and Johnson, США), концентрации эстрадиола, тестостерона и инсулина в плазме крови – ИФА-методом с помощью коммерческих наборов Mouse Estradiol (E2) ELISA Kit (MyBioSource, США), Testosterone rat/mouse ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Германия) и Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Millipore, США) согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка результатов. Значения представлены как среднее ± ошибка среднего. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола на исследованные показатели у самок и самцов определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа MANOVA (градации фактора «экспериментальная группа»: ЛО, ГЭ, Е2), апостериорные сравнения выборочных средних проводили с помощью post-hoc Newman–Keuls теста. Для анализа эффектов гонадэктомии на уровень эстрадиола в крови использовали MANOVA с градациями фактора «экспериментальная группа» ЛО и ГЭ, поскольку образцы крови были взяты через сутки после последней инъекции гормона и уровень эстрадиола в крови у Е2 животных не мог отражать реальный уровень гормона в крови после инъекции. Для сравнения показателей ЛО самок и ЛО самцов применяли *t*-тест. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Уровень в крови половых гормонов, глюкозы и инсулина

Влияние пола у ЛО мышей. У самок уровень эстрадиола был достоверно выше, а уровень тестостерона – достоверно ниже, чем у самцов (табл. 2). Самки имели более высокую чувствительность к инсулину, чем самцы: уровень инсулина у самок и самцов достоверно не различался, при этом уровень глюкозы и показатель резистентности к инсулину (HOMA-IR) у самок были достоверно ниже, чем у самцов (табл. 3).

Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола. У самок гонадэктомия снизила уровень эстрадиола в крови (MANOVA, $p < 0.05$). Показано достоверное влияние фактора «экспериментальная группа» на показатели чувствительности к инсулину у самок: индекс резистентности к инсулину, уровни глюкозы и инсулина у ГЭ самок были выше, чем у ЛО самок, причем экзогенный эстрадиол нормализовал данные показатели. У самцов гонадэктомия снизила уровень тестостерона в крови (MANOVA, $p < 0.01$). Уровень эстрадиола в крови у ГЭ самцов, напротив, был выше, чем у ЛО самцов (MANOVA, $p < 0.05$). Экспериментальные воздействия не повлияли на уровни в крови глюкозы и инсулина и, соответственно, на показатель резистентности к инсулину у самцов.

Экспрессия компонентов инсулинового каскада в печени

Влияние пола у ЛО животных. Самки отличались от самцов по экспрессии генов *Irs2*, каталитической субъединицы фосфатидилинозитол-3-киназы (*Pik3cd*), *Esr1* и *Esr2*: уровень мРНК этих генов у самок был достоверно выше, чем у самцов. Экспрессия генов *Insr*, *Irs1*, *Fgf21*, *Stat3* и уровень белка INSR в печени у самок и самцов достоверно не различались (рис. 1 и 2).

Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола. У самок гонадэктомия снизила, а экзогенный эстрадиол повысил, хотя и не нормализовал, уровень мРНК гена *Irs2* в печени (MANOVA, $p < 0.01$).

У самцов экзогенный эстрадиол не повлиял на экспрессию исследованных генов в печени, тогда как гонадэкто-

Таблица 2. Вес тела и уровни половых гормонов в плазме крови у самок и самцов мышей C57BL

Пол	Экспериментальная группа (число животных в группе)	Вес тела, г	Эстрадиол, плазма, пг/мл	Тестостерон, плазма, нг/мл
Самки	ЛО (9)	20.3 ± 0.5	151 ± 15	0.24 ± 0.03
	ГЭ (12)	23.3 ± 1.2	122 ± 6	0.11 ± 0.06
	Е2 (10)	21.8 ± 0.5	127 ± 4	0.15 ± 0.04
MANOVA			$p < 0.05$	
Самцы	ЛО (8)	25.4 ± 0.4$^{\$\$\$}$	94 ± 12$^{\$\$}$	2.80 ± 0.9$^{\$\$}$
	ГЭ (10)	24.6 ± 0.4	133 ± 10	0.16 ± 0.05*
	Е2 (11)	25.1 ± 0.5	128 ± 12	0.12 ± 0.03*
MANOVA			$p < 0.05$	$p < 0.01$

$^{\$\$}$ $p < 0.01$, $^{\$\$\$}$ $p < 0.001$ по сравнению с ЛО самками, *t*-тест; * $p < 0.05$ по сравнению с ЛО животными того же пола, post-hoc Newman–Keuls тест.

Таблица 3. Уровень инсулина в плазме крови, уровень глюкозы в крови и показатель HOMA-IR у самок и самцов C57BL

Пол	Экспериментальная группа (число животных в группе)	Глюкоза, кровь, ммоль/л	Инсулин, плазма, нг/мл	HOMA-IR
Самки	ЛО (9)	6.1 ± 0.3	0.70 ± 0.14	0.18 ± 0.03
	ГЭ (12)	7.9 ± 0.4**	1.12 ± 0.24	0.41 ± 0.10*
	Е2 (10)	6.9 ± 0.5	0.43 ± 0.07#	0.13 ± 0.02#
MANOVA		$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Самцы	ЛО (8)	7.7 ± 0.4$$	1.28 ± 0.31	0.47 ± 0.13$
	ГЭ (10)	6.8 ± 0.4	0.51 ± 0.11	0.14 ± 0.02
	Е2 (11)	7.0 ± 0.4	1.25 ± 0.41	0.40 ± 0.14

$ $p < 0.05$, $$ $p < 0.01$ по сравнению с ЛО самками, t-тест; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с ЛО животными того же пола; # $p < 0.05$ по сравнению с ГЭ животными того же пола, post-hoc Newman–Keuls тест.

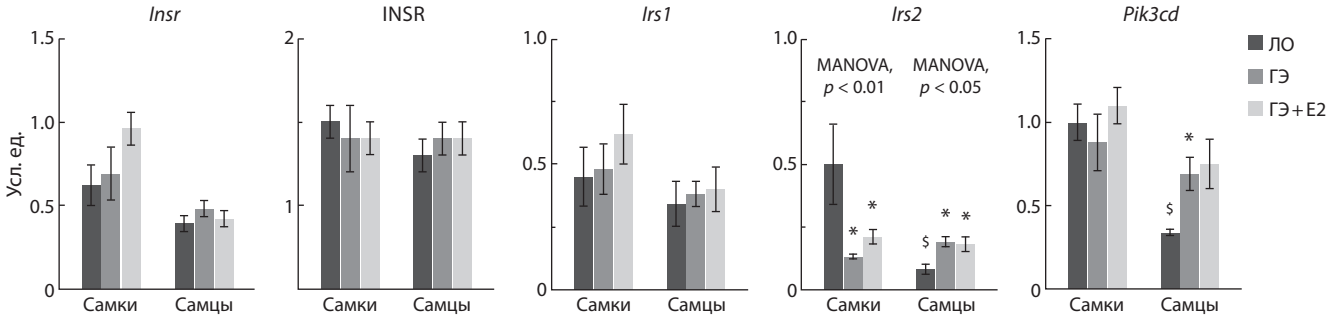

Рис. 1. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК *Insr*, *Irs1*, *Irs2*, *Pik3cd* и уровень белка INSR в печени у ЛО, ГЭ и ГЭ + Е2 самок и самцов мышей.

Здесь и на рис. 2–4: $ $p < 0.05$ по сравнению с самками; * $p < 0.05$ по сравнению с ЛО животными того же пола; # по сравнению с ГЭ животными того же пола. MANOVA, $p < 0.05$ или $p < 0.01$ – влияние фактора «экспериментальная группа» статистически достоверно.

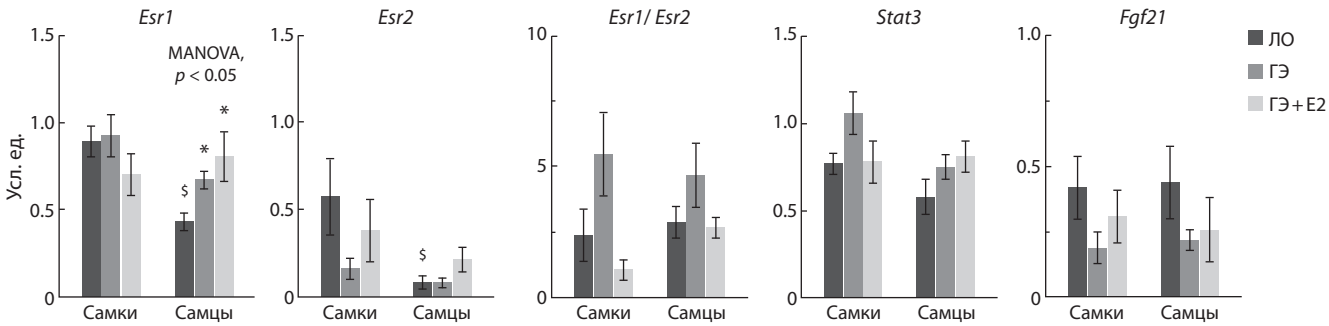

Рис. 2. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК рецепторов эстрадиола (*Esr1* и *Esr2*), *Fgf21* и *Stat3* в печени у ЛО, ГЭ и ГЭ+Е2 самок и самцов мышей.

мия повысила экспрессию *Irs2* и *Esr1* в печени (MANOVA, $p < 0.05$ в обоих случаях): уровни мРНК этих генов у ГЭ и Е2 самцов были выше, чем у ЛО самцов. Уровень мРНК *Pik3cd* в печени у ГЭ и Е2 самцов также был выше, чем у ЛО самцов, однако различия не достигали уровня значимости (MANOVA, $p = 0.07$). Уровень мРНК *Esr1* у самцов положительно коррелировал ($p < 0.05$) с уровнем мРНК *Irs2* ($r = 0.74$).

Экспериментальные воздействия не повлияли достоверно на соотношение *Esr1*/*Esr2* в печени у самок и самцов.

Экспрессия компонентов инсулинового каскада в мышечной и жировой тканях

Влияние пола у ЛО животных. Экспрессия генов и белков инсулинового каскада в мышцах и в жировой ткани у ложно оперированных самок и самцов не различалась (рис. 3 и 4).

Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола. У самок экспериментальные воздействия не повлияли на экспрессию исследованных показателей инсулинового каскада в мышечной ткани. У ГЭ самцов в мышечной ткани

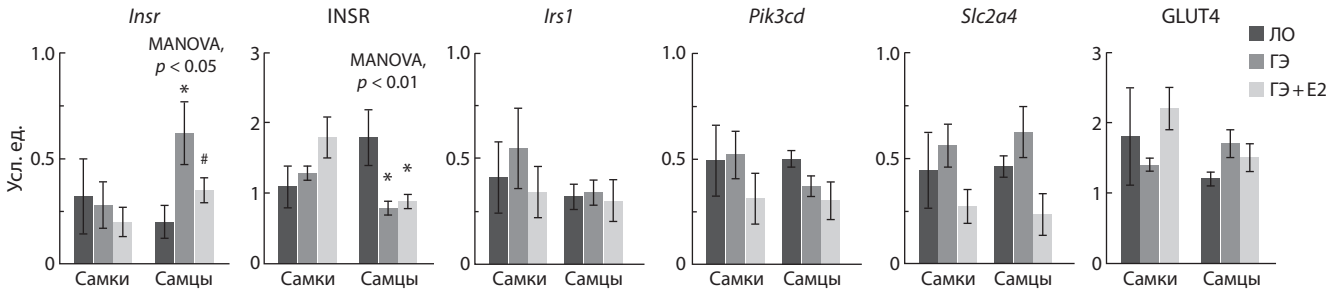

Рис. 3. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК *Insr*, *Irs1*, *Pik3cd*, *Slc2a4* и уровень белков INSR и GLUT4 в скелетных мышцах у ЛО, ГЭ и ГЭ+E2 самок и самцов мышей.

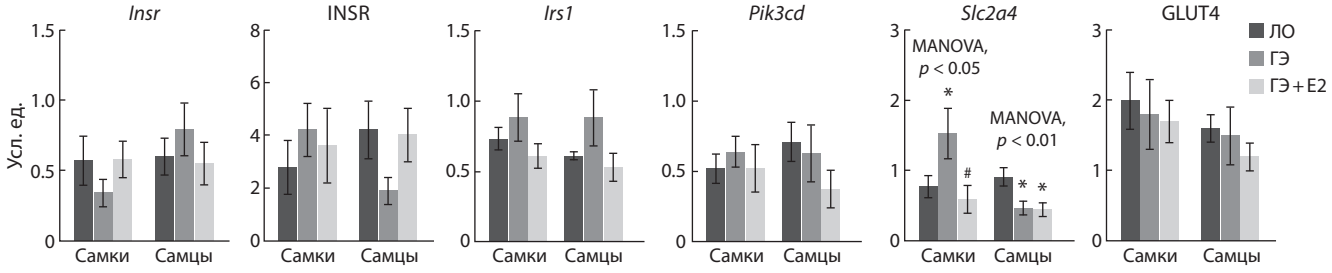

Рис. 4. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК *Insr*, *Irs1*, *Pik3cd*, *Slc2a4* и уровень белков INSR и GLUT4 в висцеральной жировой ткани у ЛО, ГЭ и ГЭ+E2 самок и самцов мышей.

уровень мРНК *Insr* был выше, чем у ЛО самцов. Уровень белка INSR был ниже у ГЭ и E2 самцов по сравнению с ЛО самцами. В жировой ткани самок гонадэктомия повысила и экзогенный эстрадиол нормализовал экспрессию *Slc2a4* (MANOVA, $p < 0.05$). У ГЭ и E2 самцов экспрессия *Slc2a4* в жировой ткани была ниже, чем у ЛО самцов.

Обсуждение

Одним из подходов для изучения влияния эстрадиола на экспрессию генов трансдукции сигнала инсулина является сравнение показателей у самок и самцов. Чувствительность к инсулину на уровне целого организма (уровень в крови глюкозы, индекс резистентности к инсулину), а также экспрессия генов трансдукции сигнала инсулина (*Irs2* и *Pik3cd*) в печени у ЛО самок была выше, чем у ЛО самцов, что совпадает с данными, полученными на интактных животных (Parks et al., 2015; Яковлева и др., 2017; Torre et al., 2017). В нашей работе впервые показано, что ЛО самки отличаются от ЛО самцов не только повышенным уровнем эстрадиола в крови, но и повышенной экспрессией рецепторов эстрадиола обоих типов в печени, что может быть одной из причин половых различий эффектов эстрадиола на чувствительность к инсулину в печени.

Для изучения эффектов эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада, помимо сравнения показателей у самок и самцов, нами использована модель гонадэктомии с последующим введением эстрадиола. Мы предполагали, что гонадэктомия приведет к снижению уровня эстрадиола в крови у самок вследствие элиминации основного источника продукции гормона, а у самцов – вследствие снижения уровня тестостерона как предшественника синтеза эстрадиола в тканях. Но у самцов уровень гормона в крови после гонадэктомии повысился. Возможно, это следствие активации продукции гормона надпочечниками. В результате гонадэктомия нивелировала различия по уровню половых стероидов между самками и самцами: уровни эстрадиола и тестостерона в крови у гонадэктомированных самок и самцов не различались. Однако у самок гонадэктомия индуцировала развитие инсулинорезистентности, а экзогенный эстрадиол нормализовал чувствительность к инсулину, тогда как у самцов экспериментальные воздействия не оказали достоверного влияния на исследованные показатели чувствительности к инсулину (уровни глюкозы и инсулина в крови, показатель HOMA-IR). Результаты влияния овариэктомии и экзогенного эстрадиола на уровни глюкозы и инсулина в крови и показатель резистентности к инсулину у самок соответствуют существующим представлениям (Rogers et al., 2009; Oh et al., 2011). Эффект гонадэктомии на показатель HOMA-IR у самцов зависит от генотипа животного (Parks et al., 2015), и у C57BL/6J самцов данный показатель снижается через 10 недель после гонадэктомии. В нашей работе показатель HOMA-IR у ГЭ самцов не отличался достоверно от такового у ЛО самцов, но был в 3.4 раза ниже. Отсутствие достоверного влияния гонадэктомии на чувствительность к инсулину у самцов, возможно, обусловлено меньшей продолжительностью эксперимента.

Снижение чувствительности к инсулину у ГЭ самок было ассоциировано со снижением экспрессии *Irs2* и *Esr2* в печени и повышением экспрессии *Slc2a4* в жировой ткани. Экзогенный эстрадиол, напротив, снизил экспрессию *Slc2a4* в жировой ткани и повысил экспрессию *Irs2* в печени. Влияние гонадэктомии на экспрессию *Irs2* в печени хорошо согласуется с наблюдаемыми половыми различиями: у самок этот показатель был выше, чем у

самцов. Известно, что эффекты эстрадиола на экспрессию *Irs1* и *Irs2* в печени у самок мышей опосредуют рецепторы эстрадиола типа альфа (ERα) (Panno et al., 2006). Рецепторы эстрадиола типа бета (ERβ), вероятно, ингибируют эффекты эстрадиола, опосредованные ERα (Lindberg et al., 2003). Согласно полученным данным, овариэктомия не повлияла на экспрессию ERα и снизила экспрессию ERβ в печени у самок, что предполагает усиление эффектов эстрадиола, опосредованных ERα, и, возможно, имеет компенсаторно-адаптивный характер, направленный на поддержание чувствительности к инсулину в условиях снижения уровня эстрадиола в крови.

У самцов гонадэктомия не повлияла на уровни инсулина и глюкозы в крови, но вызвала увеличение уровней мРНК *Irs2*, *Pik3cd* и *Esr1* в печени. Поскольку у самцов отмечена тенденция к увеличению уровня эстрадиола в крови после гонадэктомии и наблюдалась корреляция между уровнем экспрессии субстрата инсулинового рецептора второго типа и экспрессией рецептора эстрадиола типа альфа в печени, можно предположить, что экспрессия *Irs2* в печени у самцов, как и у самок, регулируется эстрадиолом. Соответственно, активация экспрессии гена рецептора эстрадиола типа альфа может быть частью молекулярного механизма влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у ГЭ самцов. Таким образом, повышение уровня эстрадиола в крови у самок и у самцов может независимо от пола активировать экспрессию гена *Irs2* в печени и способствовать улучшению чувствительности к инсулину в целом.

Как известно, в опосредовании эффектов эстрадиола на экспрессию генов липогенеза в печени участвует транскрипционный фактор STAT3 (Gao et al., 2006). FGF21 также может опосредовать действие эстрадиола на экспрессию генов глюконеогенеза, поскольку повышает экспрессию гена *Irs2* и гена глюкоза-6-фосфатазы (Fisher et al., 2011). Однако роль STAT3 и FGF21 как посредников эстрадиола в регуляции экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина требует дополнительного исследования, так как в данной работе не было обнаружено различий в уровнях мРНК *Stat3* и *Fgf21* в печени у животных разного пола и экспериментальных групп.

Активация экспрессии *Pik3cd* в печени у ГЭ самцов, по-видимому, обусловлена снижением у них уровня тестостерона. У самок уровень мРНК *Pik3cd* был выше, чем у самцов, но эти различия не связаны с уровнем эстрадиола, поскольку овариэктомия и последующее введение эстрадиола не повлияли на уровень мРНК *Pik3cd* у самок.

Существует представление, что влияние эстрадиола на чувствительность к инсулину в жировой и в мышечной тканях вызвано его стимуляцией захвата глюкозы клетками вследствие увеличения уровня GLUT4 и активации его транслокации в клеточную мембрану. У самок мышей овариэктомия в течение 2 недель не влияет, а через 10 недель вызывает снижение уровня мРНК *Slc2a4* в мышцах и в жировой ткани (Kim et al., 2010). У самок крыс через 12 недель после овариэктомии уровень белка GLUT4 в мышцах снижен, тогда как введение эстрадиола предотвращает данное снижение (Saengsirisuwan et al., 2009). В нашей работе через 3 недели после овариэктомии уровень мРНК *Slc2a4* в жировой ткани у самок повысился и экзогенный эстрадиол нормализовал его, тогда как достоверного влияния воздействий на уровень мРНК *Slc2a4* в мышечной ткани и уровень белка GLUT4 в жировой ткани и в мышцах не обнаружено. Ранее нами было показано, что овариэктомия в течение 5 недель также повышает уровень мРНК *Slc2a4* в жировой ткани, а введение эстрадиола в течение 3 недель его снижает, в то время как в мышечной ткани уровень мРНК *Slc2a4* снижается после овариэктомии, но не меняется на фоне введения эстрадиола (Яковлева и др., 2014). По-видимому, эффекты овариэктомии и экзогенного эстрадиола на экспрессию *Slc2a4* в жировой и мышечной тканях существенным образом зависят от длительности эксперимента.

Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию инсулинового рецептора и транспортера глюкозы четвертого типа в жировой и мышечной тканях у самцов исследовали на крысах. Показано, что гонадэктомия сопровождается снижением уровня мРНК и белка INSR и GLUT4 в жировой и мышечной тканях, а экзогенный эстрадиол нормализует уровни белков (Muthusamy et al., 2009, 2011). Результаты нашего эксперимента слабо согласуются с литературными данными, что может быть следствием межвидовых различий влияния ГЭ на уровень эстрадиола в крови и на соотношение уровней половых стероидов у самцов. В нашем эксперименте повышение уровня эстрадиола после гонадэктомии у самцов было ассоциировано с повышением уровня мРНК *Insr*, но снижением белка INSR в мышцах, а в жировой ткани – со снижением мРНК *Slc2a4*. Отметим, что повышение уровня эстрадиола в крови независимо от пола животного (при введении гормона у самок и после гонадэктомии у самцов) было ассоциировано со снижением экспрессии *Slc2a4* в жировой ткани.

Заключение

Вышесказанное позволяет предположить, что влияние эстрадиола на экспрессию генов и белков инсулинового каскада является тканеспецифическим и не зависит от пола животного: в печени эстрадиол может повышать экспрессию *Irs2*, в жировой ткани – подавлять экспрессию *Slc2a4*. Активация экспрессии *Irs2* в печени на фоне повышения уровня эстрадиола в крови в результате введения гормона у самок или после гонадэктомии у самцов направлена на улучшение метаболизма глюкозы, поэтому эффекты эстрадиола в печени обусловливают повышение чувствительности к инсулину на уровне целого организма. Значение влияния эстрадиола на экспрессию *Slc2a4* в жировой ткани у самок и самцов не ясно и требует дальнейших исследований. Несмотря на универсальный механизм действия, протективный эффект эстрадиола у самцов менее выражен, чем у самок, по-видимому, из-за пониженного уровня гормона в крови и сниженной экспрессии рецепторов эстрадиола в печени.

Список литературы / References

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

[Yakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Makarova E.N., Bazhan N.M. Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in

young and adult C57BL/6J mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7): 833-840. DOI 10.18699/VJ17.303. (in Russian)]

Яковлева Т.В., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Влияние овариэктомии и эстрадиола на уровень мРНК GLUT4 в жировой и мышечной тканях самок мышей C57BL/6J – *Agouti yellow*. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014;100(5):602-612.
[Iakovleva T.V., Makarova E.N., Bazhan N.M. Effect of ovariectomy on GLUT4 mRNA levels in adipose and muscle tissues in females of mice C57BL/6J – *Agouti yellow. Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2014;100(5):602-612. (in Russian)]

Akoum S.E., Lamontagne V., Cloutier I., Tanguay J.F. Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol. Metab. Syndr*. 2011;3:34.

Allard C., Bonnet F., Xu B., Coons L., Albarado D., Hill C., Fagherazzi G., Korach K.S., Levin E.R., Lefante J., Morrison C., Mauvais-Jarvis F. Activation of hepatic estrogen receptor-α increases energy expenditure by stimulating the production of fibroblast growth factor 21 in female mice. *Mol. Metab*. 2019;22:62-70. DOI 10.1016/j.molmet.2019.02.002.

Bryzgalova G., Lundholm L., Portwood N., Gustafsson J.A., Khan A., Efendic S., Dahlman-Wright K. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2008;295(4):E904-E912.

Faustini-Fustini M., Rochira V., Carani C. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur. J. Endocrinol*. 1999;140(2):111-129.

Fisher F.M., Estall J.L., Adams A.C., Antonellis P.J., Bina H.A., Flier J.S., Kharitonenkov A., Spiegelman B.M., Maratos-Flier E. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) *in vivo*. *Endocrinology*. 2011;152(8):2996-3004. DOI 10.1210/en.2011-0281.

Gao H., Bryzgalova G., Hedman E., Khan A., Efendic S., Gustafsson J.A., Dahlman-Wright K. Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol. Endocrinol*. 2006;20(6):1287-1299.

Gong Q., Hu Z., Zhang F., Cui A., Chen X., Jiang H., Gao J., Chen X., Han Y., Liang Q., Ye D., Shi L., Chin Y.E., Wang Y., Xiao H., Guo F., Liu Y., Zang M., Xu A., Li Y. Fibroblast growth factor 21 improves hepatic insulin sensitivity by inhibiting mammalian target of rapamycin complex 1 in mice. *Hepatology*. 2016;64(2):425-438. DOI 10.1002/hep.28523.

González C., Alonso A., Grueso N.A., Díaz F., Esteban M.M., Fernández S., Patterson A.M. Effect of treatment with different doses of 17-β-estradiol on insulin receptor substrate-1. *JOP. J. Pancreas*. 2001;2(4):140-149.

Gorres B.K., Bomhoff G.L., Morris J.K., Geiger P.C. *In vivo* stimulation of oestrogen receptor α increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. *J. Physiol*. 2011;589(8):2041-2054. DOI 10.1113/jphysiol.2010.199018.

Kim J.Y., Jo K.J., Kim O.S., Kim B.J., Kang D.W., Lee K.H., Baik H.W., Han M.S., Lee S.K. Parenteral 17beta-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. *Life Sci*. 2010;87(11-12):358-366. DOI 10.1016/j.lfs.2010.07.009.

Lindberg M.K., Movérare S., Skrtic S., Gao H., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.A., Ohlsson C. Estrogen receptor (ER)-β reduces ERα-regulated gene transcription, supporting a "Ying Yang" relationship between ERα and ERβ in mice. *Mol. Endocrinol*. 2003;17(2):203-208. DOI 10.1210/me.2002-0206.

Muthusamy T., Murugesan P., Balasubramanian K. Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat. *Metabolism*. 2009;58(11):1581-1592.

Muthusamy T., Murugesan P., Balasubramanian K. Sex steroids influence glucose oxidation through modulation of insulin receptor expression and IRS-1 serine phosphorylation in target tissues of adult male rat. *Mol. Cell. Biochem*. 2011;352(1-2):35-45.

Narasimhan A., Sampath S., Jayaraman S., Karundevi B. Estradiol favors glucose oxidation in gastrocnemius muscle through modulation of insulin signaling molecules in adult female rats. *Endocr. Res*. 2013;38(4):251-262. DOI 10.3409/07435800.2013.775148.

Oh Y.S., Lee T.S., Cheon G.J., Jang I.S., Jun H.S., Park S.C. Modulation of insulin sensitivity and caveolin-1 expression by orchidectomy in a nonobese type 2 diabetes animal model. *Mol. Med*. 2011;17(1-2): 4-11. DOI 10.2119/molmed.2009.00105.

Panno M.L., Mauro L., Marsico S., Bellizzi D., Rizza P., Morelli C., Salerno M., Giordano F., Andò S. Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor α through its interaction with Sp1. *J. Mol. Endocrinol*. 2006;36(1):91-105. DOI 10.1677/jme.1.01848.

Parks B.W., Sallam T., Mehrabian M., Psychogios N., Hui S.T., Norheim F., Castellani L.W., Rau C.D., Pan C., Phun J., Zhou Z., Yang W.P., Neuhaus I., Gargalovic P.S., Kirchgessner T.G., Graham M., Lee R., Tontonoz P., Gerszten R.E., Hevener A.L., Lusis A.J. Genetic architecture of insulin resistance in the mouse. *Cell Metab*. 2015;21(2):334-347.

Parthasarathy C., Renuka V.N., Balasubramanian K. Sex steroids enhance insulin receptors and glucose oxidation in Chang liver cells. *Clin. Chim. Acta*. 2009;399(1-2):49-53.

Rogers N.H., Perfield J.W. 2nd, Strissel K.J., Obin M.S., Greenberg A.S. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. 2009;150(5):2161-2168. DOI 10.1210/en.2008-1405.

Saengsirisuwan V., Pongseeda S., Prasannarong M., Vichaiwong K., Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism*. 2009;58(1):38-47. DOI 10.1016/j.metabol.2008.08.004.

Torre S.D., Lolli F., Ciana P., Maggi A. Sexual dimorphism and estrogen action in mouse liver. In: Mauvais-Jarvis F. (Ed.). Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity (Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1043). Springer Int. Publ., 2017;141-151. DOI 10.1007/978-3-319-70178-3_8.

Xie P., Liu M.L., Gu Y.P., Lu J., Xu X., Zeng W.M., Song H.P. Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2003;30(9):643-648. DOI 10.1046/j.1440-1681.2003.03899.x.

Zhu L., Martinez M.N., Emfinger C.H., Palmisano B.T., Stafford J.M. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2014; 306(10):E1188-E1197. DOI 10.1152/ajpendo.00579.2013.

ORCID ID

T.V. Iakovleva orcid.org/0000-0001-7628-5856
N.E. Kostina orcid.org/0000-0001-6137-0492
E.N. Makarova orcid.org/0000-0002-6417-9893
N.M. Bazhan orcid.org/0000-0002-7246-4758

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-15-01036), с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.11.2019. После доработки 17.02.2020. Принята к публикации 27.02.2020.