

Сведения о выполненных работах в 2019 году  
по проекту **«Механизмы метаболического контроля в скелетных мышцах:  
новые пути коррекции метаболического синдрома»**,  
поддержанному Российским научным фондом  
Соглашение № 19-15-00118

Руководитель канд. биол. наук Чибалин Александр Валерьевич

В качестве объекта исследования использовались мыши-самцы линии C57bl/6. Возраст мышей на момент начала эксперимента – 2 недели. Режим содержания животных: день/ночь:12/12, световой день начинается с 6:00, свободный доступ к пище и воде, температура в помещении 24 С.

Эксперимент продолжался 16 недель. До 12-ой недели мыши были разделены на 2 группы: контрольная группа – 36 мышей, экспериментальная группа – 36 мышей.

Начиная с 12-ой недели каждая группа была поделена на подвергающихся и не подвергающихся физическим нагрузкам мышей. Контроль массы тела проводился в соответствии со схемой эксперимента. Тест на толерантность к глюкозе проводился на 1-й, 4-ой, 8-ой и 16-й неделе. Измерение концентрации инсулина проводилось на 1-й и 16-й неделях.

Для формирования модели сахарного диабета 2-го типа (СД2) была использована модель с применением высокожировой диеты, которая была разработана специально для данного эксперимента. Экспериментальная группа мышей с начала эксперимента питалась специально приготовленным кормом с высокой калорийностью. Контрольная группа питалась кормом для лабораторных животных «Прокорм» (ЗАО «Биопро», Новосибирск), в котором на жиры приходилось 18 % от общей калорийности. Состав корма: пшеница, ячмень, отруби, глютен кукурузный, мука рыбная, белковая кормосмесь, масло подсолнечное, шрот соевый.

Корм для экспериментальной группы был приготовлен из описанного выше корма «Прокорм» (50 %), животного (свиной жир) (20 %) и растительного (подсолнечное масло) (10 %) жира, сахара (15 %), сухого молока (5 %). Продукты измельчались в блендере в гомогенную смесь, после чего масса формировалась в гранулы диаметром до 10 мм и высушивалась в духовом шкафу при 300 С. Корм приготавливался на 5 дней и хранился при +40 С.

Начиная с 12-ой недели мыши были разделены на 6 групп по 12 мышей:

1. Экспериментальная группа без нагрузок.
2. Экспериментальная группа, нагрузки утром.
3. Экспериментальная группа, нагрузки вечером.
4. Контрольная группа без нагрузок.
5. Контрольная группа нагрузки утром.

## 6. Контрольная группа нагрузки вечером.

Утренние нагрузки проводились в период с 8-00 до 10-00, вечерние нагрузки проходили в период времени с 19-00 до 21-00.

Время нагрузки постепенно увеличивалось до 60 минут и не изменялось больше на протяжении следующих 3-х недель. Один раз в неделю у мышей был день отдыха (на 7-ой день). Каждую неделю изменялся угол наклона беговой дорожки и скорость её вращения. Для нормирования нагрузки была использована беговая дорожка для мышей BMELAB SID-TM10. Принуждение к бегу осуществляется электрическим раздражением, напряжение подается на металлическую сетку, расположенную на задней стенке камеры.

Измерение массы тела проводились с помощью лабораторных весов. Каждая особь была измерена отдельно. Измерения проводились 11 раз за 16 недель.

Измерение концентрации глюкозы в крови проводилось при помощи портативного глюкометра ПКГ-02.4 Сателлит Плюс (ООО «Компания «ЭЛТА, Россия»). Образцы крови получались пункцией хвостовой вены.

Для проведения теста на толерантность к глюкозе мышам не давали корм в течение 4 часов, сохраняя свободный доступ к воде, утром животных взвешивали и определяли концентрацию глюкозы в крови (0 мин). Затем животным внутривенно вводили раствор 40 % глюкозы (2 г/кг массы тела) (углеводная нагрузка). Концентрация глюкозы в крови определялась через 15, 30, 60 и 120 минут после углеводной нагрузки. Оценивались максимальная достигаемая концентрация, время достижения максимума и время возврата к исходному уровню.

Полученные результаты свидетельствуют, что использование высокожировой диеты у мышей приводит к увеличению массы тела и формированию ожирения (масса тела более, чем на 25 % выше, чем в контрольной группе), гипергликемии, снижению толерантности к глюкозе и гиперинсулинемии. Все это свидетельствует о адекватности разработанной экспериментальной модели заболеванию диабетом 2 типа. Критериями адекватности модели, таким образом, можно считать следующие: динамика массы тела; гипергликемия; результаты теста на толерантность к глюкозе, в том числе величину площади под кривой концентрации глюкозы при глюкозотолерантном тесте (AUC).

В то же время высокая концентрация инсулина в крови животных экспериментальной группы свидетельствует о том, что нарушения сформировались только со стороны мышечной ткани, тогда как чувствительность  $\beta$ -клеток поджелудочной железы к глюкозе сохраняется. Это позволяет сделать заключение об относительной адекватности разработанной модели – моделируются нарушения со стороны мышечной ткани, но не поджелудочной железы. Возможно, для формирования резистентности к глюкозе со стороны  $\beta$ -клеток поджелудочной железы требуется больший срок.

Созданная модель может быть особенно полезна в широкой области исследований резистентности к инсулину, диабета и ожирения, она позволит обеспечить лучшее

понимание патогенеза, а также может быть использована для экспериментальной проверки эффектов терапевтических вмешательств.

На 12-ой неделе мышцы начали подвергаться физическим нагрузкам на беговой дорожке. Масса мышцей, подвергавшихся физическим нагрузкам и питающихся жировым кормом начала снижаться по сравнению с животными экспериментальной группы без нагрузок. На 13-ой неделе разница составила 4 %, на 16-ой неделе – 19 % (7,2 г).

Масса тела мышцей контрольных групп с нагрузками и без нагрузок на 12-ой неделе различалась на 2 %, к концу эксперимента стала различаться на 3 %. Обе группы имели массу нормальную для данного возраста.

Концентрация инсулина в плазме крови экспериментальных мышцей на 16-ой недели до введения глюкозы составила 2,68 нг/мл. У мышцей, из экспериментальной группы с нагрузками – 1,20 нг/мл. После введения глюкозы концентрация инсулина у экспериментальной группы без нагрузок возросла до 3,60 нг/мл, а у экспериментальной с нагрузками всего лишь до 2,03 нг/мл. Эти значения отличаются на 78%.

Сравнивая контрольные группы с нагрузками и без, можно отметить повышенный уровень инсулина у группы с нагрузками по сравнению с контрольной группой без нагрузок – на 30 % до введения глюкозы и на 50 % после.

К 16-ой неделе скорость усвоения глюкозы у мышцей из экспериментальной группы с нагрузками увеличилась по сравнению с мышцами, которые питаются жировым кормом и не подвергаются физическим нагрузкам.

Гипогликемическая фаза косвенно отражает скорость выработки инсулина и чувствительность тканей к данному гормону. Пролонгация этой фазы характерна для сахарного диабета 2-го типа, что и наблюдалось у мышцей экспериментальной группы в данном исследовании.

Забивка экспериментальных животных проводилась методом декапитации через 24 часа после последней физической нагрузки. После забивки из животных выделялся следующий биологический материал: мышцы с обеих задних конечностей: *m.gastrocnemius*, *m.soleus*, *m.EDL* и ТА; печень; сердце; жировая ткань. После декапитации ткани извлекались и замораживались в жидком азоте. Собранные образцы хранились в морозильной камере при температуре –80 С.

В выделенных образцах выполнялась оценка уровня транскрипции матричной РНК и количество экспрессии белков: pAMPK / AMPK, pACC / ACC, pAkt / Akt, pCaMKII, pAS160, GLUT4, Na/K-ATPase, компоненты электронно-транспортной цепи митохондрий, PGC1alpha, а так же цитокинов, продуцируемых мышечными клетками (миокинов). Образцы так же анализировались при помощи электрофореза и вестерн блоттинга.

Жировая диета способствовала повышению содержания ионов натрия в мышцах и снижению соотношения натрий/калий. После физических нагрузок наблюдался так

же прирост содержания ионов калия в мышечных клетках, в результате чего соотношение концентраций ионов натрия/калий значительно возросло.

Можно предположить, что регуляция функционирования клеток скелетной мускулатуры в ответ на увеличение соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  опосредована увеличением  $[Ca^{2+}]_i$  как следствие активации потенциал-чувствительных  $Ca^{2+}$  каналов и/или  $Na^+/Ca^{2+}$  обмена. Молекулярная природа  $Ca^{2+}$ -независимых сенсоров, вовлеченных в регуляцию транскрипции и трансляции внутриклеточным  $Na^+$  и  $K^+$ , соответственно, остается неизвестной.