

На правах рукописи

МИЧУРИНА СВЕТЛАНА СЕРГЕЕВНА

РЕГУЛЯЦИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ И УТИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 В АДИПОЦИТАХ

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», лаборатория ангиогенеза.

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Стафеев Юрий Сергеевич

Оппоненты: **Попов Даниил Викторович**,
доктор биологических наук, ФГБУН
Государственный научный центр Российской
Федерации Институт медико-биологических
проблем РАН, ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией физиологии
мышечной деятельности.

Иванов Александр Владимирович,
доктор биологических наук, ФГБУН
Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН, заведующий
лабораторией биохимии вирусных инфекций,
заместитель директора по научной работе.

Ведущая организация: ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» МЗ РФ (Институт экспериментальной медицины).

Защита состоится «16» мая 2024 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

По оценкам Всемирной федерации ожирения, в 2020 году 38% людей в мире в возрасте от 5 лет имели избыточную массу тела (индекс массы тела >25 кг/м²) и 14% страдали от ожирения (индекс массы тела >30 кг/м²). Ожидается, что распространенность ожирения вырастет до 24% населения к 2035 году и затронет почти 2 миллиарда человек по всему миру и более 40 млн человек в России (World Obesity Atlas, 2023). Важную роль в развитии ожирения и ассоциированных с ним метаболических патологий играет иммунная система. Хронический воспалительный процесс наблюдается при ожирении и сопутствующих заболеваниях: метаболическом синдроме, сахарном диабете 2 типа (СД2Т), сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях. Хроническое воспаление при ожирении развивается в жировой ткани (ЖТ) и является потенциальным триггером нарушения инсулиновой чувствительности и изменения метаболизма углеводов и липидов.

В физиологическом состоянии иммунофенотип ЖТ характеризуется наличием противовоспалительных иммунных клеток (M2–макрофагов, эозинофилов, Т-хелперов 2 типа) и секрецией цитокинов, подавляющих воспаление. Антивоспалительное микроокружение поддерживает инсулиновую чувствительность адипоцитов и способность к дифференцировке термогенных бежевых адипоцитов, способных расходовать избыточную энергию в виде тепла и снижать накопление триацилглицеридов (ТАГ).

При ожирении физиология ЖТ существенно изменяется. Чрезмерное потребление высокоэнергетических субстратов (простых углеводов, насыщенных жиров) приводит к метаболической перегрузке ЖТ, происходит ее увеличение для накопления большего количества ТАГ и предотвращения эктопического отложения липидов. Гипертрофия адипоцитов приводит к развитию гипоксии в ЖТ, возникновению окислительного стресса, стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и гибели клеток. Все эти процессы способствуют активации

воспалительных сигнальных каскадов в адипоцитах и секреции провоспалительных цитокинов, привлекающих провоспалительные иммунные клетки. Таким образом, в ЖТ возникает самоподдерживающееся хроническое воспаление, которое может быть индуктором инсулиновой резистентности (ИР).

В связи с важной ролью воспаления в развитии ИР в ЖТ, противовоспалительная терапия может улучшить чувствительность к инсулину и предотвратить развитие осложнений у пациентов с ожирением или СД2Т. Несмотря на это, блокаторы действия провоспалительных цитокинов (интерлейкина 1β (ИЛ- 1β) и фактора некроза опухоли α (ФНО α)) не используются в клинической практике для контроля гликемии, так как они не показали стойкой эффективности. Мы предложили альтернативный подход для воздействия на иммунный статус ЖТ, заключающийся в использовании противовоспалительного инсулинсенситизирующего цитокина интерлейкина-4 (ИЛ-4).

ИЛ-4 положительно влияет на инсулиновую чувствительность и углеводный обмен на системном уровне. Он способствует поддержанию толерантности к глюкозе и снижению веса животных в моделях ожирения. Позитивные эффекты ИЛ-4 связаны не только с активацией противовоспалительных иммунных клеток в ЖТ, но и с действием на метаболизм адипоцитов и их предшественников. Известно, что ИЛ-4 ингибирует адипогенез и активирует липолиз в адипоцитах, но точные механизмы регуляции и физиологическая значимость этих процессов остаются неясными.

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано, что ИЛ-4 активирует в адипоцитах поглощение глюкозы и экспрессию метаболических белков, включающих ферменты окислительного метаболизма митохондрий. В настоящей работе мы исследовали механизмы метаболического действия ИЛ-4 в зрелых адипоцитах.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является изучение влияния противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на углеводный и липидный метаболизм адипоцитов.

Задачи:

1. Исследовать роль ИЛ-4 в регуляции активности гликолиза и митохондриального окисления глюкозы в адипоцитах.
2. Оценить вклад STAT6 и IRS1 в регуляцию поглощения глюкозы под действием ИЛ-4.
3. Изучить влияние ИЛ-4 на активность липогенеза, липолиза и накопление липидных капель в адипоцитах.
4. Исследовать действие ИЛ-4 на термогенез в адипоцитах.
5. Оценить роль адипоцитарной триглицеридлипазы в регуляции термогенеза и митохондриальной активности под действием ИЛ-4.

Научная новизна работы

Проведено комплексное исследование действия противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на метаболизм глюкозы и ТАГ жировых клеток. Показано, что ИЛ-4 усиливает поглощение глюкозы для последующего метаболизирования в ходе гликолиза и окислительного фосфорилирования, а не для активации липогенеза и запасаения ТАГ. Исследованы некоторые механизмы стимуляции поглощения глюкозы интерлейкином-4 с использованием shРНК и ингибиторного анализа. Была подобрана последовательность shРНК, позволяющая снизить экспрессию STAT6 на 90%. Показано, что подавление экспрессии STAT6 не снижает активацию поглощения глюкозы в адипоцитах под действием ИЛ-4. Таким образом, подтверждено, что канонический ИЛ-4-зависимый транскрипционный фактор STAT6 не участвует в регуляции поглощения глюкозы в адипоцитах.

При анализе влияния ИЛ-4 на липидный метаболизм адипоцитов показано, что ИЛ-4 стимулирует липолиз и фрагментацию липидных

капель. Обнаружено, что ИЛ-4 активирует липолиз по механизму, зависящему от активности адипоцитарной триглицеридлипазы (ATGL). Также отмечено, что фрагментация может происходить без участия ATGL.

Обнаружено, что зрелые адипоциты, стимулированные ИЛ-4, приобретают характеристики, свойственные термогенным бежевым адипоцитам: повышение температуры клеток, фрагментация липидных капель, активация липолиза и окисления глюкозы. В работе показано, что активация термогенеза и окисления глюкозы под действием ИЛ-4 в зрелых адипоцитах взаимосвязана с их липолитической активностью и происходит ATGL-зависимо. Полученные результаты позволили сформулировать гипотезу о способности ИЛ-4 изменять фенотип зрелых адипоцитов, способствовать образованию термогенных бежевых адипоцитов. При этом, активация термогенеза не сопровождается увеличением экспрессии термогенного белка внутренней мембраны митохондрий UCP1, но зависит от активности ATGL, одного из скорость-лимитирующих ферментов ТАГ цикла. Результаты работы позволяют предполагать, что ИЛ-4 активирует в адипоцитах неканонический механизм термогенеза, осуществляющийся за счет ускорения футильного ТАГ цикла.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Исследование содержит подробный анализ регуляции метаболизма глюкозы и ТАГ в жировых клетках под действием ИЛ-4. Полученные результаты подтверждают взаимную регуляцию иммунитета и метаболизма. Подтверждено, что ИЛ-4 активирует липолиз, и предложен новый механизм регуляции липолиза через фермент ATGL. Показано, что ИЛ-4 оказывает влияние не только на отдельные метаболические пути, но и способен осуществлять метаболическое репрограммирование адипоцитов. ИЛ-4 одновременно активирует окисление глюкозы и липолиз в жировых клетках, что сопровождается выработкой тепла. Результаты позволяют предположить, что ИЛ-4 активирует футильный ТАГ-цикл, который повышает потребность в

АТФ и активирует поглощение и окисление глюкозы. Наблюдаемая активация катаболизма сопровождается высвобождением тепла – термогенезом. Работа обосновывает необходимость исследования роли неканонических путей термогенеза в утилизации избыточной глюкозы в адипоцитах. Результаты исследования могут помочь в разработке методов получения жировых клеток, специализирующихся на расходовании глюкозы и рассеивании заключенной в ней энергии в виде тепла, вместо синтеза и запасаения ТАГ. ИЛ-4 является потенциальным индуктором образования бежевых адипоцитов для клеточной терапии ожирения и СД2Т.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ИЛ-4 активирует поглощение глюкозы в адипоцитах для ее утилизации в ходе гликолиза и окисления в митохондриях.
2. Регуляция поглощения глюкозы под действием ИЛ-4 происходит без прямого участия STAT6.
3. ИЛ-4 не вызывает дополнительную стимуляцию канонической ветви инсулинового сигнального каскада, регулирующей активность поглощения глюкозы через GLUT4.
4. ИЛ-4 активирует фрагментацию липидных капель в жировых клетках, что способствует активации липолиза.
5. ИЛ-4 активирует термогенез и повышает энергетические потребности адипоцитов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Результаты данной работы были представлены на международных и российских научных конференциях: Фундаментальная и клиническая диабетология в 21 веке: от теории к практике (Россия, Москва, 2022), European Society of Gene and Cell Therapy Congress 2021 (Великобритания, онлайн, 2021), 56th Annual Meeting of European Association for the Study of Diabetes (Австрия, онлайн, 2020), 7th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Австрия, Вена, 2019). По теме диссертации было опубликовано 8 статей в

рецензируемых зарубежных и российских журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science.

Публикации автора по результатам исследования

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы реферативных данных Web of Science и Scopus и 5 публикаций в сборниках трудов российских и международных научных конференций.

Личный вклад автора

Все основные результаты были получены автором самостоятельно. Автор лично анализировала результаты и готовила статьи и тезисы для публикации. Анализ гликолитической и митохондриальной активности производился на базе НИИ ревматологии им. В.А. Насоновой в лаборатории иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний под руководством Четиной Е.В. Изотопный анализ проводили на базе службы изотопного анализа и радиационной безопасности ФГБУ НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова МЗ РФ (руководитель - Чусовитина О.К.), а также кафедры биохимии биологического факультета МГУ.

Структура и объем диссертационного исследования

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 149 страницах, иллюстрирована 19 рисунками и 1 таблицей. Список цитируемой литературы включает 333 наименования.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №17-34-80026 (руководитель проекта Стафеев Ю.С.), №20-015-00100 (руководитель проекта Стафеев Ю.С.), а также совместного российско-тайваньского гранта РНФ №20-45-08003 (руководитель проекта Меньшиков М.Ю.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и дифференцировка адипоцитов 3T3-L1

Исследование проводили на фибробластах линии 3T3-L1, способных к адипогенной дифференцировке. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с добавлением 10% сыворотки новорожденных телят. Адипогенную дифференцировку 3T3-L1 осуществляли под воздействием инсулина (0,1 мкМ), изобутилметилксантина (0,5 мМ), дексаметазона (1 мкМ) и розиглитазона (2 мкМ). Через 4 дня после дифференцировки клетки стимулировали ИЛ-4 (50 нг/мл, 24 ч; Solarbio, Китай) и проводили дальнейшие эксперименты.

Генетическая модификация адипоцитов для изучения механизмов действия ИЛ-4

Для исследования механизмов действия ИЛ-4 на поглощение глюкозы проводили генетическую модификацию клеток с помощью лентивирусных конструкций. Клетки трансдуцировали вектором, кодирующим shРНК для подавления экспрессии транскрипционного фактора STAT6.

Оценка метаболизма глюкозы в адипоцитах, стимулированных ИЛ-4

В ходе исследования в адипоцитах определяли скорость поглощения ^3H -2-дезоксиглюкозы, а также включение ^{14}C -атомов из ^{14}C -глюкозы в водорастворимые и гидрофобные метаболиты. Детекцию меченых соединений осуществляли методом жидкостной сцинтилляции на приборах RackBeta 1214 (LKB, Швеция) и TriCarb 4910TR (Perkin Elmer, США). Скорость окисления глюкозы в процессах гликолиза и митохондриального окисления оценивали на анализаторе метаболизма Seahorse XFe96 (Agilent, США) по протоколу XF Cell Mito Stress Test.

Оценка липидного метаболизма адипоцитов, стимулированных ИЛ-4

Для анализа активности липогенеза адипоциты культивировали в среде с ^{14}C -глюкозой, затем клетки лизировали, экстрагировали липиды смесью хлороформа и метанола (2:1), проводили щелочной гидролиз триглицеридов и оценивали включение ^{14}C -атомов в жирные кислоты и глицерол из триглицеридов. Для анализа липолиза адипоциты культивировали в среде с ^{14}C -глюкозой для включения ^{14}C в состав триглицеридов, затем клетки культивировали в среде с ^{12}C -глюкозой и оценивали скорость убывания ^{14}C в триглицеридах. Для определения механизмов действия ИЛ-4 на липидный метаболизм использовали ингибитор адипоцитарной триглицеридлипазы атглицистатин (Selleckchem, США).

Определение влияния ИЛ-4 на активность термогенеза и динамику липидных капель

Активность термогенеза и морфологию липидных капель в адипоцитах оценивали с помощью термочувствительного флуоресцентного зонда ERthermAC (Merck, Германия) и липофильного зонда BODIPY493/503, соответственно. Проводили прижизненную визуализацию клеток на конфокальном микроскопе Leica Stellaris 5 (Leica, Германия) при 5% CO_2 и 25°C , интенсивность флуоресценции и морфологию оценивали в программе ImageJ.

Анализ регуляции экспрессии белков в адипоцитах под действием ИЛ-4

Определение влияния ИЛ-4 на экспрессию белков осуществляли методом иммуноблоттинга клеточных лизатов адипоцитов.

Статистическая обработка результатов. Значимость различий при попарном сравнении выборок оценивали с помощью двустороннего критерия ANOVA с апостериорным тестом Данна с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ИЛ-4 активирует гликолиз и митохондриальное окисление глюкозы в адипоцитах

В предыдущих работах в нашей лаборатории было показано, что ИЛ-4 активирует базальное и инсулин-зависимое поглощение глюкозы в жировых клетках, что было подтверждено в данной работе (Рис. 1 А). Глюкоза в адипоцитах может поступать в различные метаболические пути. Она может подвергаться окислению в ходе гликолиза и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) для синтеза АТФ. С другой стороны, глюкоза может быть источником углеродных скелетов для синтеза ТАГ. В представленной работе мы исследовали включение глюкозы в важнейшие метаболические пути жировых клеток: гликолиз, митохондриальное окисление и липогенез.

Влияние ИЛ-4 на активность гликолиза и митохондриального окисления в адипоцитах 3T3-L1 изучали на анализаторе метаболизма Seahorse XFe96 (Рис. 1 Б, В). Показателем активности гликолиза служит скорость снижения рН среды культивирования при секреции лактата. Митохондриальную активность определяли по скорости поглощения O_2 клетками в базальном состоянии, затем добавляли разобщитель внутренней мембраны митохондрий (FCCP) для определения максимальной активности электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). В конце эксперимента добавляли ингибиторы I и III комплексов ЭТЦ для оценки вклада немитохондриального поглощения O_2 .

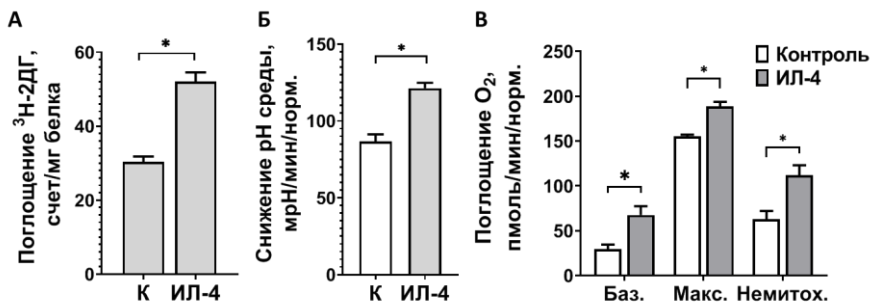


Рисунок 1. Поглощение и окисление глюкозы в адипоцитах, стимулированных ИЛ-4. А – оценка поглощения ^3H -2-дезоксиглюкозы (^3H -2ДГ) методом жидкостной сцинтилляции; Б – определение активности гликолиза по скорости снижения pH среды; В – анализ активности окислительного метаболизма митохондрий по поглощению O_2 ; * – $p < 0,05$, ANOVA.

Было показано, что ИЛ-4 увеличивает активность гликолиза (Рис. 1 Б), так как он ускоряет снижение pH клеточной среды. Также, ИЛ-4 повышает базальное, максимальное разобщенное и немитохондриальное поглощение кислорода (Рис. 1 В), что может говорить об активации митохондриального окисления глюкозы и об увеличении количества или активности комплексов ЭТЦ.

Таким образом, ИЛ-4 активирует окисление глюкозы, как в гликолизе, так и в ЦТК. Повышение их активности в адипоцитах может быть связано с несколькими процессами. Во-первых, известно, что гликолиз и ЦТК необходимы для поддержания липогенеза в адипоцитах, так как этот энергозатратный процесс требует большого количества АТФ. Кроме того, ЦТК поставляет углеродные скелеты для синтеза жирных кислот, а гликолиз – для синтеза глицерол-3-фосфата. С другой стороны, активация катаболизма глюкозы может быть ассоциирована с процессами термогенеза и бежевой дифференцировки адипоцитов, при которых происходит диссипация энергии окисления с образованием тепла. Термогенез важен для поддержания температуры тела и системного энергетического гомеостаза. Таким образом, мы

убедительно показали, что ИЛ-4 регулирует метаболизм глюкозы в жировых клетках. Далее мы предложили и исследовали потенциальный сигнальный механизм действия ИЛ-4 на поглощение и окисление глюкозы в адипоцитах.

2. ИЛ-4 активирует поглощение глюкозы без участия транскрипционного фактора STAT6

Канонический механизм действия ИЛ-4 в различных типах клеток заключается в активации транскрипционного фактора STAT6. В предыдущих работах мы показали, что ИЛ-4 способен активировать фосфорилирование и транслокацию STAT6 в ядро адипоцитов. В настоящей работе мы исследовали, осуществляется ли регуляция метаболизма глюкозы в адипоцитах по STAT6-зависимому механизму (Рис. 2). С использованием shРНК мы получили адипоциты с подавленной экспрессией STAT6. По результатам иммуноблоттинга экспрессия снижалась на 90% (Рис. 2 А).

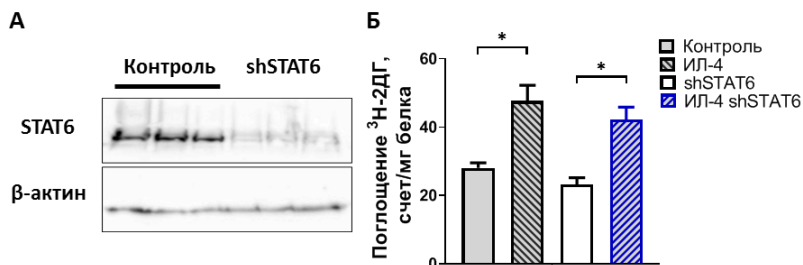


Рисунок 2. Влияние ИЛ-4 на поглощение глюкозы в адипоцитах с подавленной экспрессией STAT6. А – оценка уровня экспрессии STAT6 в адипоцитах, экспрессирующих shРНК-STAT6; Б – оценка поглощения ³H-2-дезоксиглюкозы (³H-2ДГ); * – p < 0,05, ns – p > 0,05, ANOVA.

По результатам измерения поглощения неметаболизируемого аналога глюкозы мы обнаружили, что ИЛ-4 активирует его поглощение даже при сниженной экспрессии STAT6 (Рис. 2 Б). Анализ активности гликолиза и митохондриального поглощения кислорода в адипоцитах с подавленной экспрессией STAT6 представлен в полном тексте

диссертации. Согласно полученным результатам, трансдукция адипоцитов с помощью лентивирусных конструкций, кодирующих shРНК, оказывает неспецифическое влияние на метаболизм адипоцитов, поэтому для исследования STAT6-зависимых механизмов регуляции окисления глюкозы необходимо использование альтернативного метода ингибирования STAT6.

В дополнение, было проведено исследование роли ИЛ-4 в стимуляции инсулинового сигнального каскада через фосфорилирование белка IRS1 (данные представлены в тексте диссертации). Было показано, что ИЛ-4 не активирует фосфорилирование IRS1 и не влияет на внутриклеточную локализацию инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4.

3. ИЛ-4 вызывает фрагментацию липидных капель и не снижает общее количество накопленных липидов

Активация поглощения глюкозы адипоцитами под действием ИЛ-4 может быть связана не только с катаболическими процессами, но также и с синтезом запасных липидов ТАГ. Для оценки накопления липидов мы визуализировали липидные капли в культуре зрелых адипоцитов с помощью липофильного флуоресцентного зонда BODIPY493/503, определяли размер липидных капель и количество связавшегося красителя (Рис. 3 А - В). Кроме того, активность липогенеза определяли по включению ^{14}C атомов из ^{14}C -меченой глюкозы в состав ТАГ (Рис. 3 Г).

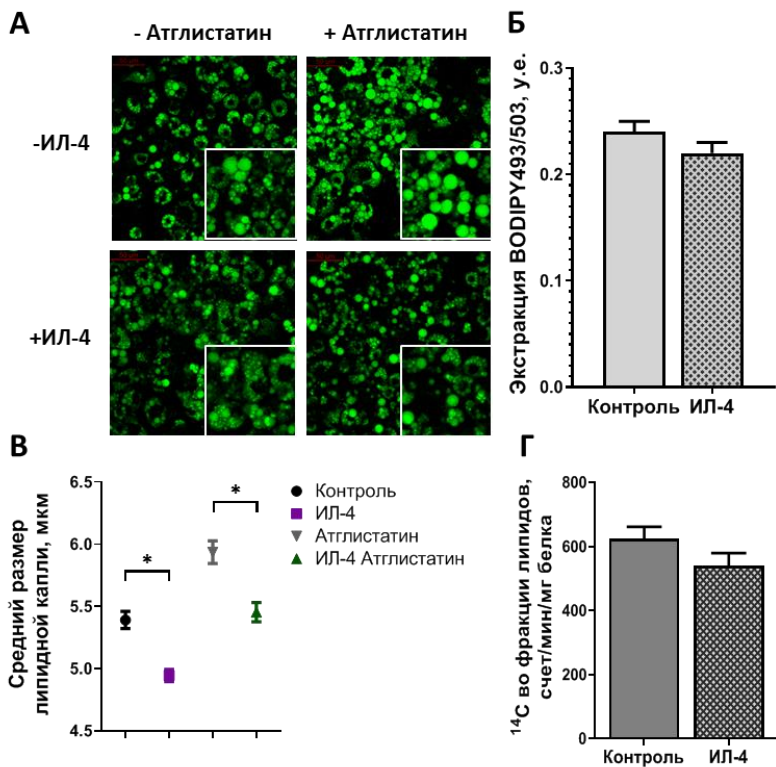


Рисунок 3. Влияние ИЛ-4 на морфологию липидных капель и липогенез в адипоцитах. А – репрезентативные микрофотографии адипоцитов, окрашенных BODIPY493/503; Б – количественная оценка связывания липофильного красителя в культуре адипоцитов; В – расчет среднего размера липидной капли; Г – оценка включения ¹⁴С-атомов из ¹⁴С-меченой глюкозы в липиды; атггистатин – ингибитор адипоцитарной триглицерид липазы; *– $p < 0,05$, ANOVA.

ИЛ-4 не влиял на общее количество накопленных липидов в адипоцитах (Рис. 3 Б). Кроме того, скорость de novo синтеза ТАГ также не изменялась при стимуляции ИЛ-4 (Рис. 3 Г). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии действия ИЛ-4 на липогенез и включение глюкозы в синтез ТАГ. При анализе микрофотографий

визуализации липидных капель мы обратили внимание на то, что ИЛ-4 изменяет морфологию липидных капель (Рис. 3 А), поэтому мы провели подсчет среднего размера липидных капель в адипоцитах при стимуляции ИЛ-4 (Рис. 3 В). Мы показали, что ИЛ-4 стимулирует фрагментацию липидных капель в жировых клетках. Зачастую, описанный феномен наблюдается в адипоцитах при активации липолиза, так как фрагментация увеличивает площадь поверхности липидных капель, доступную для липаз. Для проверки гипотезы о том, что фрагментация липидных капель происходит за счет стимуляции липолиза, мы оценили действие ИЛ-4 при подавлении адипоцитарной триглицерид липазы (ATGL) с помощью ингибитора атглицстатина (Рис. 3 А, В).

Ингибирование ATGL в жировых клетках увеличивало средний размер липидных капель. На фоне увеличения, стимуляция ИЛ-4 приводила к уменьшению капель до уровня контроля (Рис. 3 А, В). Полученные результаты показывают, что ИЛ-4 и атглицстатин действуют аддитивно, и ИЛ-4 вызывает фрагментацию липидных капель по ATGL-независимому механизму. Возможно, регуляция осуществляется через другие липазы (например, гормон чувствительную липазу) или за счет регуляторных белков, ассоциированных с липидной каплей, определяющих ее динамику и доступность для ферментов.

4. ИЛ-4 активирует липолиз в адипоцитах

Фрагментация липидных капель является индикатором активации гидролиза ТАГ в адипоцитах, но для точного определения активности липолиза мы использовали радиоизотопный метод. Адипоциты культивировали в среде с ^{14}C -глюкозой для включения ^{14}C атомов в ТАГ, затем клетки отмывали, переводили в среду с ^{12}C -глюкозой и после этого стимулировали ИЛ-4. После воздействия анализировали секрецию ^{14}C -меченых метаболитов в среду культивирования клеток, а также количество ^{14}C в составе глицерина и ЖК из ТАГ (Рис. 4). Стимуляцию изопротеренолом (агонист β -адренорецепторов) использовали в качестве положительного контроля.

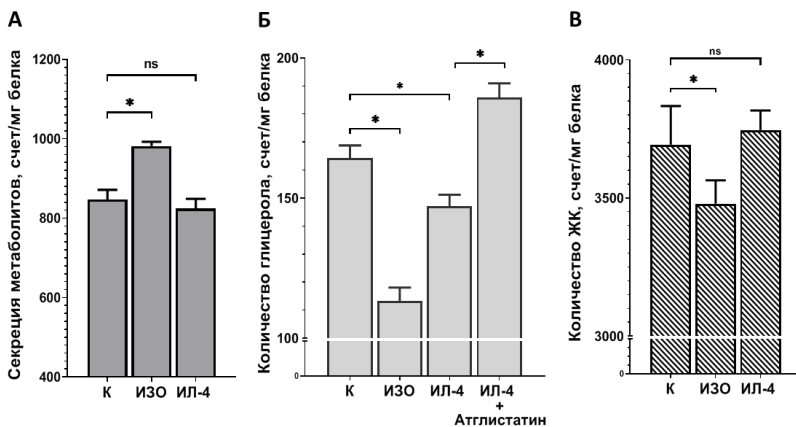


Рисунок 4. Оценка активности липолиза в адипоцитах, стимулированных ИЛ-4. А – секреция ^{14}C -меченых метаболитов из клеток; Б, В – количество ^{14}C во фракциях глицерола и жирных кислот (ЖК) из ТАГ, соответственно; ИЗО – изопротеренол; *– $p < 0,05$, ns – $p > 0,05$, ANOVA.

Известно, что активация $\beta 3$ -адренорецепторов в адипоцитах активирует липолиз. В клетках, стимулированных изопротеренолом, наблюдалась секреция ^{14}C -метаболитов и снижение количества метки в составе ЖК и глицерина в ТАГ (Рис. 4). Наблюдаемые эффекты связаны с гидролизом ^{14}C -меченых ТАГ и секрецией продуктов (глицерол и ЖК) в среду культивирования. Разработанный метод далее использовали для оценки влияния ИЛ-4 на липолиз.

Мы обнаружили, что ИЛ-4 снижает количество меченого глицерола из ТАГ (Рис. 4 Б) и не влияет на количество ЖК и секрецию метаболитов (Рис. 4 А, В). Вероятно, ИЛ-4 активирует липолиз, что приводит к снижению ^{14}C -глицерина в ТАГ, но при этом высвободившаяся ЖК подвергается повторной этерификации и включению в состав ТАГ. Свободный глицерол, образовавшийся в ходе липолиза, не может быть использован для повторной этерификации и включения в ТАГ, так как в адипоцитах отсутствует глицеролкиназа.

При ингибировании ATGL ИЛ-4 терял способность к активации липолиза (Рис. 4 Б), поэтому мы сделали вывод, что ИЛ-4 регулирует липолиз через активацию ATGL (Рис. 4 Б). Таким образом, ИЛ-4 стимулирует липолиз без секреции свободных ЖК. Мы предположили, что ЖК повторно преобразуются в ацил-КоА для включения в ТАГ, что сопряжено с увеличением энергетических затрат клетки и может приводить к термогенезу, что зачастую наблюдается в термогенных бежевых и бурых адипоцитах.

5. ИЛ-4 активирует термогенез по ATGL-зависимому механизму

Известно, что введение ИЛ-4 животным способствует образованию бежевых термогенных адипоцитов в составе белых жировых депо через регуляцию иммунных клеток. Активация термогенеза имеет важное значение не только для поддержания температуры тела, но и для утилизации избыточных энергетических молекул, предотвращения развития ожирения и СД2Т. Термогенез осуществляется в адипоцитах за счет функционирования футильных циклов, в ходе которых не образуются новые молекулы, но происходит расходование энергии. Канонический футильный процесс происходит при функционировании белка разобшителя внутренней мембраны митохондрий UCP1. UCP1 диссипирует H^+ градиент, что активирует ЭТЦ и ЦТК, но снижает эффективность синтеза АТФ. В адипоцитах известны еще несколько футильных процессов: ТАГ-цикл, креатиновый цикл и SERCA-зависимый механизм. ТАГ-цикл основан на гидролизе ТАГ с высвобождением свободной ЖК, к которой вновь присоединяется кофермент А (КоА) с затратой АТФ. Образовавшийся ацил-КоА вступает в реакцию этерификации с глицерол-3-фосфатом, моно- или диглицеридом. В итоге, вновь образуется ТАГ, но затрачивается АТФ. Для работы ТАГ цикла необходима активность ферментов липолиза, ацил-КоА синтетазы и ацилтрансфераз.

Мы показали, что ИЛ-4 одновременно увеличивает активность поглощения и окисления глюкозы и липолиз без секреции его продуктов, что характерно для термогенных адипоцитов и активации

ТАГ цикла. Активность термогенеза в адипоцитах, стимулированных ИЛ-4, оценивали с помощью термочувствительного зонда ERthermAC (Рис. 5), флуоресценция которого снижается при повышении температуры внутри клетки.

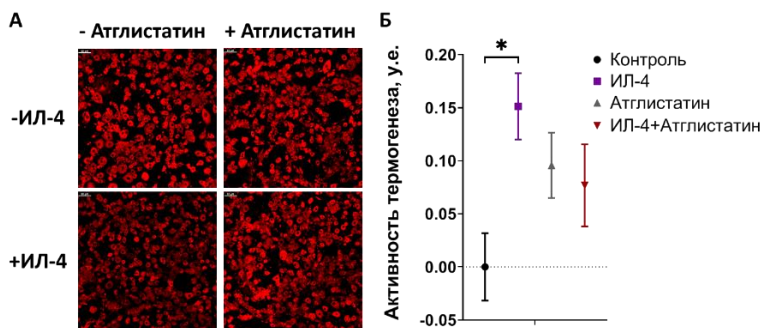


Рисунок 5. Оценка активности термогенеза в адипоцитах с помощью ERthermAC. А – репрезентативные микрофотографии; Б – расчет активности термогенеза; * $p < 0,05$, ANOVA.

Активность термогенеза рассчитывали по формуле $A = (F_c - F_s) / F_c$, где F_c – интенсивность флуоресценции в контрольных клетках, F_s – интенсивность флуоресценции в клетках после воздействия (Рис. 5 Б). Мы показали, что ИЛ-4 увеличивает активность термогенеза в зрелых адипоцитах. В клетках с ингибитором ATGL активация термогенеза под действием ИЛ-4 не наблюдалась. Таким образом, способность ИЛ-4 стимулировать выработку тепла зависит от активности ATGL. ATGL является скоростью-лимитирующим ферментом в гидролизе ТАГ, поэтому его ингибирование приводит к замедлению ТАГ цикла. Участие ATGL в ИЛ-4-стимулированном термогенезе свидетельствует в пользу гипотезы об активации ТАГ-цикла.

6. Активация окислительного энергетического метаболизма под действием ИЛ-4 зависит от активности ATGL

По результатам описанных выше экспериментов мы предположили, что ИЛ-4 ускоряет циклическое превращение ТАГ/ЖК в адипоцитах, что

увеличивает потребность в АТФ и активирует окисление глюкозы. Согласно этой гипотезе, активация гликолиза и митохондриального дыхания в присутствии ИЛ-4 должны зависеть от активности ферментов, катализирующих ТАГ цикл, например, липазы ATGL. Для проверки гипотезы мы исследовали взаимосвязь усиления гликолиза и митохондриального окисления под действием ИЛ-4 с активацией термогенеза по ATGL-зависимому механизму (Рис. 6).

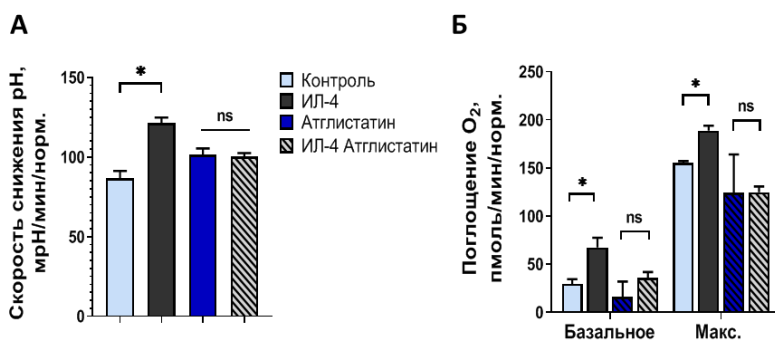


Рисунок 6. Влияние ИЛ-4 на окисление глюкозы в адипоцитах при ингибировании ATGL. А – определение активности гликолиза по скорости снижения рН среды; Б – анализ активности митохондриального дыхания; *– $p < 0,05$, ns– $p > 0,05$, ANOVA.

При ингибировании ATGL мы не наблюдали активацию гликолиза и поглощения кислорода в митохондриях под действием ИЛ-4 (Рис. 6). Таким образом, активация углеводного метаболизма под действием ИЛ-4 тесно взаимосвязана с липолизом, что также соответствует гипотезе об активации футильного ТАГ цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндогенные противовоспалительные цитокины наряду с провоспалительными медиаторами являются потенциальными мишенями для разработки подходов к коррекции метаболических осложнений ожирения. В ходе выполнения работы нам удалось подробно охарактеризовать регуляцию метаболизма адипоцитов под

действием ИЛ-4 и предложить новые механизмы положительного влияния противовоспалительных факторов на системный энергетический гомеостаз. Мы выяснили, что ИЛ-4 активирует поглощение глюкозы и окисление в ходе гликолиза и окислительного фосфорилирования для увеличения продукции АТФ. Мы предположили, что увеличение потребности клеток в АТФ может быть связано с активацией термогенного футильного ТАГ-цикла. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные об активации термогенеза в адипоцитах, так как выделение тепла сопровождает работу футильных циклов. Кроме того, активация термогенеза и окисления глюкозы происходит по АТGL-зависимому механизму. Липаза АТGL катализирует одну из скорость-лимитирующих реакций ТАГ цикла, что также подтверждает его роль в активации термогенеза под действием ИЛ-4. Таким образом, ИЛ-4 осуществляет метаболическое репрограммирование адипоцитов, при котором усиливается термогенез и утилизация глюкозы без синтеза ТАГ. Благодаря способности активировать расходование избыточных энергетических субстратов, ИЛ-4 является перспективной молекулой для коррекции ожирения и гипергликемии.

ВЫВОДЫ

1. ИЛ-4 активирует гликолиз и митохондриальное поглощение кислорода в адипоцитах.
2. Белки STAT6 и IRS1 не участвуют в активации поглощения глюкозы под действием ИЛ-4.
3. ИЛ-4 стимулирует липолиз и фрагментацию липидных капель в адипоцитах, не оказывая влияние на липогенез.
4. ИЛ-4 повышает активность термогенеза в адипоцитах.
5. Активация термогенеза и окисления глюкозы под действием ИЛ-4 зависит от активности АТGL.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Michurina S., Stafeev I., Boldyreva M., Truong V.A., Ratner E., Menshikov M., Hu Y.-C., Parfyonova Y. Transplantation of Adipose-Tissue-Engineered Constructs with CRISPR-Mediated UCP1 Activation // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 4. P. 3844.
2. Stafeev I., Michurina S., Agareva M., Zubkova E., Sklyanik I., Shestakova E., Gavrilova A., Sineokaya M., Ratner E., Menshikov M., Parfyonova Y., Shestakova M. Visceral mesenchymal stem cells from type 2 diabetes donors activate triglycerides synthesis in healthy adipocytes via metabolites exchange and cytokines secretion // *Int. J. Obes.* 2023. V. 47. № 8. P. 732–742.
3. Юдаева А. Д., Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Меньшиков М.Ю., Шестакова М.В., Парфенова Е.В. Взаимодействие воспаления и инсулиновой резистентности: молекулярные механизмы в инсулинопродуцирующих и инсулинозависимых тканях // *Сахарный диабет.* 2023. V. 26. №. 1. P. 75-81.
4. Стафеев Ю.С., Юдаева А. Д., Мичурина С.С., Меньшиков М.Ю., Шестакова М.В., Парфенова Е.В. Взаимодействие воспаления и инсулиновой резистентности: перспективы иммунорегуляции как потенциального инструмента терапии сахарного диабета 2 типа // *Сахарный диабет.* 2023. V. 26. №. 2. P. 192-202.
5. Michurina S., Stafeev I., Beloglazova I., Zubkova E., Mamontova E., Kopylov A., Shevchenko E., Menshikov M., Parfyonova Y. Regulation of Glucose Transport in Adipocytes by Interleukin-4 // *J. Interferon Cytokine Res.* 2022. V. 42. № 3. P. 127–136.
6. Michurina S.S., Stafeev I.S., Menshikov M.Y., Parfyonova Y.V. Mitochondrial dynamics keep balance of nutrient combustion in thermogenic adipocytes // *Mitochondrion.* 2021. V. 59. P. 157–168.
7. Michurina S., Stafeev I., Podkuychenko N., Sklyanik I., Shestakova E., Yah'yaev K., Yurasov A., Ratner E., Menshikov M., Parfyonova Y., Shestakova M. Decreased UCP-1 expression in beige adipocytes from adipose-derived stem cells of type 2 diabetes patients associates with

mitochondrial ROS accumulation during obesity // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2020. V. 169. P. 108410.

8. а) Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Подкуйченко Н.В., Воротников А.В., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В. Интерлейкин-4 восстанавливает чувствительность к инсулину в адипоцитарной модели липид-индуцированной инсулиновой резистентности. // *Биохимия.* 2018. Т. 83. № 5. С. 662-672.

б) Stafeev I.S., Michurina S.S., Podkuychenko N.V., Vorotnikov A.V., Menshikov M.Y., Parfyonova Y.V. Interleukin-4 Restores Insulin Sensitivity in Lipid-Induced Insulin-Resistant Adipocytes // *Biochemistry (Moscow).* 2018. V. 83. № 5. P. 498–506.

Тезисы докладов:

9. Мичурина С.С., Стафеев Ю.С., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В. Роль противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в инсулиновой чувствительности жировой ткани // Сборник тезисов конференции по лечению и диагностике сахарного диабета «Фундаментальная и клиническая диабетология в 21 веке: от теории к практике». 2022. P. 81.

10. Michurina S.S., Stafeev I.S., Mamontova E.D., Menshikov M.Y., Parfyonova Y.V. Developing of glucose-consuming adipocytes by interleukin 4 gene // *Human Gene Therapy.* 2021. V. 32. № 19-20. P. 390.

11. Michurina S., Stafeev I., Arfanyan A., Beloglazova I., Shevchenko E., Menshikov M., Parfyonova Y. The role of IL-4/STAT6 signaling in regulation of adipocytes glucose metabolism // *Diabetologia.* 2020. V. 63. P. S221–S221.

12. Stafeev I.S., Michurina S.S., Molokotina Y.D., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Shevchenko E.K., Vorotnikov A.V., Menshikov M.Y., Parfyonova Ye V. IL-4 gene lentiviral transduction to mature adipocytes has positive long-term effects on their insulin sensitivity, but these effects are not mediated by STAT6 // *Endocrine Practice.* V. 25. 2019. P. 8A–8A.

13. Michurina S., Stafeev I., Beloglazova I., Molokotina Y., Shevchenko E., Vorotnikov A., Menshikov M., Parfyonova Ye. Lentiviral transfer of interleukin 4 gene to 3T3-L1 adipocytes prevents development of lipid-induced insulin resistance // *European Heart Journal.* 2018. V. 39. P. 492.