

ВЛИЯНИЕ ВКУСОВОГО РЕЦЕПТОРНОГО БЕЛКА T1R3 НА РАЗВИТИЕ ОСТРОВКОВОЙ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ

В. О. Муровец^{1,*}, Е. А. Созонтов^{1,2}, Т. Г. Зачепило¹

Представлено академиком РАН А.Д. Ноздрачевым 25.06.2018 г.

Поступило 18.07.2018 г.

При исследовании мышей с нокаутом гена *Tas1r3* и родительской линии C57BL/6J в качестве контрольной получили приоритетные данные о влиянии белка T1R3 на морфологию островков Лангерганса поджелудочной железы. У мышей с нокаутом *Tas1r3* выявили уменьшение размера островков и плотности их расположения по сравнению с мышами C57BL/6J и снижение экспрессии активной каспазы-3 в островковой ткани. Таким образом, отсутствие нормально функционирующего гена рецептора сладкого вкуса T1R3 приводит к дистрофии островковой ткани и сопряжено с развитием патологических изменений поджелудочной железы, характерных для диабета типа 2 и ожирения у человека.

Ключевые слова: рецептор сладкого, T1R3, нокаут гена *Tas1r3*, поджелудочная железа, островок Лангерганса, каспаза 3.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524841117-120>

Заметным достижением последнего десятилетия в физиологии питания и обмена веществ было обнаружение новых функций у достаточно хорошо исследованных мембранных вкусовых рецепторов семейства T1R. Белок T1R3, основная субъединица рецептора сладкого вкуса и рецептора вкуса аминокислот [1], экспрессируется не только в клетках эпителия языка, но и в желудочно-кишечном тракте, в β -клетках поджелудочной железы, гипоталамусе и многих других органах. В тканях внутренних органов мембранный белок T1R3 и связанные с ним белки внутриклеточного сигнального каскада образуют ещё одну рецепторную систему контроля внеклеточного уровня глюкозы [2]. В настоящее время получены убедительные доказательства участия T1R3 в регуляции углеводного и жирового обмена, продукции инкретинов в тонком кишечнике и инсулина β -клетками поджелудочной железы [3–5]. Опубликованы первые данные, свидетельствующие, что делеция кодирующего данный белок гена *Tas1r3* ведёт к увеличению массы жира при содержании мышей на обычной сбалансированной лабораторной диете [6], а его

экспрессия подавляет рост и дифференцировку адипоцитов *in vitro* [7]. Выявленный *in vivo* комплекс нарушений, связанных с делецией *Tas1r3*: уменьшение толерантности к глюкозе, повышенная резистентность к инсулину, дислипидемия в сочетании с увеличенной массой жировой ткани, — соответствует симптомам метаболического синдрома. Известно, что развитие метаболического синдрома приводит к патоморфологическим изменениям в поджелудочной железе. У человека при ожирении увеличивается относительный объём β -клеток, но по мере развития гипергликемии и диабета типа 2 этот объём снижается [8]. У мышей и крыс при тех же нарушениях наблюдается гипертрофия островков Лангерганса, увеличение массы β -клеток при повышенном уровне их апоптоза [9, 10]. Особый интерес представляют данные о связи системы вкусовых рецепторов T1R с внутриклеточным мультимолекулярным сигнальным комплексом мишени рапамицина у млекопитающих (mTORC1), отвечающим за выживание/апоптоз клеток [11]. Выключение рецептора аминокислот T1R1/T1R3 *in vitro* с помощью малой интерферирующей РНК (siRNA) подавляло собственную активность mTOR и его способность реагировать на присутствие аминокислот в среде. При этом на 50% снижалось содержание инсулина в клетках MIN6 и усиливалась аутофагия. Специфический блокатор рецептора сладкого T1R2/T1R3 лактизол

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской Академии наук, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный университет

* E-mail: murovetsvo@infran.ru; mourovets@mail.ru

также угнетал активацию mTOR аминокислотами в клетках HeLa. У животных с нокаутом гена *Tas1r3* была снижена степень фосфорилирования mTOR в скелетной и сердечной мышце [11]. Тем не менее существующих данных недостаточно для определённых выводов о влиянии белков T1R на структуру островков Лангерганса поджелудочной железы.

В связи с этим задачей настоящей работы было исследование влияния делеции гена *Tas1r3*, кодирующего белок T1R3, на морфологические особенности островковой ткани поджелудочной железы мышей и оценка апоптотических изменений в островковых клетках на основе иммуногистохимического выявления каспазы-3.

Протокол экспериментов был одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова (ИФ РАН). Использовали 7–9-месячных мышей-самцов линии C57BL/6J(B6), приобретённых в Джексонской лаборатории (“Jackson Laboratory”, США), и линии C57BL/6J-*Tas1r3*^{tm1Rfm} (B6-*Tas1r3*KO) с делецией гена *Tas1r3*, племенная группа которой была безвозмездно предоставлена Dr. R.F. Margolskee, Monell Chemical Senses Center, США. Мыши B6-*Tas1r3*KO были получены с помощью рекомбинационной технологии cre-lox, у них последовательность гена *Tas1r3* была заменена на ген устойчивости к неомицину [1]. Мышей содержали на нормокалорийной лабораторной диете ПК-120 (“МЭСТ”, Россия). Образцы поджелудочной железы, изъятые после эвтаназии животного (седация CO₂), фиксировали 10%-м формалином и после дегидратации заключали в парафиновые блоки. Изготовленные срезы толщиной 7 мкм стандартно окрашивали гематоксилином и эозином. Иммунное мечение каспазы-3 пероксидазным методом с использованием поликлональных антител ab13847 (1:300, “Abcam”, Великобритания), биотинилированных

вторичных антител BA-1100 (1:200, “Santa Cruz Biotechnology”, США), авидин-пероксидазного комплекса (VECTASTAIN Elite ABC Reagent, R.T.U. PK-7100; “Vector Laboratories”, Великобритания) и 3,3'-диаминобензидина (ДАБ, SK-4100, “Vector Laboratories”) проводили по инструкции производителя, после чего срезы контрастировали гематоксилином. У каждого животного исследовали не менее 30 островков. Площадь островка рассчитывали с помощью программного пакета ImageJ. Плотность островков в ткани поджелудочной железы определяли как отношение общей площади островков на срезе к площади всего среза за вычетом площади островков.

Для построения графиков использовали программу Excel, при статистической обработке полученных результатов — критерий *t* Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Мы зарегистрировали выраженное влияние делеции гена на развитие островковой ткани (рис. 1). По сравнению с контролем у мышей с нокаутом *Tas1r3* плотность островков на единицу площади ткани поджелудочной железы была ниже примерно на 50% (рис. 1а). Настолько же уменьшилась относительная площадь островковой ткани (рис. 1б). Средняя площадь островка у мышей B6-*Tas1r3*KO была также меньше, чем у контрольных особей B6 (рис. 1в). При иммуногистохимическом исследовании мы выявили выраженное влияние делеции гена на апоптоз островковых клеток (рис. 2, тёмные клетки преимущественно на периферии островка) — степень подверженности у B6-*Tas1r3*KO была ниже.

Несмотря на выявленную нами ранее у мышей линии B6-*Tas1r3*KO увеличенную массу висцерального жира [6] в настоящем исследовании мы не наблюдали характерного

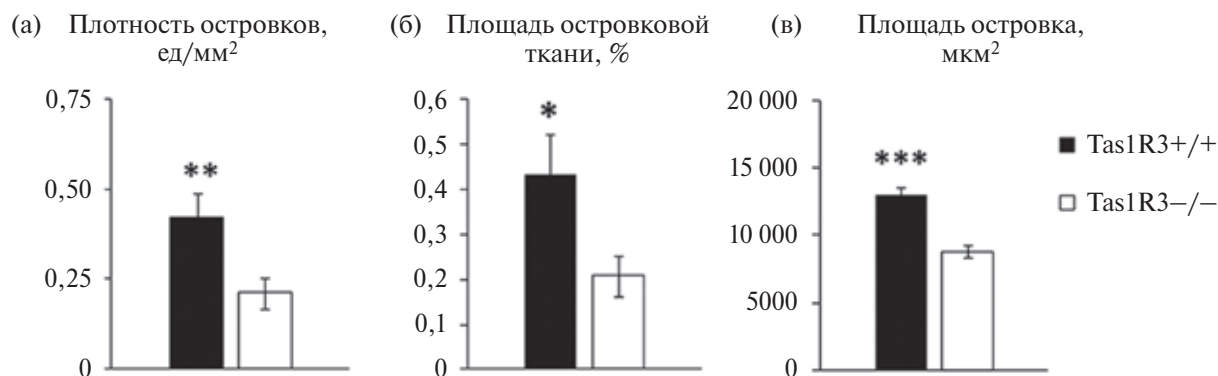


Рис. 1. Влияние делеции гена *Tas1r3* на размеры и плотность островков Лангерганса поджелудочной железы мышей линий C57BL/6J (*Tas1R3*+/+) и C57BL/6J-*Tas1r3*^{tm1Rfm} (*Tas1R3*-/-). (а) — плотность расположения островков, (б) — площадь островковой ткани, (в) — средняя площадь островка. $M \pm m$, $n = 10-12$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

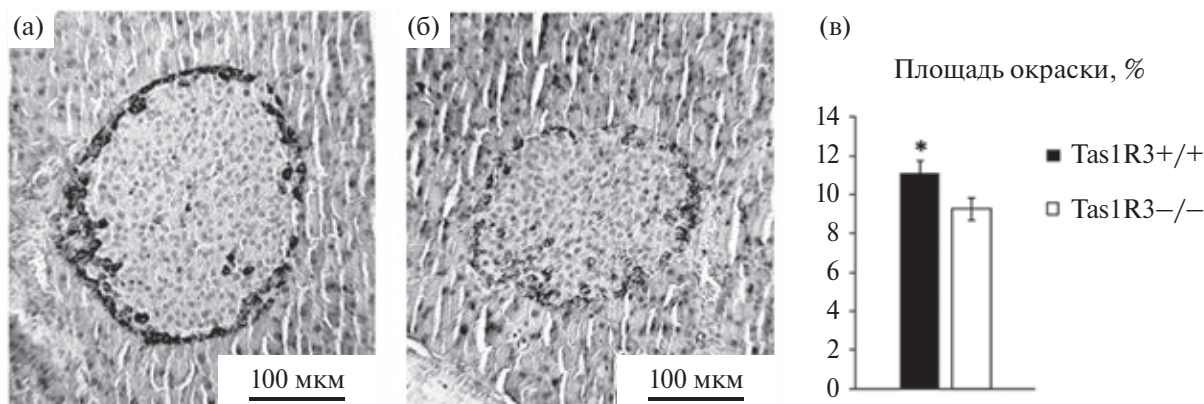


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление каспазы-3 в клетках островков Лангерганса в поджелудочной железе мышей линий B6 (Tas1R3+/+, чёрные столбики) и B6-Tas1R3KO (Tas1R3-/-, белые столбики). (а) — мышь линии B6 (№ 431), окраска каспазы 3, ДАБ, световая микроскопия, увеличение $\times 10$. (б) — мышь линии B6-Tas1R3KO (№ 515), окраска каспазы 3, ДАБ, световая микроскопия, увеличение $\times 10$. (в) — площадь окрашенной зоны в пределах островка у мышей сравниваемых линий, * $p < 0,05$.

для алиментарного ожирения увеличения размера островка, которое обычно сопровождается усилением апоптоза [9, 10]. Как упоминалось выше, T1R3 являются важным сенсором, обеспечивающим реакции mTORC1 клетки на нутриенты [11]. Известно, что активация mTORC1 у мышей способствует пролиферации β -клеток и в то же время усиливает их апоптоз, стимулирует их гипертрофию, увеличение площади островковой ткани и среднего размера островка, улучшает толерантность к глюкозе [12, 13]. Активированный фермент каспаза-3 появляется в клетке при развитии апоптоза. Поскольку апоптоз клеток является обратной стороной усиленной пролиферации [13], сниженный уровень экспрессии активированной каспазы в островковых клетках мышей B6-Tas1R3KO может свидетельствовать о снижении пролиферативной активности ткани. Таким образом, недостаток активации mTORC1 у мышей B6-Tas1R3KO может быть объяснением наблюдаемых эффектов.

Выявленное нами уменьшение плотности островков и отсутствие их гипертрофии у мышей B6-Tas1R3KO отличается от описанных для грызунов последствий метаболического синдрома [10] и более соответствует патоморфологическим признакам, характерным для человека [8]. Возможным объяснением этому является изначально отличные условия питания тестируемых животных, которых в нашем случае содержали на нормокалорийной диете в обычных условиях, не провоцирующих патологических сдвигов метаболизма.

Нарушение продукции инкретинов у B6-Tas1R3KO может быть ещё одной причиной наблюдаемых эффектов. Инкретиновые гормоны, секретируемые эндокринными клетками

кишечника в ответ на воздействие сладких веществ, — глюкозозависимый инсулиотропный полипептид и глюкагоноподобный пептид-1 (GIP и GLP-1), секреция которых в значительной мере контролируется T1R3, обладают инсулиотропным действием [2, 14] и способствуют пролиферации β -клеток. Мыши, у которых в β -клетках был экспрессирован мутантный рецептор GIP, характеризовались уменьшением числа островков и объёма β -клеток [15].

Таким образом, отсутствие функции ключевого гена *Tas1r3* димерного мембранного рецептора нутриентов приводит к дистрофии островковой ткани, соответствующей признакам метаболического синдрома у человека.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников ИФ РАН к.б.н. К.А. Баранову и М.Н. Судалину за консультации и техническую помощь.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15–04–08671 и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Damak S., Rong M., Yasumatsu K., Kokrashvili Z., Varadarajan V., Zou S., Jiang P., Ninomiya Y., Margolske R.F. // Science. 2003. V. 301. № 5634. P. 850–853.
2. Laffitte A., Neiers F., Briand L. // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2014. V. 17. № 4. P. 379–385.
3. Муровец В.О., Бачманов А.А., Травников С.В., Чурикова А.А., Золотарев В.А. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2014. Т. 50. № 4. С. 296–304.

4. Murovets V.O., Bachmanov A.A., Zolotarev V.A. // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 6. e0130997.
5. Kojima I., Medina J., Nakagawa Y. // Diabetes Obes. Metab. 2017. V. 19. Suppl. 1. P. 54–62.
6. Муровец В.О., Созонтов Е.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р. П., Золотарев В.А. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. № 6. С. 668–679.
7. Masubuchi Y., Nakagawa Y., Medina J., Nagasawa M., Kojima I., Rasenick M.M., Inagaki T., Shibata H. // PLoS ONE. 2017. V. 12. № 5. e0176841.
8. Linnemann A.K., Baan M., Davis D.B. // Adv. Nutr. 2014. V. 5. № 3. P. 278–288.
9. Butler A.E., Janson J., Soeller W.C., Butler P.C. // Diabetes 2003. V. 52. № 9. P. 2304–2314.
10. Katsuda Y., Ohta T., Miyajima K., Kemmochi Y., Sasase T., To B., Shinohara M., Yamada T. // Exp. Anim. 2014. V. 63. № 2. P. 121–132.
11. Wauson E.M., Zaganjor E., Lee A-Y., Guerra M.L., Ghosh A.B., Bookout A.L., Chambers C.P., Jivan A., McGlynn K., Hutchison M.R., Deberardinis R.J., Cobb M.H. // Mol. Cell. 2012. V. 47. № 6. P. 851–862.
12. Ding L., Yin Y., Han L., Li Y., Zhao J., Zhang W. // J. Endocrinol. 2017. V. 232. № 1. P. 59–70.
13. Balcazar N., Sathyamurthy A., Elghazi L., Gould A., Weiss A., Shiojima I., Walsh K., Bernal-Mizrachi E. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 12. P. 7832–7842.
14. Yabe D., Seino Y. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2011. V. 107. № 2. P. 248–256.
15. Herbach N., Bergmayr M., Goke B., Wolf E., Wanke R. // PLoS ONE. 2011. V. 6. № 7. e22814.

EFFECT OF TASTE RECEPTOR PROTEIN T1R3 ON THE DEVELOPMENT OF ISLET TISSUE OF THE MURINE PANCREAS

V. O. Murovets, E. A. Sozontov, T. G. Zachepilo

Presented by Academician of the RAS A.D. Nozdachev June 25, 2018

Received July 18, 2018

Protein T1R3, the main subunit of sweet, as well as amino acid, taste receptor, is expressed in the epithelium of the tongue and gastro intestinal tract, in β -cells of the pancreas, hypothalamus, and numerous other organs. Recently, convincing witnesses of T1R3 involvement in control of carbohydrate and lipid metabolism, and control of production of incretines and insulin, have been determined. In the study on Tas1r3-gene knockout mouse strain and parent strain C57Bl/6J as control, priority data concerning the effect of T1R3 on the morphological characteristics of Langerhans islets in the pancreas, are obtained. In Tas1r3 knockout animals, it is found that the size of the islets and their density in pancreatic tissue are reduced, as compared to the parent strain. Additionally, a decrease of expression of active caspase-3 in islets of gene-knockouts is demonstrated. The obtained data show that the lack of a functional, gene encoding sweet-taste receptor protein causes a dystrophy of the islet tissue and associates to the development of pathological changes in the pancreas specific to type-2 diabetes and obesity in humans.

Keywords: sweet taste receptor, T1R3, Tas1r3 gene knockout, pancreas, islet of Langerhans, caspase-3.