



Мутация *yellow* в локусе *agouti* устраняет возрастное повышение экспрессии генов белков, регулирующих окисление жирных кислот в мышцах у мышей

Ю.В. Пискунова¹✉, А.Ю. Казанцева², А.В. Бакланов², Н.М. Бажан^{1, 2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Мутация *yellow* в локусе *agouti* (A^y мутация), снижающая активность меланокортиновых рецепторов, с возрастом вызывает гиперфагию, ожирение и диабет второго типа у мышей (A^y мыши). Неизвестно, будут ли у A^y мышей изменения в отдельных звеньях метаболической системы (белый и бурый жир и мышцы) проявляться еще до развития ожирения. Цель работы – измерить у A^y мышей относительную экспрессию генов ключевых белков, регулирующих углеводно-жировой обмен в белом и буром жире и скелетной мускулатуре на этапах развития, предшествующих формированию ожирения. Исследовали мышей линии C57Bl/6J, несущих доминантную аутосомную мутацию A^y (A^y/a мыши), и мышей стандартного генотипа данной линии (a/a мыши, контроль) в трех возрастных группах: 10, 15 и 30 нед. Методом ПЦР в реальном времени измеряли относительный уровень мРНК генов в мышцах: uncoupling protein 3 (*Ucp3*) и carnitine palmitoyl transferase 1b (*Cpt1b*) (окисление СЖК), solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*Slc2a4*) (захват глюкозы); в белом жире: lipoprotein lipase (*Lpl*) (депонирование триглицеридов), hormone-sensitive lipase (*Lipe*) (мобилизация жиров) и *Slc2a4* (захват глюкозы); в буром жире: uncoupling protein 1 (*Ucp1*) (расход энергии). В молодом возрасте (10 нед) у A^y мышей в мышцах была снижена экспрессия *Cpt1b*, в 15 нед у них отсутствовал транзитный пик транскрипции *Cpt1b*, *Ucp3* в мышцах, а также *Lipe* и *Slc2a4* в белом жире, который отмечался у a/a мышей. Снижение транскрипционной активности исследованных генов в скелетных мышцах и белом жире может инициировать развитие меланокортинового ожирения у A^y мышей.

Ключевые слова: мыши линии C57Bl/6J; ПЦР в реальном времени; меланокортиновое ожирение; углеводно-жировой обмен.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пискунова Ю.В., Казанцева А.Ю., Бакланов А.В., Бажан Н.М. Мутация *yellow* в локусе *agouti* устраняет возрастное повышение экспрессии генов белков, регулирующих окисление жирных кислот в мышцах у мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):265-272. DOI 10.18699/VJ18.358

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Piskunova Y.V., Kazantceva A.Y., Baklanov A.V., Bazhan N.M. Mutation *yellow* in *agouti* loci prevents age-related increase of skeletal muscle genes regulating free fatty acids oxidation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):265-272. DOI 10.18699/VJ18.358 (in Russian)

УДК 577.124.8 +613.25:569.323.4

Поступила в редакцию 01.09.2017

Принята к публикации 13.11.2017

© АВТОРЫ, 2018

Mutation *yellow* in *agouti* loci prevents age-related increase of skeletal muscle genes regulating free fatty acids oxidation

Y.V. Piskunova¹✉, A.Y. Kazantceva², A.V. Baklanov², N.M. Bazhan^{1, 2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The lethal *yellow* mutation in *agouti* loci (A^y mutation) reduces the activity of melanocortin (MC) receptors and causes hyperphagia, obesity and type two diabetes mellitus in aging mice (A^y mice). It is unknown if changes in distinct elements of the metabolic system such as white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), and skeletal muscle will manifest before the development of obesity. The aim of this work was to measure the relative gene expression of key proteins that regulate carbohydrate-lipid metabolism in WAT, BAT and skeletal muscle in A^y mice before the development of obesity. C57Bl/6J mice bearing a dominant autosomal mutation A^y (A^y/a mice) and mice of the standard genotype (a/a mice, control) have been studied in three age groups: 10, 15 and 30 weeks. The relative mRNA level of genes was measured by real-time PCR in skeletal muscles (uncoupling protein 3 (*Ucp3*) and carnitine palmitoyl transferase 1b (*Cpt1b*) (free fatty acids oxidation), solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*Slc2a4*) (glucose uptake)), in WAT lipoprotein lipase (*Lpl*) (triglyceride deposition), hormone-sensitive lipase (*Lipe*) (lipid mobilization), and *Slc2a4* (glucose uptake)), and in BAT: uncoupling protein 1 (*Ucp1*) (energy expenditure). The expression of *Cpt1b* was reduced in young A^y mice (10 weeks), there was no transient peak of transcription of *Cpt1b*, *Ucp3* in skeletal muscle tissue and *Lipe*, *Slc2a4* in WAT in early adult A^y mice (15 weeks), which was noted in a/a mice. Reduction of the transcriptional activity of the studied genes in skeletal muscle and white adipose tissue can initiate the development of melanocortin obesity in A^y mice.

Key words: C57Bl/6J mice; real-time PCR; melanocortin obesity; carbohydrate-lipid metabolism.

В настоящее время резко увеличилось количество людей, страдающих ожирением, при котором повышается риск развития ряда патологий, таких как сахарный диабет 2-го типа (Д2Т), инсульт, инфаркт, гипертензия и т. д. (Karre et al., 2011; Murea et al., 2012). Развитие ожирения может быть обусловлено средовыми и генетическими факторами (Murea et al., 2012). У людей и экспериментальных грызунов встречаются монолокусные формы ожирения, к их числу относится меланокортиновое (МК) ожирение (Waalén, 2014). Его вызывают мутации, нарушающие функцию центральной меланокортиновой системы гипоталамуса, которая регулирует аппетит и расход энергии (Brito et al., 2007; Silva et al., 2014). Исследование путей развития МК ожирения и его купирования актуально, так как в популяции человека среди генетически обусловленных типов ожирения наиболее часто встречается именно меланокортиновый тип (Lee, 2009; Waalén, 2014).

МК система состоит из пяти типов МК рецепторов, которые распространены в мозге (центральная МК система) и периферических тканях (периферическая МК система), их агонистов (меланокортиновые пептиды: аденокортикотропный гормон (АКТГ), все формы меланоцитстимулирующего гормона (МСГ- α , - β и - γ) и естественных антагонистов (белок Агути, Agouti related protein, AgRP) (Gantz, Fong, 2003). Активация МК рецепторов гипоталамуса вызывает повышение, а блокада – снижение аппетита (Brito et al., 2007; Silva et al., 2014).

Удобной моделью для изучения развития МК ожирения являются мыши, несущие аутосомную спонтанную мутацию *yellow* в локусе *agouti* (*A^y* мыши) (Wolff et al., 1999a), которая вызывает неконтролируемую и повсеместную экспрессию гена *Agouti* (Michaud et al., 1994). Продукт гена, белок Агути – естественный антагонист МК рецепторов (Макарова, 2002), т. е. мутация снижает активность МК рецепторов во всех клетках организма, это приводит к повышению аппетита (Бажан и др., 2005) и снижению расхода энергии (Michaud et al., 1994). С возрастом у *A^y* мышей развиваются ожирение и Д2Т, гипергликемия и гиперинсулинемия (Cargill et al., 2004; Бажан и др., 2005). Показано, что МК рецепторы экспрессируются не только в мозге, но и на клетках скелетной мускулатуры и адипоцитах белой жировой ткани (Gantz, Fong, 2003; An et al., 2007), т. е. в тканях, которые участвуют в регуляции метаболизма глюкозы и жиров.

В белой жировой ткани осуществляются захват глюкозы, отложение жиров (липогенез) и их мобилизация (липолиз). Эти процессы находятся под контролем ключевых ферментов: транспортера глюкозы 4-го типа (Глют4), внеклеточной липопротеинлипазы (ЛПЛ) и внутриклеточной гормон-чувствительной липазы (ГЧЛ) соответственно (Carmen, Victor, 2006; Im et al., 2007; Lass et al., 2011). В бурой жировой ткани происходит несократительный термогенез, который регулируется расслабляющим белком 1 (uncoupling protein 1, UCP1), (Cannon, Nedergaard, 2004). В скелетной мускулатуре осуществляются захват и окисление глюкозы и свободных жирных кислот (СЖК). Эти процессы находятся под контролем ключевых ферментов: Глют4, карнитин пальмитоилтрансферазы-1 (СРТ1) и расслабляющего белка 3 (uncoupling pro-

tein 3, UCP3) (Bonfont et al., 2004; Talbot et al., 2004; Im et al., 2007).

В настоящее время достаточно хорошо описан спектр нарушений углеводно-жирового обмена на фоне развитого МК ожирения у *A^y* мышей. У них на фоне ожирения увеличен размер адипоцитов белого жира (Бажан и др., 2005), снижены экспрессия гена липопротеинлипазы (lipoprotein lipase, *Lpl*) и уровень адипонектина в белом жире, повышен уровень холестерина и лептина в плазме крови по сравнению с контрольными мышами того же возраста, у которых нет ожирения (Chiu et al., 2004). Поскольку МК рецепторы обнаружены в белом и буром жире и мышцах – тканях, влияющих на обмен жиров и углеводов, можно предположить, что нарушения обмена энергии у мышей с мутацией *A^y*, которая снижает активность МК рецепторов, может начинаться задолго до манифестации ожирения. В доступной литературе мы не встретили работ, посвященных изучению динамики возрастных изменений экспрессии генов белков, участвующих в регуляции процессов обмена энергии в периферических тканях, у мышей с доминантной мутацией в локусе *agouti*.

Цель данной работы заключалась в изучении изменений относительной экспрессии генов ключевых белков в белой жировой ткани: ЛПЛ *Lpl*, ГЧЛ *Lipe*, Глют4 *Slc2a4*; в бурой жировой ткани: UCP1 *Ucp1* и в скелетной мускулатуре: UCP3 *Ucp3*, СРТ1 *Cpt1b*, Глют4 *Slc2a4* у *A^y* мышей по мере развития ожирения.

Исследование показало, что в молодом возрасте (10 нед) задолго до манифестации ожирения у *A^y* мышей в скелетных мышцах была снижена экспрессия гена *Cpt1b*, вовлеченного в окисление жирных кислот, в раннем взрослом возрасте (15 нед) у них отсутствовали транзитный пик транскрипции генов белков, регулирующих окисление СЖК в мышцах (*Cpt1b* и *Ucp3*), гидролиз триглицеридов (*Lipe*) и захват глюкозы (*Slc2a4*) в белом жире. Снижение транскрипционной активности исследованных генов в мышцах и белом жире может инициировать развитие меланокортинового ожирения.

Материалы и методы

Этическая политика. Все эксперименты выполнены в соответствии с Европейской конвенцией об охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, протокол № 123, Страсбург, 1985 г.), и российских национальных инструкций по уходу и использованию лабораторных животных. Протоколы одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 35 от 26 октября 2016 г.). Были предприняты все усилия для сведения к минимуму страдания животных и сокращения числа используемых животных.

Животные и протокол эксперимента. Работу проводили на мышах, содержащихся в виварии Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) в условиях постоянного светового режима (12С:12Т) и свободного доступа к воде и пище («Ассортимент-Агро», Тураково, Московская область, Россия) при температуре 22 ± 2 °С. В эксперимент брали самцов мышей линии C57Bl/6J, гетерозиготных по доминантной мутации *yellow* локуса *agouti* (генотип *A^{y/a}*). Контролем служили мыши-сиссы

стандартного генотипа данной линии (a/a мыши). В возрасте 28 дней самцов отсаживали от матери и помещали в клетки по одному. Мышей случайным образом определяли в три возрастные группы: 10, 15 и 30 нед. Эти возрасты соответствуют этапам развития ожирения у A^y/a мышей: 10 нед – отсутствуют различия в массе тела между генотипами, 15 нед – масса тела у A^y/a мышей незначительно, но достоверно превышает таковую у a/a мышей и 30 нед – у A^y/a мышей развивается ожирение и Д2Т (гиперинсулинемия и гипергликемия) (Бажан и др., 2005). В каждой группе было по пять-семь животных каждого генотипа. Мышей подвергали декапитации без использования анестезии. Сбор крови осуществляли в пробирки, обработанные ЭДТА, которые сразу помещали на лед. Плазму отделяли центрифугированием и хранили при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ до проведения анализа. Образцы бедренной мышцы, абдоминального белого жира, меж- и подлопаточного бурого жира после извлечения сразу взвешивали и быстро помещали в жидкий азот для дальнейшего измерения уровня экспрессии генов. Индексы массы белой и бурой жировой ткани рассчитывали как отношение массы жировой ткани к массе тела.

Биохимические показатели крови. Определение концентрации в плазме крови СЖК, триглицеридов (ТГ) и глюкозы проводили с использованием коммерческих наборов: для СЖК и глюкозы – DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Хольцхайм, Германия); для ТГ – ЗАО «ДИАКОН-ДС» (Пушино, Россия).

Relative quantification real-time PCR. Выделение суммарной РНК из белой и бурой жировой тканей и скелетной мускулатуры проводили с использованием реагента TRIzol (Ambion, the RNA Company, США), согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV (Promega Corporation, Madison, WI, США) и праймера Oligo-dT («БИОССЕТ», Новосибирск, Россия). В пробу вносили 1 мкг общей РНК. Для оценки относительного уровня мРНК *Slc2a4* в белой жировой ткани и скелетной мускулатуре амплификацию фрагментов кДНК методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием 5'-нуклеаз на основе флуоресцентных зондов реагентов Applied Biosystems: TaqMan® gene expression assay Mm01245502_m1; TaqMan gene expression Master Mix; TaqMan Endogenous Controls with FAM TM dye label and MGB Mouse beta-actin (ACTB). Амплификация остальных генов методом ПЦР в реальном времени проводилась с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I и ROX («Синтол», Россия). Праймеры: *Ucp1* (длина фрагмента 143 п. н., sense – 5'-gggcattcagaggcaaatcag-3', antisense – 5'-ctgccacacctccagtcattaag-3') (Nakamura et al., 2013); *Lpl* (длина фрагмента 274 п. н., sense – 5'-tcttgattacacggaggtg-3', antisense – 5'-tctgtgtgtgtgctcagtg-3') (Yang et al., 2007); *Lipe* (длина фрагмента 162 п. н., sense – 5'-gactcaccgctgactcc-3', antisense – 5'-ctgtctcgttgctgttga-3') (Ying et al., 2013); *Cpt1b* (длина фрагмента 117 п. н., sense – 5'-ttcaactacacgcatccc-3', antisense – 5'-gccctcatagaccagacc-3') (Kim et al., 2014); *Ucp3* (длина фрагмента 105 п. н., sense – 5'-tgttactgacaactcccc-3', antisense – 5'-tcatgtatcggttcttacc-3') (Lee et al., 2013); β -actin (длина фрагмента 142 п. н., sense – 5'-caacgagcgggtccgatg-3', antisense – 5'-cactgtgtggcatagagg-3') (Gong et al., 2008). Все

реакции выполнены в объеме пробы 25 мкл в 96-луночных планшетах (MicroAMP, Applied Biosystems®) в амплификаторе ViiA™ 7 (Applied Biosystems®) в соответствии с протоколом ($50\text{ }^\circ\text{C}$ 2 мин, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 10 мин, 40 циклов $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 с, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 1 мин). Осуществляли амплификацию двух репликатов каждой пробы. Уровень мРНК гена в каждой пробе оценивали по пороговому циклу начала флуоресценции и нормировали относительно уровня мРНК гена в одной контрольной пробе (сравнительный метод ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) для мышей обоих генотипов).

Статистическая обработка результатов. Все результаты представлены как среднее \pm ошибка среднего. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft). Данные обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с главными факторами: «генотип» (A^y/a и a/a) и «возраст» (10, 15 и 30 нед). Для сравнения отдельных групп использовали post-hoc Fisher's LSD test, в некоторых случаях применяли также t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверно значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Масса тела, индекс белого абдоминального и бурого меж- и подлопаточного жира

С возрастом масса тела повышалась как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,34} = 315.2$; $p < 0.001$), но у мышей генотипа A^y/a повышение было более выраженным (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,34} = 88.1$; $p < 0.001$). Масса тела была выше у A^y/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,34} = 126.6$; $p < 0.001$), особенно ярко это проявлялось в возрасте 30 нед, когда она в 1.5 раза достоверно превышала таковую у a/a мышей ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) (рис. 1, а).

Повышение массы тела у A^y/a мышей ассоциировалось с увеличением доли белого и бурого жира. С возрастом индекс белого жира увеличился как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,32} = 118.7$; $p < 0.001$), у A^y/a мышей это увеличение было более выраженным (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,32} = 56.7$; $p < 0.001$). Индекс белого жира был выше у A^y/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,32} = 65.8$, $p < 0.001$), наиболее показательным в этом отношении был возраст 30 нед, когда у A^y/a мышей он достоверно превышал таковой у a/a мышей более чем в три раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 1, б).

С возрастом индекс бурого жира увеличился как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,34} = 35.7$; $p < 0.001$), но у A^y/a мышей увеличение было более выраженным (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,34} = 4.5$; $p < 0.05$). В возрасте 30 нед индекс бурого жира у A^y/a мышей был выше, чем у a/a мышей ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 1, в).

Биохимические показатели крови. Уровень ТГ в крови с возрастом повышался только у A^y/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,30} = 9.8$; $p < 0.01$; возраста $F_{2,32} = 5.6$; $p < 0.01$), у a/a мышей возрастных изменений не обнаружено. Наиболее существенные генотипические различия отмечались в возрасте 30 нед: у A^y/a мышей уровень ТГ

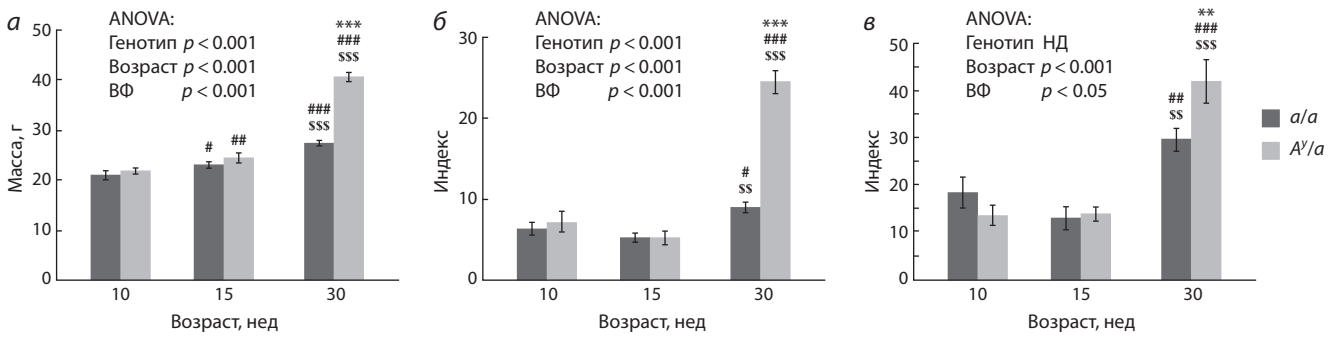


Рис. 1. Масса тела (а), индекс белого жира (б) и бурого жира (в) у a/a и A^y/a мышей в возрасте 10, 15 и 30 нед.

Здесь и на рис. 2–4: факторы ANOVA: генотип, возраст, взаимодействие факторов (ВФ). Результаты представлены как среднее \pm ошибка среднего.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ по сравнению с a/a мышами того же возраста;

$p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ по сравнению с 10-недельными мышами того же генотипа (post-hoc Fisher's LSD test);

sss $p < 0.001$, ss $p < 0.01$, s $p < 0.05$ по сравнению с 15-недельными мышами того же генотипа (post-hoc Fisher's LSD test).

НД – не достоверно.

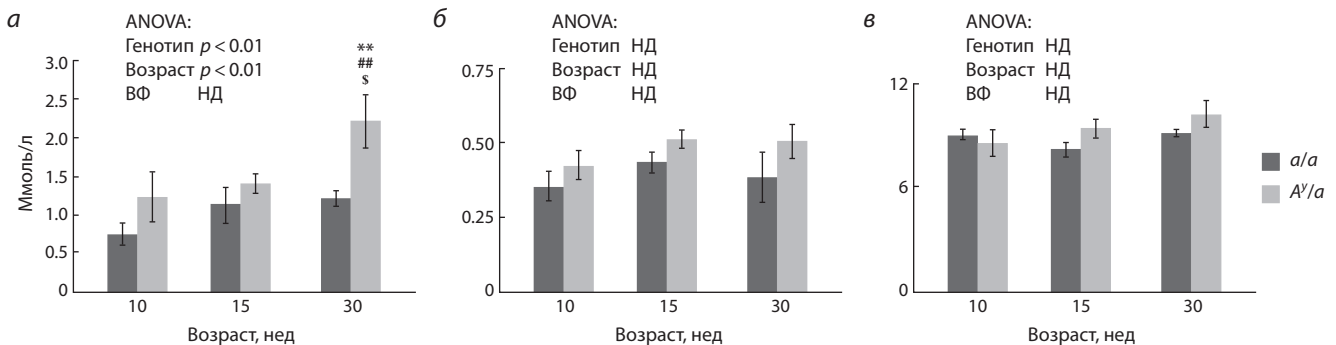


Рис. 2. Уровни ТГ (а), СЖК (б) и глюкозы (в) в крови у a/a и A^y/a мышей в возрасте 10, 15 и 30 нед.

Усл. обозн. см. рис. 1.

в крови был выше, чем у a/a мышей, в 1.8 раза ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 2, а).

С возрастом концентрация СЖК в плазме крови не изменялась как у a/a , так и у A^y/a мышей. Однако наблюдалось влияние генотипа (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,30} = 4.15$; $p < 0.05$) на уровень СЖК в крови. Ни в одной возрастной группе не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по этому параметру (см. рис. 2, б).

Концентрация глюкозы в крови не изменялась с возрастом как у a/a , так и у A^y/a мышей. Ни в одной возрастной группе не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по этому параметру (см. рис. 2, в).

Относительный уровень мРНК ключевых генов белков, регулирующих углеводно-жировой обмен

Белая жировая ткань. Уровень мРНК *Lpl* оставался неизменным с возрастом как у a/a , так и у A^y/a мышей. У A^y/a мышей он был ниже, чем у a/a мышей (влияние генотипа $F_{1,29} = 7.1$; $p < 0.01$). Наиболее существенные генотипические различия отмечались в возрасте 30 нед, когда уровень мРНК *Lpl* у A^y/a был в два раза ниже, чем у a/a мышей ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (рис. 3, а).

У мышей обоих генотипов уровень мРНК *Lipe* изменялся с возрастом: повышался к возрасту 15 нед, а затем снижался к 30 нед (ANOVA, влияние возраста $F_{2,30} = 30.7$; $p < 0.001$). Однако у A^y/a мышей возрастные изменения

были значительно менее выражены, чем у a/a мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,30} = 3.8$, $p < 0.05$). Если у a/a мышей к 15 нед уровень мРНК *Lipe* повысился в 7.7 раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test), то у A^y/a мышей это повышение было недостоверным ($p < 0.1$, post-hoc Fisher's LSD test). Ни в одной возрастной группе не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по абсолютным значениям уровня мРНК *Lipe* (см. рис. 3, б).

Возрастная динамика уровня мРНК *Slc2a4* совпадала с таковой по уровню мРНК *Lipe*. У мышей обоих генотипов уровень мРНК *Slc2a4* повышался к возрасту 15 нед, а затем снижался к 30 нед (ANOVA, влияние возраста $F_{2,26} = 13.7$; $p < 0.001$). Однако у A^y/a мышей возрастные изменения были значительно менее выражены, чем у a/a мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,26} = 2.7$; $p = 0.08$). Если у a/a мышей к 15 нед уровень мРНК *Slc2a4* повысился в 17 раз ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test), то у A^y/a мышей это повышение было недостоверным ($p < 0.1$, post-hoc Fisher's LSD test). По абсолютным значениям уровня мРНК *Slc2a4* не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами ни в одной возрастной группе (см. рис. 3, в).

Бурая жировая ткань. С возрастом уровень мРНК *Ucp1* снижался как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,31} = 12.4$; $p < 0.001$). Ни в одной воз-

растной группе не было обнаружено различий между *a/a* и *A^y/a* мышами по абсолютным значениям этого параметра (см. рис. 3, *з*).

Скелетная мускулатура. У *A^y/a* мышей в отличие от *a/a* мышей уровень мРНК *Slc2a4* снижался с возрастом (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,30} = 3.0$; $p = 0.07$). У *A^y/a* мышей в возрасте 10 нед уровень мРНК *Slc2a4* был выше, чем у *a/a* мышей ($p < 0.05$, post-hoc Fisher's LSD test), затем снизился и в возрасте 30 нед был почти в три раза ниже, чем в возрасте 10 нед ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (рис. 4, *а*).

Уровень мРНК *Cpt1b* изменялся с возрастом (ANOVA, влияние возраста $F_{2,31} = 23.9$; $p < 0.001$). Возрастная динамика существенно различалась у *A^y/a* и *a/a* мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,31} = 4.1$; $p < 0.05$). У *a/a* мышей уровень мРНК *Cpt1b* повышался к 15 нед в 2.5 раза, у *A^y/a* мышей такого повышения не наблюдалось. Уровень мРНК *CPT1* у *A^y/a* мышей был ниже, чем у *a/a* мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,31} = 11.8$; $p < 0.01$), особенно ярко это проявлялось в 10 нед, когда он был ниже в 2.2 раза ($p < 0.05$, *t*-критерий Стьюдента), и в 15 нед – в 2.5 раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) ниже, чем у *a/a* мышей (рис. 4, *б*).

Уровень мРНК *Ucp3* также изменялся с возрастом (ANOVA, влияние возраста $F_{2,33} = 5.6$; $p < 0.01$), и возрастная динамика существенно различалась у *A^y/a* и *a/a* мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,33} = 5.6$; $p < 0.01$). У *a/a*

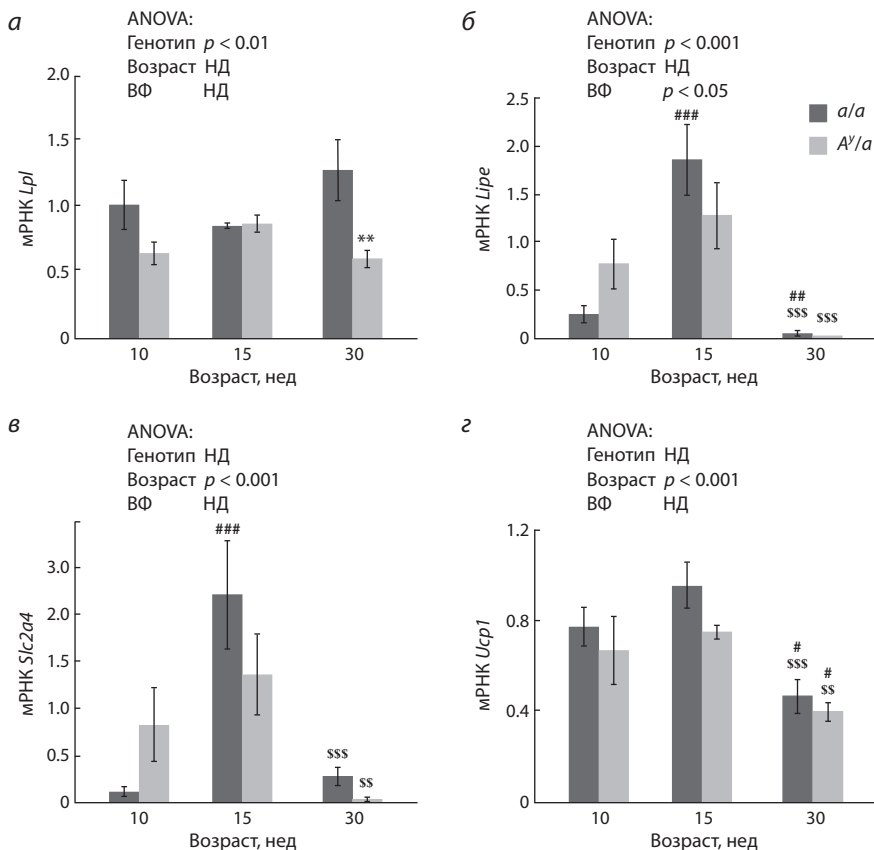


Рис. 3. Уровень мРНК *Lpl* (*а*), *Lipe* (*б*), *Slc2a4* (*в*) в белой жировой ткани и уровень мРНК *Ucp1* (*г*) в бурой жировой ткани у *a/a* и *A^y/a* мышей в возрасте 10, 15 и 30 нед.

Усл. обозн. см. рис. 1.

мышей уровень мРНК *Ucp3* повысился к возрасту 15 нед в 2.3 раза ($p < 0.001$ post-hoc Fisher's LSD test), а затем снизился к возрасту 30 нед в 2.4 раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test), у *A^y/a* мышей не наблюдалось подобных изменений. Уровень мРНК *Ucp3* у *A^y/a* мышей был ниже, чем у *a/a* мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,33} = 9.1$; $p < 0.01$), особенно ярко это проявлялось в возрасте 15 нед, когда он у *A^y/a* мышей был в 2.5 раза ниже, чем у *a/a* мышей ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 4, *в*).

Таким образом, *A^y/a* и *a/a* мыши демонстрировали различную динамику возрастных изменений уровня мРНК *Cpt1b* и *Ucp3* в скелетной мускулатуре и существенные различия по абсолютным значениям в возрасте 15 нед.

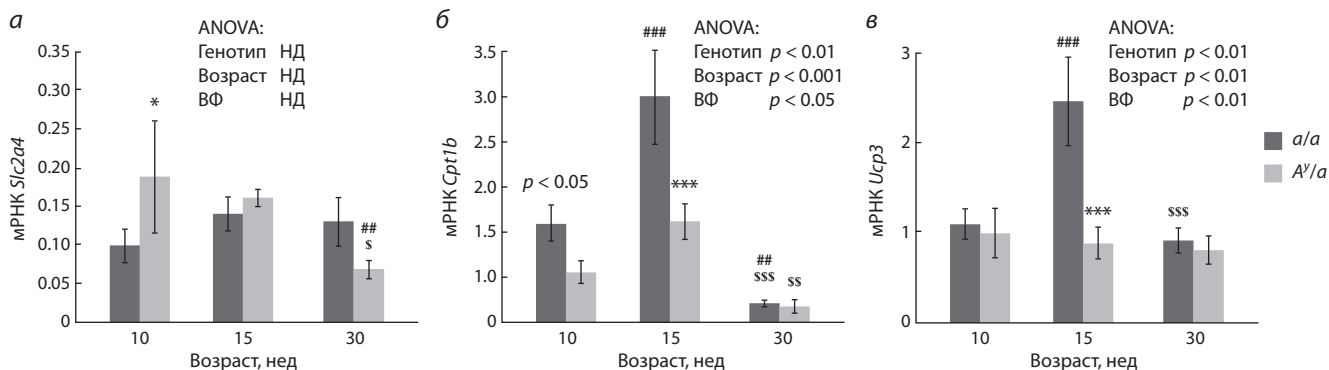


Рис. 4. Уровень мРНК *Slc2a4* (*а*), *Cpt1b* (*б*) и *Ucp3* (*в*) в скелетной мускулатуре у *a/a* и *A^y/a* мышей в возрасте 10, 15 и 30 нед.

Усл. обозн. см. рис. 1.

Обсуждение

В настоящей работе мы впервые показали динамику экспрессии генов белков, регулирующих процессы липолиза, липогенеза и захвата глюкозы в белом жире, окисления СЖК и захвата глюкозы в мышцах, а также термогенеза в буром жире по мере развития ожирения у мышей, предрасположенных к монолокусному МК ожирению.

Влияние мутации *A^y* на экспрессию генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, у мышей в возрасте 10 нед
Интенсивность экспрессии генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, в мышцах и жире определяется факторами, как средовыми, в частности развитием ожирения (Kim et al., 2006), так и генетическими. В возрасте 10 нед метаболический фенотип *A^{y/a}* мышей не отличался от такового у *a/a* мышей. Они имели одинаковые массу тела, доли белого и бурого жира, уровни биохимических показателей в крови, а также уровни мРНК всех исследованных генов в белом и буром жире. Однако в скелетной мускулатуре у *A^{y/a}* мышей уже в возрасте 10 нед уровень мРНК *Cpt1b* (молекулярный маркер окисления СЖК) был в два раза ниже, чем у *a/a* мышей. Эти данные предполагают, что скелетная мускулатура является наиболее вероятным звеном непосредственного влияния периферической МК системы на углеводно-жировой обмен. Известно, что на клетках скелетной мускулатуры экспрессируются МК рецепторы 1-го и 5-го типов (Gantz, Fong, 2003; An et al., 2007), активация которых *in vitro* усиливает окисление СЖК, что ассоциируется с активацией фермента СРТ1 и молекулярного каскада AMP-activated protein kinase (АМПК) (An et al., 2007), который через стимуляцию экспрессии peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) активирует промотор гена *Cpt1b* (Liu et al., 2007). Мы предполагаем, что у *A^{y/a}* мышей блокада МК рецептора 5-го типа, вызванная повсеместной экспрессией гена белка Агути, приводит к снижению экспрессии гена *Cpt1b* в скелетной мускулатуре. Этот эффект в большей или меньшей степени проявляется во всех возрастных группах.

Кроме того, в возрасте 10 нед у *A^{y/a}* мышей в мышцах пониженная (относительно *a/a* мышей) экспрессия *Cpt1b* сочеталась с повышенной (относительно *a/a* мышей) экспрессией *Slc2a4*. Это согласуется с данными других авторов (Shi et al., 2013), которые показали, что у мышей C57Bl/6J с недостаточностью по гену *Cpt1b* повышен уровень мРНК *Slc2a4* в скелетной мускулатуре. Разнонаправленные изменения в экспрессии *Slc2a4* и *Cpt1b* в мышцах у 10-недельных *A^{y/a}* мышей относительно контроля еще раз подтверждают существование конкурентных взаимоотношений между использованием в качестве источников энергии жиров (молекулярный маркер – мРНК *Cpt1b*) и углеводов (молекулярный маркер – мРНК *Slc2a4*) (Physiology, 2004).

Влияние мутации *A^y* на динамику изменения экспрессии генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, у мышей 10–15-й нед жизни

У мышей линии C57Bl/6J в период наиболее интенсивного постпубертатного роста (10–15 нед) (Tare et al., 2002) не обнаружено генотипических различий по массе тела,

доле жира, концентрации ТГ, СЖК и глюкозы в крови. У мышей обоих генотипов к возрасту 15 нед повысилась масса тела и не изменялись другие показатели углеводно-жирового обмена, включая долю белого и бурого жира. По-видимому, увеличение массы тела в этот период в основном было обусловлено линейным ростом мышечной и костной ткани, и мутация *A^y* не влияла на этот процесс. Однако в этот период мутация *A^y* затрагивала динамику изменений транскрипции генов, белки которых участвуют в регуляции углеводно-жирового обмена, в белой жировой ткани и мышцах. У *a/a* мышей 15-недельного возраста по сравнению с 10-недельными мышцами были многократно повышены уровни мРНК генов белков, регулирующих процессы липолиза (*Lipe*) и захвата глюкозы (*Slc2a4*) в белом жире, а также окисления СЖК (*Cpt1b*) и защиту от окислительного стресса (*Ucp3*) в мышцах. Это повышение экспрессии генов могло быть связано с активацией в возрасте 15 нед андрогенной функции семенника. Показано, что у самцов мышей C57Bl/6J концентрация андрогенов в плазме и их продукция в семенниках возрастают с 10-й до 15-й нед жизни в 8–10 раз (Осадчук и др., 2016). Андрогены способны активировать гормональную ось – гормон роста (ГР)/инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1) (Cummings, Merriam, 1999). Совместно гормоны этой оси и андрогены усиливают как анаболические процессы (Yakar et al., 2016), так и окисление энергетических субстратов в организме (Richelsen et al., 2000; Kelly, Jones, 2013; Varlamov et al., 2014).

Мутация *A^y* устраняла повышение экспрессии всех вышеперечисленных генов в возрасте 15 нед. Можно предположить, что одной из причин этого является изменение активности системы ГР/ИФР-1. Показано (Wolff et al., 1999b), что у мышей с мутацией *viable yellow* (*A^y*), которые также характеризуются повсеместной экспрессией блокатора МК рецепторов – белка Агути (Claycombe et al., 2000), снижен относительно мышей дикого типа, диапазон возрастных колебаний ГР в период интенсивного роста. В другой модели генетического снижения активности МК рецепторов – мышей, нокаутных по МК рецептору 4-го типа, – в возрасте 15–17 нед снижен уровень ГР в крови по сравнению с мышцами дикого типа (Shaw et al., 2005). Следовательно, мутации, снижающие активность МК рецепторов, в молодом и раннем взрослом возрасте подавляют активность системы ГР/ИФР-1, которая является одним из пусковых механизмов активации генов в белом жире и мышцах в ходе онтогенеза.

Полученные результаты позволяют предположить, что в возрасте 15 нед в мышцах у *A^{y/a}* мышей по сравнению с контрольными мышцами того же возраста понижено окисление СЖК (мРНК *Cpt1b*) и повышено образование продуктов перекисного окисления липидов, несущих реактивные формы кислорода (мРНК *Ucp3*), а в белом жире уменьшена интенсивность липолиза (мРНК *Lipe*). Эти процессы должны приводить к накоплению СЖК, способствовать депонированию ТГ в клетках жира. Кроме того, у 15-недельных *A^{y/a}* мышей был снижен относительно *a/a* мышей уровень мРНК *Slc2a4*. Это, наряду со пониженным уровнем мРНК *Ucp3*, может способствовать формированию у *A^{y/a}* мышей инсулинорезистентности (Fridlyand, Philipson, 2006) еще до манифестации МК ожирения.

Влияние мутации *A^y* на динамику изменения экспрессии генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, у мышей с 15-й по 30-ю нед жизни

В период с 15-й по 30-ю нед жизни у мышей обоих генотипов наряду с увеличением массы тела увеличивалась также доля белого и бурого жира и повышался уровень ТГ в крови, т. е. появлялись признаки развития ожирения. У мышей обоих генотипов повышение доли жировой ткани ассоциировалось со значительным снижением экспрессии *Lipe*, *Slc2a4* в белом жире, *Cpt1b* в мышцах и *Ucp1* (термогенез) в буром жире. Это снижение транскрипционной активности нельзя объяснить снижением уровня андрогенов в крови у 30-недельных мышей по сравнению с 15-недельными, поскольку показано, что у 30-недельных *a/a* и *A^y/a* мышей концентрация тестостерона не отличалась от таковой у 15-недельных мышей (Осадчук и др., 2016). Причины возрастного снижения экспрессии генов, которое было обнаружено у мышей как дикого типа, так и склонных к развитию генетического ожирения, требуют дальнейшего изучения. Интересно отметить, что усиление к возрасту 15 нед (описанное у *a/a* мышей) и последующее снижение к возрасту 30 нед (у *a/a* и *A^y/a* мышей) экспрессии изученных в работе генов полностью совпадают с возрастной динамикой добровольной двигательной активности у C57Bl/6J мышей (Figueiredo et al., 2009). Согласно данным, у мышей в возрасте 14–15 нед наблюдается пик двигательной активности с последующим снижением к возрасту 25–30 нед. Положительная корреляция между физической активностью и экспрессией *Cpt1b* и *Ucp3* в мышцах, *Ucp1* в буром жире, а также интенсивностью липолиза в белом жире показана рядом исследователей. Физическая нагрузка повышает экспрессию гена и белка CPT1 и UCP3 (Niu et al., 2010; Shen et al., 2015) в мышцах, *Ucp1* – в буром жире (Slocum et al., 2013), а также усиливает активность липолиза в белом жире (Niu et al., 2010; Shen et al., 2015).

Очевидно, что снижение к возрасту 30 нед экспрессии генов в мышцах (*Ucp3*, *Cpt1b*), белом жире (*Lipe*, *Slc2a4*) и буром жире (*Ucp1*) инициировало развитие возрастного «физиологического» ожирения даже у *a/a* мышей. Однако, несмотря на то что у 30-недельных *A^y/a* мышей уровни мРНК вышеперечисленных генов не отличались от таковых у 30-недельных *a/a* мышей, признаки ожирения у *A^y/a* мышей были выражены значительно сильнее. Это может быть связано с тем, что на предыдущих этапах развития *A^y/a* мышей был изменен профиль экспрессии генов жирового обмена в мышцах: у них снижена относительно *a/a* мышей транскрипция *Cpt1b* (в 10 и 15 нед) и транскрипция *Ucp3* (в 15 нед). Кроме того, в возрасте 30 нед у *A^y/a* мышей снижена относительно *a/a* мышей транскрипция *Lpl* в белом жире. Эти результаты согласуются с данными других авторов (Chiu et al., 2004), которые показали, что у мышей с мутацией *A^y* при развитии ожирения повышены уровни в крови липопротеинов высокой и низкой плотности, а также снижен уровень мРНК *Lpl* в белом жире в два раза по сравнению с контрольными мышцами. Можно предположить, что сниженный уровень мРНК *Lpl* у 30-недельных *A^y/a* мышей способствовал снижению гидролиза ТГ и повышению их уровня в крови (Goldberg, Merkel, 2001; Kersten, 2014).

Таким образом, мы впервые показали, что развитие ожирения у *A^y/a* мышей может быть связано не только с повышенным потреблением пищи, но и со снижением экспрессии генов белков ключевых ферментов углеводно-жирового обмена в мышцах и белом жире, которое проявлялось задолго до манифестации ожирения. Уже в возрасте 10 нед в скелетных мышцах у *A^y/a* мышей была снижена (относительно мышей дикого типа) экспрессия *Cpt1b*, контролирующего окисление СЖК. В возрасте 15 нед мутация *A^y* устраняла возрастную активацию экспрессии генов белков, регулирующих окисление СЖК в мышцах (*Cpt1b*, *Ucp3*), гидролиз ТГ (*Lipe*) и захват глюкозы (*Slc2a4*) в белом жире и тем самым способствовала отложению жира. Мутация *A^y* не влияла на снижение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию липолиза, захвата глюкозы в белом жире, окисление СЖК в мышцах и термогенез в буром жире, которые обнаружены у мышей дикого типа в возрасте 30 нед и ассоциировались с формированием у них возрастного «физиологического» ожирения.

Окончательный вывод, о том, какой вклад в развитие МК ожирения вносит изменение профиля экспрессии генов в мышцах, белом и буром жире, можно будет сделать после изучения экспрессии соответствующих белков в тех же возрастных группах мышей.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-15-01036).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Бажан Н.М., Яковлева Т.В., Багинская Н.В., Шевченко А.Ю., Макарова Е.Н. Изменения углеводно-жирового обмена в ходе развития меланокортинового ожирения у мышей с мутацией *Agouti yellow*. Рос. физиол. журн. 2005;91(12):1445-1453.
- Макарова Е.Н. Белки агутти – новые регуляторы действия меланокортиновых рецепторов. Усп. соврем. биол. 2002;122(4):365-375.
- Осадчук Л.В., Клещев М.А., Бакланов А.В., Бажан Н.М. Тестикулярная функция и липидный обмен у самцов мышей с наследственной предрасположенностью к ожирению. Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2016; 102(3): 340-350.
- An J.J., Rhee Y., Kim S.H., Kim D.M., Han D.H., Hwang J.H., Jin Y.J., Cha B.S., Baik J.H., Lee W.T., Lim S.K. Peripheral effect of α -melanocyte-stimulating hormone on fatty acid oxidation in skeletal muscle. J. Biol. Chem. 2007;282(5):2862-2870. DOI 10.1074/jbc.M603454200.
- Bonnefont J.P., Djouadi F., Prip-Buus C., Gobin S., Munnich A., Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. Mol. Asp. Med. 2004;25(5):495-520. DOI 10.1016/j.mam.2004.06.004.
- Brito M.N., Brito N.A., Baro D.J., Song C.K., Bartness T.J. Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. Endocrinology. 2007;148(11):5339-5347. DOI 10.1210/en.2007-0621.
- Cannon B., Nedergaard J.A.N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol. Rev. 2004;84(1):277-359. DOI 10.1152/physrev.00015.2003.
- Carmen G.-Y., Victor S.-M. Signalling mechanisms regulating lipolysis. Cell. Sign. 2006;18:401-408. DOI 10.1016/j.cellsig.2005.08.009.

- Carroll L., Voisey J., Van Daal A. Mouse models of obesity. *Clin. Dermatol.* 2004;22(4):345-349. DOI 10.1016/j.clindermatol.2004.01.004.
- Chiu S., Fisler J.S., Espinal G.M., Havel P.J., Stern J.S., Warden C.H. The yellow agouti mutation alters some but not all responses to diet and exercise. *Obes. Res.* 2004;12(8):1243-1255.
- Claycombe K.J., Xue B.Z., Mynatt R.L., Zemel M.B., Moustaid-Moussa N. Regulation of leptin by agouti. *Physiol. Genomics.* 2000;2(3):101-105.
- Cummings D.E., Merriam G.R. Age-related changes in growth hormone secretion: Should the somatopause be treated? *Semin. Reprod. Endocr.* 1999;17(4):311-325. DOI 10.1055/s-2007-1016241.
- Figueiredo P.A., Powers S.K., Ferreira R.M., Amado F., Appell H.J., Duarte J.A. Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. *J. Geront. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2009;64(9):927-939. DOI 10.1093/gerona/glp066.
- Fridlyand L.E., Philipson L.H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 2006;8(2):136-145. DOI 10.1111/j.1463-1326.2005.00496.x.
- Gantz I., Fong T.M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003;284(3):468-474. DOI 10.1152/ajpendo.00434.2002.
- Goldberg I.J., Merkel M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front. Biosci.* 2001;6(6):D388-D405.
- Gong L., Yao F., Hockman K., Heng H.H., Morton G.J., Takeda K., Akira S., Low M.J., Rubinstein M., MacKenzie R.G. Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology.* 2008;149(7):3346-3354. DOI 10.1210/en.2007-0945.
- Im S.S., Kwon S.K., Kim T.H., Kim H.I., Ahn Y.H. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life.* 2007;59(3):134-145. DOI 10.1080/15216540701313788.
- Karpe F., Dickmann J.R., Frayn K.N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes.* 2011;60(10):2441-2449. DOI 10.2337/db11-0425.
- Kelly D.M., Jones T.H. Testosterone: A metabolic hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* 2013;217(3):R25-R45. DOI 10.1530/JOE-12-0455.
- Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molec. Cell. Biol. Lipids.* 2014;1841(7):919-933. DOI 10.1016/j.bbalip.2014.03.013.
- Kim J.Y., Tillison K., Lee J.-H., Rearick D.A., Smas C.M. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- α in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR γ . *Am. J. Physiol. Endocr. Metab.* 2006;291:E115-E127. DOI 10.1152/ajpendo.00317.2005.
- Kim T., He L., Johnson M.S., Li Y., Zeng L., Ding Y., Long Q., Moore J.F., Sharer J.D., Nagy T.R., Young M.E., Wood P.A., Yang Q. Carnitine palmitoyltransferase 1b deficiency protects mice from diet-induced insulin resistance. *J. Diabetes Metab.* 2014;5(4):361. DOI 10.4172/2155-6156.1000361.
- Lass A., Zimmermann R., Oberer M., Zechner R. Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid. Res.* 2011;50:14-27. DOI 10.1016/j.plipres.2010.10.004.
- Lee M.S., Kim I.H., Kim Y. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on uncoupling protein 3 gene expression in C₂C₁₂ muscle cells. *Nutrients.* 2013;5(5):1660-1671. DOI 10.3390/nu5051660.
- Lee Y.S. The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 2009;38(1):34-44.
- Liu H.Y., Zheng G., Zhu H., Woldegiorgis G. Hormonal and nutritional regulation of muscle carnitine palmitoyltransferase I gene expression in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007;465(2):437-442. DOI 10.1016/j.abb.2007.06.026.
- Michaud E.J., Bultman S.J., Klebig M.L., Van Vugt M.J., Stubbs L., Russell L.B., Woychik R.P. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (*Ay*) mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics.* 1994;91(7):2562-2566.
- Murea M., Ma L., Freedman B.I. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev. Diabet. Stud.* 2012;9(1):6-22. DOI 10.1900/RDS.2012.9.6.
- Nakamura Y., Sato T., Shiimura Y., Miura Y., Kojima M. FABP3 and brown adipocyte-characteristic mitochondrial fatty acid oxidation enzymes are induced in beige cells in a different pathway from UCP1. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2013;441(1):42-46. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.10.014.
- Niu Y., Yuan H., Fu L. Aerobic exercise's reversal of insulin resistance by activating AMPK α -ACC-CPT1 signaling in the skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2010;20(5):370-380.
- Physiology. Eds. R.M. Berne, M.N. Levy, B.M. Koeppen, B.A. Stanton. St. Louis: Mosby, 2004;1014.
- Richelsen B., Pedersen S.B., Kristensen K., Børglum J.D., Nørrelund H., Christiansen J.S., Jørgensen J.O. Regulation of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and gene expression in adipose and muscle tissue by growth hormone treatment during weight loss in obese patients. *Metab. Clin. Exp.* 2000;49(7):906-911. DOI 10.1053/meta.2000.6738.
- Shaw A.M., Irani B.G., Moore M.C., Haskell-Luevano C., Millard W.J. Ghrelin-induced food intake and growth hormone secretion are altered in melanocortin 3 and 4 receptor knockout mice. *Peptides.* 2005;26(10):1720-1727.
- Shen Y., Xu X., Yue K., Xu G. Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. *Obesity.* 2015;23(5):1000-1006. DOI 10.1002/oby.21056.
- Shi W., Hu S., Wang W., Zhou X., Qiu W. Skeletal muscle-specific CPT1 deficiency elevates lipotoxic intermediates but preserves insulin sensitivity. *J. Diabetes. Res.* 2013;2013:163062. DOI 10.1155/2013/163062.
- Silva A.A., Carmo J.M., Wang Z., Hall E.J. The brain melanocortin system, sympathetic control, and obesity hypertension. *Physiology.* 2014;29(3):196-202. DOI 10.1152/physiol.00061.2013.
- Slocum N., Durrant J.R., Bailey D., Yoon L., Jordan H., Barton J., Brown R., Clifton H., Milliken L., Harrington T., Kimbrough W., Faber C., Cariello C.A., Elangb. N. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2013;65(5):549-557. DOI 10.1016/j.etp.2012.04.001.
- Talbot D.A., Lambert A.J., Brand M.D. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* 2004;556(1):111-115.
- Tare R.S., Oreffo R.O., Sato K., Rauvala H., Clarke N.M., Roach H.I. Effects of targeted overexpression of pleiotrophin in postnatal bone development. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002;298(3):324-332.
- Varlamov O., Bethea C.L., Roberts C.T. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front. Endocrinol.* 2014;5:241. DOI 10.3389/fendo.2014.00241.
- Waalén J. The genetics of human obesity. *Transl. Res.* 2014;164(4):293-301. DOI 10.1038/nrg1556.
- Wolff G.L., Kodell R.L., Kaput J.A., Visek W.J. Caloric restriction abolishes enhanced metabolic efficiency induced by ectopic agouti protein in yellow mice. *Exp. Biol. Med.* 1999a;221(2):99-104.
- Wolff G.L., Roberts D.W., Mountjoy K.G. Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol. Genomics.* 1999b;1(3):151-163.
- Yakar S., Isaksson O. Regulation of skeletal growth and mineral acquisition by the GH/IGF-1 axis. Lessons from mouse models. *Growth Horm. IGF Res.* 2016;28:26-42. DOI 10.1016/j.ghir.2015.09.004.
- Yang J.Y., Koo J.H., Yoon H.Y., Lee J.H., Park B.H., Kim J.S., Chi M.S., Park J.W. Effect of scopoletin on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Med.* 2007;20(4):527-531.
- Ying H.Z., Zang J.N., Deng L.L., Wang Z.Y., Yu C.H. Pentamethylquercetin reduces fat deposition via Sirt1-mediated pathways in male obese mice induced by a high-fat diet. *Food Chem. Toxicol.* 2013;62:463-469. DOI 10.1016/j.fct.2013.09.002.